

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

**ANJİOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİTÖRLERİNİN
SEREBRAL İSKEMİ SONRASI SIÇAN BEYİN HÜCRELERİNDEKİ
NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Süleyman COŞKUN

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. GÖKŞİN ŞENGÜL

Uzmanlık Tezi
ERZURUM-2011

İÇİNDEKİLER

ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	IV
TABLolar DİZİNİ.....	V
ÖZET	VI
SUMMARY	VII
KISALTMALAR.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serebral İskemi Epidemiyoloji ve Etyoloji	3
2.2. Beynin Arteriyel Damar Anatomisi	5
2.3. Serebral İskemi Patofizyolojisi.....	8
2.4. Serebral İskemide Koruyucu ve Tedavi Edici Yöntemler	12
2.5. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve İnhibitörleri	16
2.6. Serebral İskemi ve Glutamat	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Nöron Hücre Kültürü Çalışması	23
3.2. Histopatolojik Çalışma.....	26
3.3. Lokomotor Aktivite Değerlendirilmesi.....	28
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	28
4. BULGULAR.....	30
4.1. Nöron Kültürü Sonuçları	30
4.2. Histopatolojik Sonuçlar	31
4.3. Davranış Testleri Sonuçları	34
5.TARTIŞMA	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	43
7. KAYNAKLAR.....	44

ONAY

“Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörlerinin Serebral İskemi Sonrası Sıçan Beyin Hücrelerindeki Nöroprotektif Etkilerinin Araştırılması (Deneysel çalışma)” isimli tez konusu Nöroşirurji Ana Bilim Dalı Kurulu’nun 10.04.2009 tarih ve 71 sayılı kararı ve Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 27.03.2009 tarih ve 4 sayılı oturumunda incelenmiş ve 36 no’lu kararı ile tez olarak yapılması onaylanarak, 10.04.2009 tarih ve 520 sayılı yazısı ile Anabilim Dalımıza bildirilmiştir. Tez çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Tıp Bilimleri Bölüm Kurulu’nun 15.04.2009 tarih ve 17 no’lu toplantısında tez olarak çalışılması uygun görülmüş ve 17.04.2009 tarih ve 548 sayılı yazı ile Ana Bilim Dalımıza bildirilmiştir.

TEŞEKKÜR

Nöroşirurji eğitimim süresince engin bilgi ve yetenekleriyle önümde yeni ufuklar açılmasına vesile olan hocalarım Prof. Dr. İsmail Hakkı Aydın'a; Prof. Dr. Hakan Hadi Kadioğlu'na, Prof. Dr. Yusuf Tüzün'e, Prof. Dr. Çetin Refik Kayaoğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Erhan Takçı'ya ve Yrd. Doç. Dr. Mürteza Çakır'a; bana çalışmanın ve başarmanın en önemli erdeminin sabır olduğunu aşıl原因 ve yol göstericiliğini, desteğini ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez hocam, sayın Yrd. Doç. Dr. Gökşin Şengül'e, çalışmamızın histopatolojik değerlendirilmesinde öneri ve yardımlarını esirgemeyen Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın Prof. Dr. Cemal Gündoğdu ve Yrd. Doç. Dr. Muhammet Çalık'a; deneysel çalışmanın yapılışı sırasında yardımlarını esirgemeyen Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ahmet Hacımüftüoğlu ve Ecz. Fatih Saruhan'a teşekkürlerimi sunarım. Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan Annem ve Babam'a, tez hazırlık ve çalışmalarımda bana sevgi, saygı ve yardımlarını her zaman hissettiğim eşim Ayşenur'a, biricik oğlum Celal Taha'ya; nöroşirurji eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, tüm asistan arkadaşlarıma ve Nöroşirurji Kliniğine hizmet veren ve vermiş tüm hemşire ve servis personellerine teşekkür ederim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Beyin Arterleri Yandan Görünüm	6
Şekil 2. Willis Poligonu- Alttan görünüm	7
Şekil 3. Serebral İskeminin Patofizyolojisi	12
Şekil 4. Düzenlenen Plate ve Hazırlanan Çözelti.....	25
Şekil 5. Kommon Karotid Arterin Ligatüre Edilmesi.	27
Şekil 6. Serebral İskemi Sonrası Çıkarılan Beynin Makroskopik Görünümü.....	28
Şekil 7. Lokomotor Aktivite Cihazı	29
Şekil 8. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan Ve Kaptopril Tedavisi Verilen Gruptan Elde Edilen Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü	31
Şekil 9. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan ve Ramipril Tedavisi Verilen Gruptan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü	32
Şekil 10. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan ve Perindopril Tedavisi Verilen Gruptan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü.	32
Şekil 11. Unilateral Karotid Ligasyon Yapılan ve Serum Fizyolojik Verilen Gruptan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskobik Görünümü.....	33
Şekil 12. Kontrol Grubundan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskobik Görünümü.	33

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. L-glutamatın 10^{-6} M ve 10^{-7} M Konsantrasyonundaki Dozuna Karşı ve Kaptopril, Perindopril, Ramipril Verilmesini Takiben MTT Canlılık Testine Göre Oluşan Canlılık Ortalama Değerleri.	30
Tablo 2. Histopatolojik Sonuçların İstatiksel Analizi	31
Tablo 3. Stereotipi %(yüzde) Sonuçları	34
Tablo 4. Vertikal Hareket Sonuçları	34
Tablo 5. Ambulatuvar Hareket Sonuçları.....	34
Tablo 6. Horizontal Hareket Sonuçları	35

ÖZET

Giriş: Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin iskeminin patofizyolojisinde rol oynayan hücresel apoptozisi önleyebildiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin yenidoğan sıçan beyin hücre kültürlerinde glutamatla oluşturulan nörotoksik hasarı ve sıçanlarda tek taraflı karotis kommunis ligasyonu ile oluşturulan fokal serebral iskemiyi önleyici ve iyileştirici etkisini araştırmak ve davranış üzerine yaptığı değişiklikleri test etmektir.

Materyal ve Metod: Nöron hücre kültürü çalışmasında 3 adet yenidoğan rat kullanıldı. Ratların beyin korteksi çıkartılarak hücre kültürü yapıldı. Hücre kültürlerine anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin tedavi edici dozları verildikten sonra nörotoksik dozda glutamat eklendi ve hücre canlılık testleri yapıldı. Histopatolojik çalışmada 30 rat kullanıldı. Sol kommon karotid arter ligasyonunu takiben 7 gün boyunca kaptopril, ramipril, perindopril ve serum fizyolojik verilen ratlar davranış testleri yapılarak, sakrifiye edildi. Çıkarılan beyinler histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: Nöron hücre kültürü çalışmasında, ramipril ve perindopril verilen gruplarda canlı hücre sayısının daha fazla olduğu görüldü. Histopatolojik çalışmada anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin verildiği gruplarda daha az nöronal hasar gözlemlendi. Perindopril verilen grupta nöronal hasar en azdı. Davranış testlerinde anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin davranış üzerine etkisi bulunmadı.

Sonuçlar: Bu çalışmadan elde edilen veriler, serebral iske mi sonrasında nöron yaşam süresinin uzamasında anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin etkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ACE inhibitörleri, glutamat, nöron kültürü, nöroprotektif etki, serebral iske mi

SUMMARY

Introduction: Previous studies revealed that angiotensin-converting enzyme inhibitors could prevent cellular apoptosis which has a role in the pathophysiology of ischemia. The aim of this study was to investigate preventive and therapeutic effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors in neurotoxic damage induced by glutamate in brain cell cultures of new-born rats and in focal cerebral ischemia induced by ligation of unilateral carotis communis in rats and to test the changes it makes on behavior.

Material and Method : 3 new-born rats were used in neuron cell culture study. Brain cortexes of the rats were removed and cell culture was made. After the treating doses of angiotensin-converting enzyme inhibitors were given to the cell cultures, glutamate of neurotoxic doses were added and cell viability tests were performed. A total of 30 rats were used in histopathological study. The rats were given captopril, ramipril, perindopril and normal saline for 7 days following left common carotid artery ligation. After behavior tests, the rats were sacrificed. The removed brains underwent histopathological analysis.

Results: In neuron cell culture study, it was found that number of living cell was higher in the groups which were given ramipril and perindopril. In histopathological study, lower neural damage was observed in the groups which were given angiotensin-converting enzyme inhibitors. Neural damage was the lowest in the group which was given perindopril. Behavior tests showed no effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on behavior.

Conclusions: The data obtained in this study revealed that angiotensin-converting enzyme inhibitors might be effective in lengthening life span of neurons after cerebral ischemia.

Key Words: ACE inhibitors, glutamate, neuron culture, neuroprotective effect, cerebral ischemia

KISALTMALAR

ADE	: Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
SKA	: Serebral Kan Akımı
AMPA	: Amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoazopropiyonik asid
NMDA	: ‘N-metil-D-aspartat’
Q	: Kuiskulat
PLC	: Fosfolipaz C
PPI ₂	: Fosfotidil inositol bifosfat
DAG	: Diaçil gliserol
IP 3	: İnositol trifosfat
PKC	: Protein kinaz C
rt PA	: Rekombinant doku plazmiojen aktivatörü
RAS	: Renin anjiotensin sistemi
MMP	: Matriks metalloproteinaz
-COOH	: Karboksil
-SH	: Sülfidril
DRAS	: Doku renin anjiotensin sistemi
GLAST	: Glutamat/ aspartat taşıyıcısı
GLT	: Glutamat taşıyıcısı
EAAT	: Eksitator aminoasit taşıyıcısı
TBOA	: Threo-beta-benzyloxyaspartate
HBSS	: Hanks’in dengeli tuz solüsyonu
PBS	: Fosfat buffer solüsyonu
FCS	: Fetal kalf serumu
NBM	: Neurobasal Medium
NKCC1	: Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ kotransporter izoform-1
GSH	: Glutatyon
COX-2	: Siklooksijenaz-2
MPTP	: Methyl-phenyl-tetrahydropiridine

1. GİRİŞ

Serebral iskemi, beyin kan akımının azalması veya kesilmesi sonucu enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan, nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan olaylar zinciridir (1-3). Yeterli hücre enerji kaynağının olmaması iskemik hasarın oluşumunda en önemli rolü oynar. Normal koşullarda beyin enerji gereksiniminin aerobik glikoliz sonucu oluşan ATP ile karşılar. İskemi başlangıcında oksijen eksikliği sonucu kısa bir süre için anaerobik glikoliz devreye girer. Anaerobik metabolizma sonucu laktik asit ve H^+ birikimi hücre içinde ve dışında asidoz gelişmesine neden olur. Laktik asit ve düşük PH protein denatürasyonu, enzimlerin fonksiyon kaybı, ödem ve serbest radikallerin oluşumu gibi iskemik hasarda rol oynayan faktörlerin oluşmasına neden olur (4). ATP eksikliği durumunda; fosfolipid, polisakkarid, nükleik asit ve protein gibi makromolekül sentez işlemi giderek azalmaktadır (1, 4). Hücre membranında bulunan aktif ve pasif transport sistemleri enerji varlığında hücre fonksiyonları için mutlak gerekli olan iyon dengesini sağlar. Normal şartlarda, nöronların iyon dengesi K^+ 'un büyük intrasellüler gradienti ile ekstrasellüler Na^+ , Ca^{++} , Cl^- gradientleri ile devam ettirilir. İyonik denge ATP gibi yüksek enerji metabolitlerine bağlı çeşitli iyonik pompalar tarafından sağlanır. ATP yetmezliği sonucu iyonik pompalar fonksiyonlarını yapamaz duruma gelir ve sonucunda konsantrasyon farkına bağlı olarak K^+ hızla hücreyi terk ederken, Na^+ , Cl^- ve Ca^{++} absorbe olur. İyonlar arasındaki bu değişim membran depolarizasyonuna yol açar. Na^+ ve Cl^- ile birlikte osmotik olarak suyun da hücre içine girmesi sitotoksik ödemi oluşturur (2, 3, 5). İskemiden hemen sonra, biriken metabolitlerin oluşturduğu vasküler permeabilitedeki bozukluk nedeniyle protein, Na^+ ve su sızıntısı oluşur. 12-48 saat sonra maksimale ulaşan bu olay iskemik beyin ödeminin ikinci dönemidir ve vazojenik ödem adını alır (2, 3, 6). Hücre dışından kalsiyum girişi ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınımı ve hücre içi kalsiyum düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulması iskemik hasarın gelişmesinde rol oynayan en önemli mekanizmalardır. ATP'nin tükenmesi sonucunda Na^+/K^+ ATPaz, $3Na^+/Ca^{++}$ ve Na^+/H^+ transport pompaları bozulur. Sodyum konsantrasyonunun hücre içinde artması sonucu başlayan presinaptik depolarizasyon N tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını açarak hücre içine kalsiyum girmesine neden olur. Presinaptik uca giren kalsiyum başta glutamat olmak üzere uyarıcı amino asitlerin sinaptik aralığa salınmasına neden olur (1, 3).

Serebral iskemide, iskemik nöronun glutamat salınımıyla, sinaptik aralık ve hücre içinde kalsiyum ve sodyum düzeni bozulur. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının etkilenimi ve kalsiyumun hücre içine birikimiyle, hücre dışı sıvının hücre içine aşırı taşınması oluşur ve sitotoksik ödeme yol açar. Daha sonra hücre içi yapılarda da bozulma başlar ve hücre zarını bozacak serbest yağ asitleri (araşidonik asit türevleri: prostoglandinler) ve onlardan da serbest radikal salınımı oluşur. Serbest radikaller lipid peroksidasyonu tetikler ve sonuçta hücre membran dağılması ve ölümü oluşur. Dolayısıyla, glutamatın beyindeki konsantrasyonlarında meydana gelecek değişiklikler nörotoksositeye ve dolayısı ile hücre ölümüne yol açmaktadır. Beyindeki hücre ölümleri geri dönüşümsüz olduğundan meydana gelen hasar ve hasarın sonuçları da sıklıkla kalıcı ve geri dönüşümsüzdür.

Anjiotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri serebral sirkülasyonda bozukluğa sebep olan esansiyel hipertansiyon tedavisinde sıkça kullanılmaktadır. ADE inhibitörleri, kininaz-2 inhibitörüdür ve vazodilatatör bir peptid olan bradikininin yıkımını önler (7). Bradikinin, bradikinin-B reseptörü aracılığıyla glutamat nörotoksitesinden doğrudan koruyucu etki gösterir. ADE inhibitörleri Anjiotensin-2 nin Anjiotensin-1 e dönüşmesini engeller. Düşen anjiotensin-2 düzeylerinin damarlarda süperoksit anyon üretimini düşürerek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (8). ADE inhibitörleri aynı zamanda bradikinin degradasyonunu sağlayan kininaz aktivitesini inhibe ederek bradikinine bağlı fosfolipaz A2 aktivasyonu sonucu vazodilatatör etkili prostanooidlerin artışı sağlamış olur. Ayrıca bradikininin lokal artışı ile endotelial B2 reseptörleri uyarılarak endotel hücrelerinden nitrik oksit salınımı da sağlanmış olur. Bu da vazodilatatör etkiye katkıda bulunmaktadır (9, 10).

Bu çalışmada, yenidoğan rat beyin korteksinde yapılan primer hücre kültürlerinde glutamatın nörotoksositeye neden olduğu konsantrasyonlarda, ADE inhibitörlerinin invitro nöron koruyucu etkisi, tek taraflı kommon karotid arter ligasyonu sonrası meydana getirilen fokal serebral iskemide in vivo nöron koruyucu etkisi ve opto-varimex testleri ile hayvan davranışları üzerine olan etkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Serebral İskemi Epidemiyoloji ve Etyoloji

Tıkaçıcı serebrovasküler hastalıklar veya yol açtığı sonuç olan stroke, beyin dolaşımındaki herhangi bir patoloji sonucu sinir sistemi fonksiyonlarındaki anormallik olarak tanımlanabilir. Batı dünyasının üçüncü, hatta bazı yazarlara göre ikinci sıklıkta ölüme yol açan (ortalama % 27) ve en sık uzun dönem sakatlığa yol açan bir hastalık grubudur (11).

Dünyada yaşam süresinin uzun olması ve yaşlı toplumun artması, strok'un sıklıkla bu grubun hastalığı olması nedeniyle, ekonomik giderler hastalığın kendisiyle birlikte yoğun tartışılmaya başlanmıştır (11).

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde strok nedeniyle yıllık harcamanın 30 milyar dolar olduğu tahmin edilmektedir. Bir hastanın yaşam boyu harcaması ise strok tipine bağlı olarak 90 bin-228 bin dolar arasında olduğu tahmin edilmektedir (11).

ABD başkanının 1990'lı yılları "beyin dekadı" ilanından sonra bu konunun irdelenmesi ivme kazanmış, strok birimleri kurulmuş, tanı, tedavi, takip ve önleme ile ilgili programlar geliştirilmeye başlanmıştır. Sinir hücrelerinin ister iskemik olsun, travma olsun herhangi bir patolojiye karşı toleransının sınırlı olması hızlı strok tanımlama ve tedaviye başlanmasını önemli hale getirmektedir. Böylece, sinir cerrahlarının, nörologların, girişimsel radyologların ağırlıklı olmak üzere kalp damar cerrahları, oftalmologların ve konuyla ilgili yoğun bakım personellerinin katıldığı strok takımlarının kurulmalarında artmıştır. Genellikle hızlı seyir izleyip klinik olarak genel ve fokal defisitlere yol açabilen strok, pratik amaçlar gereği iskemik ve hemorajik strok olarak ikiye ayrılmaktadır (11, 12).

Strok ve daha geniş tanımlamayla serebrovasküler olay, beyin veya beyine giden kan damarlarını etkileyen herhangi bir olay nedeniyle genellikle akut ve fokal nörolojik rahatsızlıklara yol açan olayı tanımlar. Beyin kan akımının eşsiz anatomik ve fizyolojik yapısı nedeniyle dolaşımdaki çoğu bozukluktan beyin korunur. Ancak bu koruyucu sistemde hastalık olursa o zaman strok ile sonuçlanır (11, 12).

Beyin damar hastalığı öncelikle iskemik ve hemorajik olarak iki sınıfa ayrılabilir. İskemik strok bu ki ana sınıfın %80'ini oluşturmaktadır. İskemik strok, beyin damarı veya beyine giden bir damarın tıkanmasıyla beslediği beyin bölgesindeki gerekli oksijen ve glikozun azalmasına ve fonksiyonlarının kaybına yol açar. Hemorajik strok ise beyin parankim içi veya subaraknoid kanama şeklindeki olayla, benzer hasara yol açar. Tedavilerindeki ciddi farklılıklar nedeniyle hızlı tanı ve tedavi önemlidir (11-13).

İskemik strok karmaşık ve heterojen bir hastalıktır. Birkaç ana hastalık ve tıkanma grubundan söz edilebilir. Bunlar;

* **Büyük Damar Aterotrombotik Tıkanma:** İnternal karotid, vertebral veya baziler arter gibi büyük damarlar veya beynin orta derece damarlarında da olabilir. Bu tür tıkanma karotis aterosklerozunda olduğu gibi, aterosklerotik bir plağın büyümesi, damar duvarını daraltması, yerinden kopup trombus oluşumu ve distal bir yerde tıkanma oluşturmaları gibi safhalardan geçer. Hastaların yaklaşık %20 si bu grup patoloji nedeniyle hastalanır. Bazen hiperkoagülopati gibi bir bozukluk nedeniyle aterosklerotik bir lezyon olmadan da bu şekilde bir tıkanma oluşturabilir.

* **Küçük Damar Laküner Tıkanma (Laküner Strok):** İskemik strok'ların %40'ını oluşturur. İntrakraniyal perforan arterlerdeki vaskulopatiler, lipohyalinoses gibi bozukluklar suçlanmaktadır. Bazal gangliyonlar, internal kapsül ve beyin sapı gibi derin subkortikal alanlarda sıklıkla oluşan küçük enfarktlara yol açar ve enfarkt sonrası oluşan alana da 'lakün' adı verilir.

* **Kardiyoembolik Tıkanma:** Serebrovasküler tıkanmalar içerisinde %20'lik bir orandan sorumlu olan patolojidir. Emboli, daha çok orta serebral arter veya vertebrobaziler sistemin dalları gibi orta boy damarları tıkar. Yarısından fazlası atrial fibrilasyon nedeniyle oluşur. Aort arkındaki plaklar, yakın dönemde oluşmuş myokard enfarktı, sol ventriküler yetmezlik ve kapak hastalıkları, kardiyoembolik strok için risk faktörlerdir (11).

* **Diğer Sebeblere Bağlı Tıkanma:** Damar diseksiyonu, fibromusküler displazi, moya moya gibi sebebi veya etyolojisi saptanamayan %20'lik hastalık grubunu oluşturur.

2.2. Beynin Arteriyel Damar Anatomisi

Kalp debisinin beşte birini alan beyin dokusundan dakikada yaklaşık 800ml kan geçer. Beyin a.karotis interna ve a.vertebralis ile bunların oluşturduğu sirkulus arteriosus serebri'den (Willis poligonundan) çıkan arterler tarafından beslenir (14).

1. Arterya Karotis Interna: Boyun bölgesinde a.karotis kommunisin verdiği iki uçtan birisidir. A.karotis kommunis solda direkt aortadan, sağda ise truncus brakiosefalikustan çıkar. Sağda ve solda iki a.karotis interna, a.karotis komunislerin boyundaki bifurkasyon noktasından başlayarak basis krani'ye doğru yükselirler ve os petrosum hizasından kranyal boşluğa girerler.

A. karotis interna seyrine göre 4 kısımda incelenir.

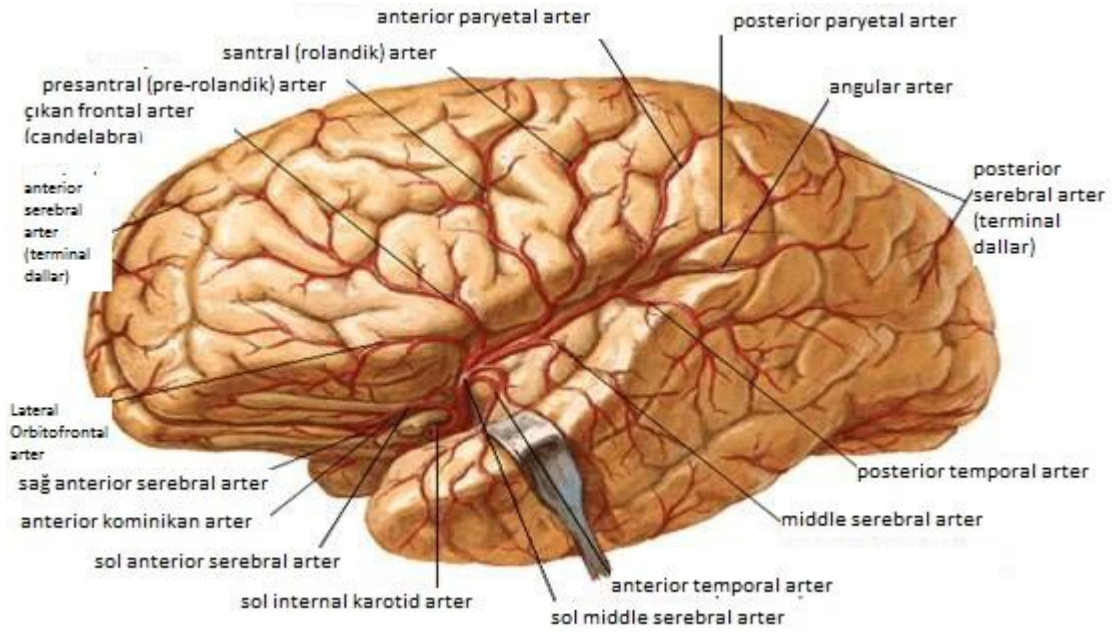
1. Pars servikalis: A.karotis interna bu bölgede dal vermez.

2. Pars petroza: A.karotis interna bu bölgede; aa. karotikotimpanika ve a.canalis pterigoidei dallarını verir.

3. Pars kavernoza: Bu bölgede a.karotis interna; r.sinus kavernozi, a.hipofizyalis inferior, r.meningeus dallarını verir.

4. Pars serebralis: Bu bölgede a.karotis interna; a.oftalmika, a.komunikans posterior, a.koroidea anterior, a.serebri media dallarını verir.

A.karotis interna beyin kaidesinde a.serebri anterior ve a.serebri media olmak üzere iki uç dala ayrılır. Sağlı sollu iki a.serebri anterior'lar a.komunikans anterior vasıtasıyla birbirleri ile birleşirler. A.karotis interna ile iki uç dalı (a.serebri anterior ve a.serebri media) ve a.komunikans anteriora "karotis sistemi" veya "ön sistem" adı verilir (14,15).



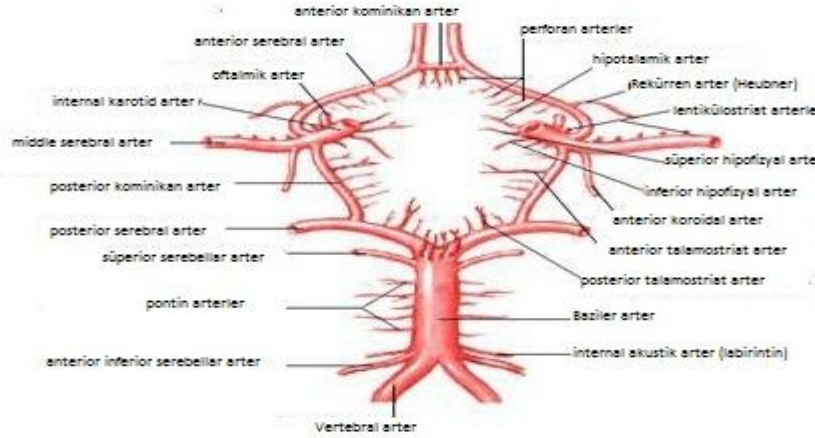
Şekil 1. Beyin Arterleri Yandan Görünüm(Netter'den değiştirilerek alınmıştır)

2. Arterya Vertebralis: A.subklavya'nın birinci parçasından çıkar. Altıncı servikal vertebradan itibaren proses transversus 'lardaki foramen transversarium'ların içinde yukarı doğru yükselir ve foramen magnum'dan geçerek kranyum boşluğuna girer (14).

A.vertebralis kranyum boşluğu içinde rr.meningei, a.spinalis anterior, a.spinalis posterior, a.inferior posterior serebelli, rr.medullaris medialis, rr.medullaris lateralis dallarını verir. Sağ ve sol a.vertebralis'ler pons'un alt kenarı hizasında birleşerek a.basilaris'i oluşturur. A.basilaris pons'un ön yüzünde sulkus basilaris içinde yukarıya doğru yükselirken; aa.pontis, a.labirenti, a.inferior serebelli, a.serebri posterior dallarını verir. A.vertebralis'ler, a.basilaris ve uç dallarına (a.serebri posterior) "vertebro-basiler sistem" veya "arka sistem"denir (14, 15).

3. Sirkulus Arteriosus Serebri (Willis Poligonu): Sisterna interpedinkularis içerisinde a.karotis interna ile a.basilaris'in dalları ve bunlar arasındaki anastomozların meydana getirdiği sirkulus arteriosus serebri'nin oluşumuna katılan arterler şunlardır:

1. A. Serebri Anterior
2. A. Komunikans Anterior
3. A. Serebri Media
4. A. Serebri Posterior
5. A. Komunikans Posterior



Şekil 2. Willis Poligonu- Alttan görünüm(Netter'den değiştirilerek alınmıştır)

A. komunikans anterior, sağ ve sol a.serebri anterior'ları birleştirir. A.komunikans posterior ise a.karotis interna ile a.serebri posteroru birleştirir (14).

Karotis sistemi; frontal ve parietal lobların dış ve medial yüzlerini, frontal lobun orbital yüzünü, temporal lobun üst yüzünü kanlandırır. Perforan dalları ise; kapsula interna, bazal gangliyonların büyük bir kısmını, talamusun ön kısmını ve optik radyasyonun büyük bir kısmını kanlandırır (15, 16).

Vertebro-baziler sistem; beyin sapını, serebellumu, temporal lobun alt yüzünü, oksipital lobun dış ve medial yüzünü kanlandırır. Perforan dalları ise talamus'un arka kısmını kanlandırır (15, 16).

Willis poligonu her insanda aynı morfolojik yapıda olmayabilir. %20 oranında konjenital olarak bu yapının bozulduğu saptanmıştır (15, 17).

2.3. Serebral İskemi Patofizyolojisi

Serebral iskemi, beyin kan akımının azalması veya kesilmesi sonucu enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan, nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan olaylar zinciridir (1-3). Total vücut ağırlığının %2'sini oluşturan insan beyninin, dinlenme durumunda inspire edilen O_2 'nin %20'sine, kardiyak outputun %15'ine ve açlık anındaki karaciğer glukozunun tamamına ihtiyacı vardır. Serebral korteksin normal O_2 kullanımı, yaklaşık olarak gri cevherde 6ml/100gr/dak, beyaz cevherde ise 2ml/100gr/dak.'dır. Glukoz kullanımı ise 4.5-7mg/100gr/dak. arasında değişir.

Dinlenme anındaki serebral kan akımı (SKA), yaklaşık 50ml/100gr.beyin dokusu/dak.'dır (1, 3). Beyin dokusunun devamlılık ve sabitlik isteyen O_2 ve glukoz düzeyi yüksek düzeyde perfüzyona gereksinim gösterir. Kısıtlı anaerobik metabolizma ve glikojen depoları nedeniyle santral sinir sistemi iskekiye en duyarlı dokudur. Özellikle hipokampus CA1 bölgesi, korpus striatum, motor korteks, piramidal nöronlar, serebellum purkinje hücreleri geçici ve kısa süreli dolaşım bozukluklarında beynin diğer bölgelerine nazaran daha fazla etkilenmektedir (3, 18).

Etyolojiye bağlı olarak iskemi: fokal ve global iskemi olarak ortaya çıkar. Fokal iskeminin tipik klinik durumu orta serebral arterin oklüzyonu ile gelişir fakat subaraknoid kanama veya kafa travmasına sekonder olarakta görülebilir. Buna karşı global iskemi kardiyak arrest sonucu gelişir (3, 19). Global iskemili hastalarda iskemi sırasında SKA mı mevcut değildir. Ancak fokal iskemide kollateral dolanımdan dolayı düşük düzeylerde rezidüel kan akımı potansiyeli mevcuttur. Fokal iskemideki bu rezidüel perfüzyon membran devamlılığını sağlayarak, irreversible nöronal hasarın dönüşümüne yol açabilecek ve düşük düzeylerde metabolik aktiviteyi devam ettirecek yeterli madde gönderilmesini sağlayabilir. Fokal iskemide reperfüzyon hızla

yapılmadığı zaman infarkt oluşan “santral fokus” alanı ve normalde infarktlı parçanın bir parçası haline gelen “perifokal alan” olmak üzere iki bölümden oluşur. Santral fokus dakikalar içerisinde geri dönüşümsüz hasarı gösteren en ağır lezyonun olduğu bölgedir. Perifokal alan elektiriksel olarak sessiz, yapısal olarak, ise iyon bölgeleri halen bozulmamış bölgedir. Kan akımı yeniden sağlanırsa veya nöroprotektif ajanlar kullanılırsa bu alanın kurtarılabilme olasılığı vardır (20).

Yeterli hücre enerji kaynağının olmaması iskemik hasarın oluşumunda en önemli rolü oynar. Normal koşullarda beyin enerji gereksiniminin aerobik glikoliz sonucu oluşan ATP ile karşılar. İskemi sonucu oksijen yokuğunda, mitokondriyal enerji transportu ve oksidatif fosforilasyonun bozulması sonucu ATP sentezlenemez ve enerji açığa ortaya çıkar. Enerji eksikliği sonucu asidoz, makromolekül sentezinin durması, iyon dengesinin bozulması ve ATP yıkım ürünlerinin birikmesi ile görülür.

İskemi başlangıcında oksijen eksikliği sonucu kısa bir süre için anaerobik glikoliz devreye girer. 1M glikozun anaerobik metabolizmasının net sonucu 2M laktat ve H^+ yapımıdır. Beyin dokusunda iskemiden 2-3 dakika sonra laktat düzeyi maksimale geçer. Doku laktat düzeyi 16-20 mikromol/gr veya daha yüksekse doğrudan nöron hasarına yol açar (3, 21). Anaerobik metabolizma sonucu laktik asit ve H^+ birikimi hücre içinde ve dışında asidoz gelişmesine neden olur. Laktik asit ve düşük PH protein denatürasyonu, enzimlerin fonksiyon kaybı, ödem ve serbest radikallerin oluşumu gibi iskemik hasarda rol oynayan faktörlerin oluşmasına neden olur (4). ATP eksikliği durumunda; fosfolipid, polisakkarid, nükleik asit ve protein gibi makromolekül sentez işlemi giderek azalmaktadır (1, 4).

Hücre membranında bulunan aktif ve pasif transport sistemleri enerji varlığında hücre fonksiyonları için mutlak gerekli olan iyon dengesini sağlar. Normal şartlarda, nöronların iyon dengesi K^+ ’un büyük intraselluler gradienti ile ekstraselluler Na^+ , Ca^{++} , Cl^- gradientleri ile devam ettirilir. İyonik denge ATP gibi yüksek enerji metabolitlerine bağlı çeşitli iyonik pompalar tarafından sağlanır. ATP yetmezliği sonucu iyonik pompalar fonksiyonlarını yapamaz duruma gelir ve sonucunda konsantrasyon farkına bağlı olarak K^+ hızla hücreyi terk ederken Na^+ , Cl^- ve Ca^{++} absorbe olur. İyonlar arasındaki bu değişim mebran depolarizasyonuna yol açar. Na^+ ve Cl^- ile birlikte osmotik olarak suyunda hücre içine girmesi sitotoksik ödemi oluşturur (2,

3, 5). İskemiden hemen sonra, biriken metabolitlerin oluşturduğu vasküler permeabilitedeki bozukluk nedeniyle protein, Na^+ ve su sızıntısı oluşur. 12-48 saat sonra maksimale ulaşan bu olay iskemik beyin ödeminin ikinci dönemidir ve vazojenik ödem adını alır (2, 3, 6).

Hücre dışından kalsiyum girişi ve hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum salınımı ve hücre içi kalsiyum düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulması iskemik hasarın gelişmesinde rol oynayan en önemli mekanizmalardır. ATP'nin tükenmesi sonucunda Na^+/K^+ ATPaz, $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ve Na^+/H^+ transport pompaları bozular. Sodyum konsantrasyonunun hücre içinde artması sonucu başlayan presinaptik depolarizasyon N tipi voltaja duyarlı kalsiyum kanallarını açarak hücre içine kalsiyum girmesine neden olur. Presinaptik uca giren kalsiyum başta glutamat olmak üzere uyarıcı amino asitlerin sinaptik aralığa salınmasına neden olur (1, 3).

Sinaps aralığında uyarıcı aminoasitlerin geri alınımı sodyum düzeyi ve membran potansiyeli ile çalışan $2\text{Na}^+/\text{glutamat}$ kotransporterleri ile gerçekleşmektedir. İskemide uyarıcı aminoasitlerin sinaptik aralığa kalsiyum bağımlı salınımlarının yanı sıra, $2\text{Na}^+/\text{glutamat}$ kotransporterleri yönünü değişmesi sonucu geri alım bozukluğu sinaptik aralıkta uyarıcı aminoasitlerin düzeyinin artmasında önemli rol oynadığı ve bu yolun daha etkili olduğu bildirilmektedir (1, 3).

Nöronda postsinaptik agonist ile aktive olan ve iyon kanalı olarak çalışan yüksek afiniteli kainat reseptörü, düşük afiniteli kainat reseptörü, amino-3-hidroksi-5-metil-4 izoazopropiyonik asid (AMPA) reseptörü, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü ve kuiskulat reseptörü (Q) bulunmaktadır (3). Glutamat presinaptik uçtan salınıncı postsinaptik mebranda bulunan, hem AMPA hem de NMDA reseptörlerini aktive eder. AMPA reseptörü Na^+ , K^+ ve H^+ 'nin taşınması ile ilişkilidir. Bu kanallarda sodyum girişi ile depolarizasyon postsinaptik uca iletilmiş olur. NMDA tipi iyon kanalları özellikle hücre içine kalsiyum girişinde önemli rol oynamaktadır. Depolarizasyon ile postsinaptik uçta bulunan voltaja duyarlı L ve T tipi kalsiyum kanalları açılarak hücre içine kalsiyum girişine neden olur (2, 3).

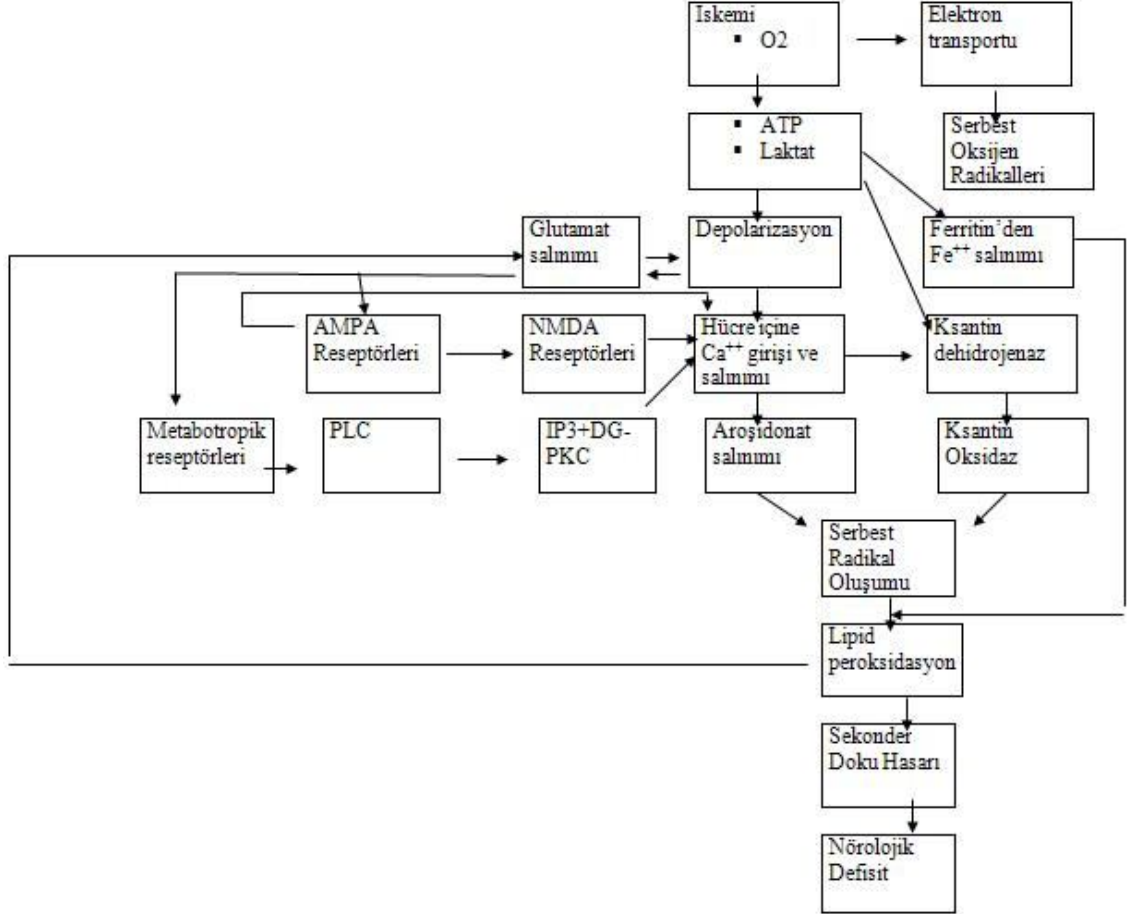
Bazı uyarılara yanıt olarak hücre içi depolardan kalsiyum salınımı gerçekleşmektedir. Asetilkolin ve bazı peptidler hücre mebranda bulunan reseptörlerini uyararak G protein aracılığıyla fosfolipaz C (PLC) uyarırlar. Bu enzim

fosfotidil inositol bifosfat (PPI2)'ın diaçilgliserol (DAG) ve inositol trifosfat (IP3)'a ayrılmasına neden olur. IP3, endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımını gerçekleştirir. Kuiskilat tipi reseptörlerin bazı hücrelerde glutamat ile uyarılması da hücre içi depolardan kalsiyum salınımına neden olabilir. Ayrıca hücre içi kalsiyum DAG ile birlikte protein kinaz C yi (PKC) aktive ederek reseptörlerin agonist uyarılara yanıt artmasına neden olur (1, 3). İskemide hücre dışından kalsiyum girişinden önce hücre depolarından salınmaya başladığı bazı çalışmalarda bildirilmektedir (1, 2).

Hücre içinde erken dönemde kalsiyum düzeyinin artması, fosfolipaz, lipaz, proteaz ve endonükleaz gibi degrade edici enzim gruplarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Lipoliz, proteoliz ve DNA hasarı hücre içi kalsiyum artışı ile birlikte ortaya çıkar (4). Normal koşullarda membran fosfolipidleri enerji bağımlı reaksiyon ile yenilenmektedir. Kalsiyum düzeyinin artması sonucu aktive olan fosfolipaz enzimi hücre membranı ve hücre içi organel mebranlarında bulunan fosfolipidleri parçalar. Bunun sonucunda ortamdaki serbest yağ asit düzeyi artar. Kalsiyum bağımlı membran fosfolipid kaybı büyük olasılıkla membranların protein/ lipid oranlarının bozulmasına yol açar. Bu oranın bozulması iskemik hücreye Ca^{+2} girişini daha da hızlandırmaktadır. Ayrıca lipoliz ile artan serbest yağ asitleri gerek iskemi gerek reperfüzyon dönemlerinde serbest radikallerin oluşmasına yol açmaktadır (3, 22, 23). Hücre içi kalsiyum düzeyindeki artış sonucu ksantin oksidaz, nötral ve lizozomal proteazların aktivasyonu, nöroflamanların ve hücre iskeletinin diğer protein bileşenlerinin parçalanmasına ve hücre hasarını hızlandırarak, dönüşümsüz hasar oluşumuna neden olmaktadır. Endonükleaz aktivitenin artmasının DNA hasarı sonucu apoptotik hücre ölümüne benzer ve geçikmiş nöron ölümünden sorumlu olabileceği öne sürülmektedir (22, 23).

Özetle, öncelikle iskemik nöronun glutamat salınımıyla, sinaptik aralık ve hücre içinde kalsiyum ve sodyum düzeni bozulur. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının etkilenimi ve kalsiyumun hücre içine birikimiyle, hücre dışı sıvının hücre içine aşırı taşınması oluşur ve sitotoksik ödeme yol açar. Daha sonra hücre içi yapıları bozulma başlar ve hücre zarını bozacak serbest yağ asitleri(araşidonik asit türevleri: prostoglandinler) ve onlardan da serbest radikal salınımı oluşur. Serbest radikaller lipid peroksidasyonu tetikler ve sonuçta hücre membran dağılması ve ölümü oluşur. Belli bir bölgedeki oluşan bu hücre hasarları nedeniyle hasar boyutuna göre fonksiyonel

bozulmalar, fokal ya da yaygın olabilir. Hafif klinik nörodefisitlerden ağır şuur bozulmaları, koma ve ölüme kadar gidecek tablolar oluşabilir (3, 12) (Şekil 3).



Şekil 3. Serebral İskeminin Patofizyolojisi (3)

2.4. Serebral İskemide Koruyucu ve Tedavi Edici Yöntemler

1. Strok Öncesi Önleyici Tedavi:

a) Risk Faktör Modifikasyonu (Muhtemel Strok Önleme Programı): Strok oluşumundaki risk faktörleri önemlidir. Bunlardan hipertansiyon, başta atrial fibrilasyon olmak üzere kardiyak hastalıklar, diyabet, hiperkolesterolemi, sigara- alkol aşırı tüketimi ve fiziksel inaktivite gibi faktörlerin elimine edilmesi önerilmektedir. Yapılan çalışmalarda, bu tür risk faktörlerinin düzeltilmesiyle birlikte strok oluşma riski, oluşan

strokta ölüm ve sakatlık olasılığı ise azalmaktadır (11, 24). Risk faktörleriyle ilgili olarak hormonlar, homosistin, lipoproteinler, karotid plak ekojenitesi, lökosit oranları ve fraksiyonlarıyla ilgili çalışmalar halen sürmektedir (11).

b) Altta Yatan Sebeplerin Tedavisi: Kalp hastalıklarının tedavisi, karotid arterdeki plak ve darlıklara karşı endarterektomi ve bypass cerrahileri, moya moya hastalığında direkt ve indirekt revaskülarizasyon tedavileri yapılmalıdır.

Önleyici Tıbbi Tedavi: TİA ve diğer hafif strok tiplerini geçirmiş hastalarda ilerdeki olası strok riskini azaltıcı tıbbi tedavilerin uygulanması gereklidir. Antikoagülanlar rutin olarak önerilmemekte, fakat ciddi atrial fibrilasyonlu hastada kullanılabilir. Antiplateletlerden aspirinin günlük 2*325 veya 4*325 mg arası dozları arasında istatistiksel farklılık bulunmamaktadır. Son zamanlarda aspirin yerine diğer anti plateletlerden ticlopidin ve clopidogrel aspirin intoleransında kullanılmaktadır. Dipyridamol yalnız başına ya da aspirinle birlikte kullanımında da yarar görülmüş özellikle kombine kullanımı tavsiye edilmiştir. Önemli yan etkisi baş ağrısı ve gastrointestinal semptomlardır (11, 25).

1. Akut İskemik Strok Sonrası Acil Tedavi: Ana sebep çoğunlukla arterin tromboembolik tıkanması olduğu için iskemik alanın (mekanik-farmakolojik yolla trombüsten arındırılması veya damarı bypass yoluyla) reperfüzyonu ve restorasyonu ana amaç olmalıdır. Yani iskemik penumbraya yönelik kurtarma çabası olmalıdır. İskemik penumbranın tekrar fonksiyon dönebilme zamanı sınırı, bazı çalışmalarda 1-4 saat, bazılarında ise 12-17 saat yazılmış olsada, tedaviye başlamada kısıtlı bir zaman dilimi olduğu bütün çalışmalarda kabul edilmiş bir gerçektir. Yapılan çalışmaların çoğu hayvan denekleri üzerinde tamamlanmıştır. İnsan kollateral dolaşımı daha iyi olduğu kabul edildiği için, zaman belki bir miktar daha uzun olabilir, fakat hiçbir zaman günler düzeyinde düşünmemek gereklidir (11). Birçok değişik tedavi seceneği tartışılmakta olsun son zamanlarda iki ana yol üzerinde belirginleşme dikkati çekmektedir.

Trombolitik Tedavi (Farmakolojik, Cerrahi-Endovasküler)

1. Farmakolojik Trombolizis

İntravenöz Trombolizis: Fizyolojik ve biyokimyasal olarak vücudun oluşan bir

trombüse karşı doğal bir karşı davranışı vardır. Trombüsün uzaklaştırılmasını amaçlayan bu endojen süreç, enzimatik bir reaksiyonla plazminojen plazmine dönüşmesini içerir ve bu da fibrinolizisi başlatır. Trombolitik ilaçlar bu süreçte katalitik ajan görevi görüp olayın daha hızlı ve erken oluşmasını amaçlarlar. Birçok ajanla ilgili yıllardır klinik ve deneysel çalışmalar yapılmasına rağmen etkili tedavi seçeneği tam ortaya konmamıştır. Rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rtPA) (alteplaz), kullanılabilecek tek ajan gibi görülmektedir. Tedaviye başlama zaman aralığı, olayın başından itibaren 3 saattir. Doz 0.9 mg/kg, maksimum 90 mg'dır (%10 i.v bolus, geri kalan 1 saatte). En önemli risk intraserebral kanamadır. Ölümcül kanama olasılığı %3 olarak bulunulmuştur. Tedaviye 90- 120. dakikalarda başlanabilen hastalardaki 3. ve 12. ay sonuçlarının çok iyi olması erken tedavinin önemini arttırmıştır. Çocuk hastalardaki sonuçlar halen bilinmemektedir. Bu tedavideki yararlanımın artması ve komplikasyonların azaltılması için bazı kriterler geliştirilmiştir. Bu kriterlerin uygulanımı muhakkak gereklidir.

Tedaviye Alınma Kriterleri: (11, 26)

- * Herhangi bir alanda tıkalı damar hastalığına bağlı serebral iskemik olay olması
- * 3 saatten önce bu tedaviye başlanma ve zamanla ilgili güvenli hikaye
- * BT' de intrakraniyal herhangi bir kanamanın olmaması
- * 18 yaş üstü olması

Tedavi Dışı Bırakma Kriterleri:

- * BT'de tümör, AVM, anevrizma, multilober enfarkt veya bir serebral hemisferin 1/3 ünden fazla bir alanda enfarkt olması.
- * Sistolik tansiyonun 185 mm Hg' den, diastolik tansiyonun 110 mm Hg'dan fazla olması (10 dakika arayla 3 ayrı ölçümde devam etmesi)
- * *Epilepsi ve aktif gastrointestinal kanama gibi rahatsızlıklar, aktif perikardit, endokardit ve septik emboli bulguları olması,
- * Koagülopati olması, platet sayısının 100 bin altında olması
- * Hızlı düzelen ve minör semptomlu strok olması
- * Hamilelik olması
- * Derin koma olması
- * Kan şekeri 50 mg/dl'den az, 400 mg/dl'den fazla olması

- * 2 hafta öncesine kadar büyük cerrahi ameliyat geçirmesi

İntravenöz Streptokinaz ve Diğer Ajanlar: Akut iskemik strokta bir zamanlar sık kullanılan bir ajan olmasına rağmen, hasta iyileşmesinde hiçbir fayda saptanmamış, aksine kötü sonuçlarla karşılaşmış ve kullanılmaması tavsiye edilmiştir. Kronik iskemide başarıyla kullanılan 1.5 milyon ünitelik doz, strok tedavisinde intraserebral kanama riskini arttıran bir doz olmuştur. Diğer intravenöz trombolitik ajanlar olan reteplaz, ürokinaz, anisteplaz ve stafilokinazın, strokta kullanımıyla ilgili araştırmalar halen güvenli değildir ve kullanımları önerilmemiştir (11).

İntraarteriyel Trombolizis: Tek tek olgu sunumlarıyla Avrupa ülkelerinde yüksek başarı gösterilmesine rağmen, bu yolun, halen tek başına ya da kombine halde rutin kullanımı tavsiye edilmemektedir.

Antikoagülan ve Antiplateletler: Strok hastalarında kullanımı tartışmalıdır. Doz, zaman, veriliş yolu ve en iyi ilaç tartışmaları sonuçlanmamıştır. Tromboliz tedavisiyle kombine antikoagülan tedavisi, özellikle rtPA tedavisi sonrası ilk 24 saatte uygunsuz ve sakıncalıdır. Antiplateletlerin aspirin dahil olmak üzere akut strok tedavisinde ki etkileri açık değildir (11). Trombolitik ajana ilaveten ilk 24 saatte verilmesi uygun olmamakla birlikte, 24-48 saat sonrası kullanımında sakınca bulunmamıştır.

Vazodilatörler, Volum Genişleticiler, Hipertansiyon İndükleyecileri: Akut iskemik strok tedavisinde yerleri test edilmemiştir.

2.Cerrahi ve Endovasküler Cerrahi Tedavi:

Acil karotid end-arterektominin akut iskemik stroktaki etkisiyle ilgili çalışmalar son zamanlarda artmaya başlamıştır. Ciddi enfaktlı hastalarda kan akımında ani düzeltme, konjesyon, akut beyin ödemi ve kanamalara yol açabilir (11, 27). Buna rağmen bazı çalışmalarda, özellikle hafif veya orta derece defisitli hastalarda, ilk 24 saat içerisinde cerrahi trombektomilerde iyi sonuçlar görülmüştür (11, 28). Akut strokta, ekstrakraniyal-intrakraniyal bypass cerrahisiyle ilgili olumlu sonuçlar alınamamış, aksine ciddi komplikasyonlarla karşılaşmıştır. Endovasküler tedavilerle de rekanalizasyona yönelik çalışmalar yapılmakta ancak hiçbirinin güvenliği ve etkinliğiyle ilgili geniş kontrollü bilgi yoktur. Bu nedenle yaygın kullanımları, araştırma enstitüleri hariç önerilmemektedir (11).

2- Nöral Koruyucu Tedavi: Glutamat reseptör antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, serbest radikal tutucuları gibi nöral koruyucu ajanlarla yapılan çalışmalar tatmin edici değildir (11, 29). Nimodipin, subaraknoid kanamadaki kullanımından etkilenecek akut iskemide denenmiş fakat özellikle antihipertansif etkileri nedeniyle kötü sonuçlar vermiştir. Diğer kalsiyum kanal blokerleride benzer etkide bulunmuştur. Aptiganel, YM-90K, selfotel, dextrorphan gibi NMDA reseptör antagonistleriyle yapılan çalışmalarda da hipotansiyon, delirium ve halusinasyon gibi yan etkiler nedeniyle, kullanım kısıtlı olmuştur. GABA agonist klomethiozol, pirasetam, vigabatrin ve glisin site antagonist gavestinel ile yapılan çalışmalarda, iyileştirici etki görülmemiştir. Sodyum kanal blokeri lubeluzol ile yapılan çalışmalarda da iyileştirici etki görülmemiştir. Sadece magnezyumla yapılan çalışmalarda nöral koruyucu etkisi olabileceği düşünülmüştür. Nörotropik faktörler deneysel çalışmalarda enfark volümünü azaltmakla birlikte, bazal fibroblast büyüme faktörleriyle yapılan çalışmalar yan etkiler nedeniyle tamamlanamamıştır. Antienflamatuarlar ve gangliositlerde benzer sonuçlar göstermiştir. Hipotermi çalışmalarında iyi sonuçlar alınmış ancak klinik çalışmalara yansıtılamamıştır (11). İkincil nöral hasara karşı, serbest radikal tutucular ve lipid peroksidasyonu önleyici tedavilerle de halen tatmin edici sonuçlar yoktur. Sonuç olarak hiçbir ajanla ilgili yeterli zaman ve doz çalışmaları tamamlanamamıştır ve akut serebral iskemide herhangi bir ajan, klinik kullanıma hazır halde değildir.

2.5. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ADE) ve İnhibitörleri

Özellikle pulmoner damarlar, endokard, beyinde olmak üzere vasküler endoteliumda bulunan ve çinko atomu içeren bir metalloproteazdır (30). RAS'ı etkileyen ilaçların en önemlileri ADE'yi inhibe ederek Ang II'nin oluşumunu etkileyen ilaçlardır (31). ADE inhibitörleri, yapılarındaki karboksil (-COOH) ve sülfidril (-SH) gruplarıyla, ADE'nin aktif merkezindeki çinko atomuyla reaksiyona girerek etkilerini oluşturlar (32).

ADE'nin diğer önemli bir fonksiyonu; bir plazma kinini olan bradikinin'in C-ucundan iki aminoasit (fenilalanin-arjinin) kopararak onu inaktive eder. Bu nedenle kininaz II diye de adlandırılır. BK'nin enzime affinitesi, Anjiyotensin I(Ang I)'den daha fazladır. ADE inhibitörleri kullanıldığında BK gibi kininlerin seviyesi artmaktadır (33).

Renal kaynaklı renin'in plazmada anjiyotensinojenden oluşturduğu ve doku renin-anjiotensin sisteminin (DRAS) damar çeperinde oluşturduğu inaktif bir prekürsör olan Ang I'in etkin olan Ang II'ye dönüştürülmesi, damar endotelindeki ADE tarafından yapılır. Bu enzimin inhibisyonu güçlü bir vazokonstriktör olan AngII düzeyinde azalmaya neden olurki buda arter ve venüllerde vazodilatasyon ile total periferik damar rezistansının azaltarak kan basıncında düşmeye neden olur. ADE inhibisyonuyla Ang II ye dönüştürülemiyen Ang I vazodilatatör olan anjiyotensin 1-7'ye dönüştürülür. Ayrıca ADE vazodilatatör bir peptid olan BK'nin de yıkımından sorumludur.

ADE inhibitörleri, aktif kısımlarının kimyasal yapılarına göre;

1) Sülfidril grubu içerenler (kaptopril, zofenopril),

2) Karboksil grubu içerenler (enalapril ve diğerleri),

3) Fosforil grubu içerenler (fosinopril ve seranapril) olarak üç grupta sınıflandırılabilirler (34).

ADE inhibitörlerinin, diüretiklere, beta-bloklörlere ve diğer sempatolitik ilaçlara göre, hemodinamik etkilerinin özelliği ve yan etkilerinin daha az oluşu bakımından üstünlükleri vardır. Kalp debisini düşürmezler ve kalp hızında belirgin bir değişim yapmazlar. ADE inhibitörleri; kalp, beyin ve böbrek kan akımını azaltmazlar hatta artırabilirler. Glomerüler filtrasyon hızını azaltmazlar. Kardiyovasküler hemodinamiğin düzenlenmesine katkıda bulunan lokal ve refleks mekanizmaları bozmazlar. Serebral kan akımının otoregülasyonunun alt sınırını daha düşük kan basıncı düzeyine kaydırırlar. Kan basıncının baroreseptör kontrol mekanizmasının duyarlılığını olumlu şekilde ayarlarlar. Bu nedenle bu ilaçların yaptığı kan basıncı düşmesi, taşikardi ve plazma NE düzeyinde artma gibi refleks sempato-adrenal tonus artmasına bağlı semptomlara genellikle neden olmaz. Diyabetik nefropatililerde ve deneysel diyabette gelişen proteinüriyi azaltırlar. Tedavi edilmeyen diyabetlide gelişen glomerüler filtrasyon azalmasının hızını yavaşlatırlar. 2000 yılı başında yayımlanan HOPE (Heart Outcome Prevention Evaluation) çalışmasında koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter öyküsü bulunan 55 yaş üstündeki 3500'den fazla diyabetli hastada 4.5 yıl uygulanan ramipril'in MI riskini ortalama %22, inme riskini %33, kardiyovasküler hastalıktan ölümü %37 ve belirgin nefropati riskini %24 oranında azalttığı bulunmuştur.

Bu ve benzeri çalışmalar incelenen ADE inhibitörlerinin, özellikle diyabetli hastalarda damar-koruyucu ve böbrek koruyucu etkinliği olduğunu göstermektedir (35).

Gruba özel en sık görülen ortak yan etkileri öksürük yapmalarıdır. Öksürük erkeklere oranla kadınlarda daha yüksektir. Bu durum hastaların ilacı bırakmasına da neden olmaktadır. Seyrek görülen, fakat yerine göre ciddi sonuçlara götürebilen önemli bir yan etkisi de anjioödemdir (36).

ADE inhibitörlerinin spesifik etkileri ile ilgili önemli bir kontrendikasyonu, nadir görülen bir durum olan bilateral renal arter stenozudur. Tek böbreklide gelişen renal stenozda ve iki böbrekli fakat bir böbreği stenozlu olan ve diğeri onu gerektiğinde kompanse edemeyecek kadar fonksiyon bozukluğu gösteren hastalarda da kontrendikedirler.

Kaptopril (D-3-merkaptometilpropanolil-1-prolin): Tedaviye ilk giren ADE inhibitörü kaptopril'dir. Oral kullanıldığında hızla absorbe olup antihipertansif etkide bulunur. Yarı ömrü yaklaşık olarak iki saattir. Yarı ömrünün kısalığından dolayı en azından günde iki kez kullanılmalıdır (37).

Karaciğerde 2/3 oranında metabolize edilerek inaktive edilir. Diğer ADE inhibitörleri arasında hipertansif hastalarda insülin sensitivitesini artıran tek ilaç olup, muhtemelen atılımı böbrekler aracılığıyla idrarladır (35, 38). En sık görülen yan etkisi (%10) döküntülerdir. Ayrıca, öksürük, tat duyusu kaybı, hipotansiyon, nötropeni, anjiyoödem, hiperkalemi ve ağır proteinüriye yol açabilirken bu yan etkilerden yapısında bulunan sülfidril grubu sorumlu tutulmaktadır (39, 40).

Ramipril ve Perindopril: Eliminasyon yarı ömrü ve etki süresi onlardan daha uzun olan ilaçlardır. Oral biyoyararlanımı arttırmak için ön-ilac şeklinde yapılmıştır; mide-barsak kanalından absorbe edildikten sonra karaciğerde etkin şekillerine dönüşürler. Etkilerinin uzun oluşundan dolayı genellikle günde tek doz halinde kullanılırlar (41).

2.6. Serebral İskemi ve Glutamat

Beyindeki uyarıcı iletimin %75' inden sorumlu olan glutamat beyindeki en önemli eksitatör nörotransmitter olup; memeli MSS' de sinaptik plastisite, öğrenme ve

bellek fonksiyonlarını da içeren çeşitli fizyolojik olayları düzenlemek gibi önemli rolleri de bulunan bir moleküldür (42).

Kan-beyin engeli, beyni kandan ayırarak beynin hücre dışı ortamının içeriğini kontrol altında tutmaktadır. Beynin damar endotel hücreleri birçok katı parçacığa geçirgen değildir ve aktif taşıma mekanizmaları da çok sınırlıdır. Normal yetişkinlerde sistemik dolaşımda yüksek oranda bulunan glikoz tek enerji kaynağıdır ve kolayca kan-beyin engelini geçebilmektedir. Serumda bulunan glutamat ise merkezi sinir sistemine giremez. Bunun sonucu olarak, merkezi sinir sisteminde bulunan tüm glutamat burada sentezlenmektedir. Nöron ve astrositlerin her ikisi de glukozu glikoliz olayı ile piruvata dönüştürebilmektedir. Sonra piruvattan asetil Co-A elde edilmektedir. Asetil Co-A trikar α -keto glutarat alanin ile transamine edilerek glutamat elde edilmektedir (42).

Glutamaterjik kavşaklarda hücre dışı boşluktan nörotransmitterin geri alınmasında astrositler önemli rol oynamaktadır. Sinaptik vesiküllerde depolanan glutamat, Ca^{+2} bağımlı ekzositoz ile presinaptik terminallerden salınmaktadır. İlk önce, postsinaptik AMPA/ Kainat reseptörlerini aktive ederek ilgili katyon kanallarını açmakta ve uyarıcı bir potansiyele neden olmaktadır. Bu başlangıç depolarizasyonu ile NMDA reseptörlerinde Mg^{+2} un neden olduğu voltaj bağımlı blok kaldırılmakta ve Ca^{+2} un hücre içine girişi ile daha ileri depolarizasyon gerçekleştirilmektedir. Glutamat, reseptörü ile etkileştikten sonra sinaptik aralıktan uzaklaştırılmalıdır, çünkü reseptörün aşırı uyarılması (özellikle de NMDA reseptörünü) nöronal hasara neden olmaktadır. Glutamatın geri alınımı, hücreler arasına difüzyonu, nöron ve astrositlerin zarlarında bulunan taşıyıcı proteinler ile gerçekleştirilmektedir.

Astrositlere alınan glutamat, glutamine dönüştürülerek salınmakta; nöron uçları ve astrositler tarafından geri alınmaktadır. Nöronda glutamin tekrar glutamata çevrilerek nörotransmitterin veziküler havuzu yeniden doldurulmaktadır. Bu döngü glutamat/glutamin mekiği adını almaktadır. Glutamat hücrelere Na^{+} ile birlikte alınır.

Beyin kılcal damarları ile bağlantı kurmuş astrositik son uçlardan alınan glukoz, laktata çevrilerek salınır ve sonuçta ATPye dönüştürülmektedir.

Astrositlerde, sinaptik olarak salınan glutamat nöronal reseptörlerin yanı sıra, astrositlerde bulunan AMPA ve metabotropik reseptörleri aktive etmektedir. Bu

reseptörlerin birlikte aktivasyonu, hücre içi Ca^{+2} artmasına ve ardından astrositlerden glutamat salınmasının neden olmaktadır (42, 43).

Glutamatın hücre içi konsantrasyonu astrositlerde 50 μM iken, glutamaterjik nöronlarda 10 μM dır. Normal glutamaterjik iletimin gerçekleştirilmesi ve eksitotoksisteden korunabilmesi için hücre dışı glutamat konsantrasyonu yaklaşık 1-3 μM düzeyinde tutulmaktadır.

Hücre dışı glutamat miktarındaki artış astroglial hücre şişmesinde son derece önemli bir etkidir. Beyindeki kan dolaşımı ile ilgili olarak gerçekleşen herhangi bir sorunun ardından, bu durumdan etkilenen bölgedeki astrositlerin hücre hacimleri kısa bir süre içinde artar. Hücre dışı ortamın hacminin çok küçük olması nedeniyle astroglial şişme nöroaktif maddelerin miktarında değişimlere neden olmaktadır. Bu değişim ise nöronal fonksiyonu bozmaktadır. Astrositlerin depolarizasyonu hem glutamatın salınmasına hem de hücre dışı boşlukta glutamatın alınma yeteneğinin azalmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda normal olmayan glutamaterjik ileti ve nörotoksiste gelişmektedir. Astrositlerin şişmesi aynı zamanda lezyon bölgesinden glutamatın difüzyonunu da engellemektedir. Hücre hacmindeki artış hasar görmüş dokuda metabolik bozulmayla sonuçlanmakta ve bu durum nöronlara zarar vermektedir. Bunun sonucunda astrositler de hasara uğrayabilir. Glutamat ile astrositlerin şişmesi hücre içinde aminoasitlerin birikimlerine neden olmaktadır. Glutamatın neden olduğu astroglial şişmenin altında yatan mekanizmayı ortaya koymak amacıyla yapılan çok sayıda çalışma mevcuttur. Fakat bunların hiçbiri olayı tam olarak açıklamaya yeterli değildir (42, 43).

Hücre zarında glutamatın taşınması ve hücre hacim değişimleri arasında bir ilişki bulunmaktadır. Glutamatın hücre içine alınması 3 Na^{+} ve 1 H^{+} iyonu ile kotransport şeklindedir ve bir Na^{+} iyonu hücre dışına verilmektedir.

Glutamat taşıyıcıları için genler klonlanmıştır ve 5 alt-tip ayırt edilmiştir. Glutamat/aspartat taşıyıcısı (GLAST=EAAT1), glutamat taşıyıcısı 1 (GLT-1=EAAT2), eksitator aminoasit taşıyıcısı 3 (EAAC1=EAAT3), eksitator aminoasit taşıyıcısı 4 (EAAT4) ve EAAT5. Glutamat taşıyıcılarının uptake inhibitörü threo-beta-benzyloxyaspartate (TBOA) sinaptik aralıkta glutamat artışına yol açarak, NMDA reseptörlerinin aktivasyonu sonucu nörotoksik etki oluşturur fakat gliotoksik değildir.

TBOA, ciddi nekrotik nörodejenerasyona yol açmıştır. Glutamat taşıyıcılarının nekrotik ölüme karşı önemli koruyucu etkileri görülmüştür. Bu etki glutamat reseptör antagonistleri ile bloke edilebilmiştir. İlave olarak TBOA, sıçan hipokampusunda iskemi oluşturmuştur.

GLT1 hipokampus ve serebral kortekste en yüksek düzeyde bulunmakta iken GLAST öncelikle serebellumun moleküler tabakasında bulunmaktadır. Yetişkin beyindeki astrositik zarlarda glutamat taşıyıcılarının oranı yüksektir. Bu durum sinaptik iletiden sonra glutamatın hücre dışı boşluktan alınımında astrositik taşıyıcıların önemli olduğunu düşündürmektedir. Glutamatın uyardığı astroglial şişmenin, glutamat taşıyıcılarının inhibe edilmesi ile kısmen azalıyor olması glutamat taşıyıcıları ile hücre hacminin düzenlenmesi arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Glutamat klerensi ve nörodejenerasyonun engellenmesinde astrositik taşıyıcıların rolünü göstermeye çalışan araştırmalarda, sıçanda GLT1 ve GLAST gliyal taşıyıcılarının azalmasının hücre dışı glutamat miktarını yükselttiği ve nörodejenerasyona yol açtığı saptanmıştır (44).

GLT-1'i genetik olarak ortadan kaldırılan farelerde azalmış glutamat taşınımı aktivitesi sonucu nöbetler ve nörotoksositeye yatkınlık gözlenmiştir. Glutamat taşınımı aktivitesinde değişiklikler saptanan hastalıklar arasında ALS (Amyotrofik lateral skleroz), Huntington, Parkinson ve Alzheimer Hastalığı sayılabilir. Glutamat disfonksiyonu patojeneze katkı mı yapıyor yoksa hastalık patolojisinin bir sonucu mu bilinmemektedir. Ama nörodejenerasyonun başlangıcında glutamat taşıyıcı aktivitede değişimler başlar (44).

Merkezi sinir sistemindeki travmatik ya da iskemik hasar sonrası glutamatın nöronlar ve astrositlerden patolojik salınımı söz konusudur. Bu salınım daha yoğun eksitotoksik nöronal dejenerasyona neden olmaktadır. Hücre dışı glutamat miktarının artması, hem iGluR hem de mGluR'lerinin kontrolsüz uyarımı sonucu eksitotoksik kaskadın oluşumuna neden olmaktadır. Bu toksik etkilerin arkasında yatan moleküler mekanizmalar bilinmemekle beraber, hücre içi Ca^{+2} artışının ve Na^{+} un hücre içine girişinin etkisi olduğu düşünülmektedir. Astrositler, beyin dokusunda dış uyaranlara yanıt verebilen, nöronlar ve diğer glial hücrelerle iyon konsantrasyonlarını modüle ederek oluklu bağlantılar (gap junction) yoluyla haberleşebilen hücrelerdir. Bu özellikler astrositlerin sinir sisteminde birçok girdiye yanıt verdiğini düşündürmektedir.

Eksitotoksik değişimler ile astrositler homeostazisi sağlama yeteneğini kaybedebilmekte ve hasarı daha da ileriye götürebilmektedir. Glutamat alınımı, K^+ 'un tamponlanması, substrat üretimi ve serbest radikallerin elimine edilmesi gibi koruyucu görevleri azalmakta veya tersine dönebilmektedir. Sonuçta, hücre içi ATP miktarı azaldığı zaman glutamat alınımı azalmaktadır. İskemi veya anokside beyin ATP miktarının azalması Na^+/K^+ ATPaz pompasının yavaşlamasına ve Na^+ , K^+ gradientlerinin tersine dönmesine neden olmaktadır. Bu değişim, glutamat taşıyıcılarının tersine çalışmasına ve hücre dışında glutamat miktarının artmasına neden olmaktadır. Bu artışın sonucunda hasara bağlı olarak nöron ölümü gerçekleşir.

Astroglial şişme glutamat ve K^+ gibi maddelerle suyun sekonder olarak alınımı nedeniyle oluşmaktadır. Şişme iki olaya neden olmaktadır:

1) Beyin içi basıncın artması ve damar perfüzyonunun azalması; Böylece hücre dışına salınan glutamat miktarı artmaktadır. Glutamat, NMDA reseptörlerini aktive ederek eksitotoksisiteye katılmaktadır.

2) İskemik durumların astroglial Ca^{+2} miktarında artışa neden olması; Hücre içi Ca^{+2} miktarındaki artışa yanıt olarak astrositler glutamat salgılamaktadır. Salınan glutamat komşu nöronları depolarize ederek, NMDA reseptörlerinin fazla uyarılmasına neden olmaktadır. Bu durum astrositlerin nöronal hasardaki fonksiyonlarını göstermektedir (42, 45).

Kültürdeki astrositlerde L-glutamatın toksik etkisi iki safhada gerçekleşir:

1) L-glutamat ve uygulanmasının ardından 4-6 saat içinde mikroskopik olarak gözlenebilen hücre şişmesi; Bu dönemde hücreler morfolojik yapılarını korurlar, fakat çekirdekte değişim söz konusudur. Çekirdekler şişmiştir, çekirdekçikler göze çarpar ve çekirdek zarı belirgindir.

2) Hücre ölümü; Hücre ölümünün morfolojik ya da biyokimyasal işaretleri daha sonra başlamakta (16-18 saat) ve L-glutamat uygulanmasından 24-30 saat sonra hemen hemen tüm hücreler ölmektedir (42, 46).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu ve Cerrahi Tıp Bilimleri Kurulu'ndan araştırmanın bilimsel ve ahlaki konulara uygunluğuna dair gerekli izin alındıktan sonra yapılmıştır.

3.1. Nöron Hücre Kültürü Çalışması

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD bünyesindeki Deneysel Hayvan Laboratuvarından temin edilen 3 adet yenidoğan Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı.

Deney materyali olarak, yenidoğan sıçan (0-2 günlük), steril cam petri kabı (100ml, 2 adet), steril plastik petri kabı (2 adet), %95 etanol, Poly-D- lysine, HBSS (Hanks'ın dengeli tuz solüsyonu), PBS (fosfat buffer solüsyonu), DNase Tip 1 (Deoksiribonükleaz Tip 1), FCS (fetal kalf serumu), Tripsin-EDTA, Tripan mavisi, forseps (büyük, orta açılı), makas (büyük, küçük), glutamat, ADE inhibitörleri (kaptopril, ramipril, perindopril) ve Neurobasal Medium kullanıldı.

Poli D-Lizin, 30000-70000 MW'dur. 0,1mg/ml poli-D-lizin alındı ve deneye başlamadan 24 saat önce fosfat buffer solusyonunda çözüldü (Diaz-Trelles 2000). 24-48li flasklarda hazır kaplama mevcut olduğu için yapılan çalışmalarda Poli D-Lizin kaplamaya gerek kalmadı. Flasklar, laminar flow setinde veya etüvde bir gece süre ile kurumaya bırakıldı (52). Poli D-lizin (25 mg/total), tripsin-EDTA (%0,25'lik 100 ml), Fetal kalf serumu 100 ml şeklinde temin edildi.

HBSS Çözeltisinin Hazırlanışı:

<u>İçeriği:</u>	<u>g/L</u>
Kalsiyum Klorid	0.185
Magnezyum Sülfat	0.097
Potasyum klorid	0.4
Potasyum Fosfat monobazik	0.06
Sodyum Klorid	8.0
Sodyum fosfat dibazik	0.047
D-Glukoz	1.0
Fenol Kırmızısı	0.011

Her bir litrelik su için 9,8 gr toz HBSS kullanıldı. Sigma firmasından temin edilen HBSS’de HCO_3 bulunmadığından, bu çözeltiye 0.35gr HCO_3 eklendi. Solüsyon, 2-8 C°’de karanlıkta bekletildi. Bu solüsyon her kullanımdan önce; pH değişimi, presipitasyon ve parsipitasyonlar, bulanıklaşma, renk değişimi ve infeksiyonlar açısından kontrol edildi. Hücre kültürlerinde önerilen profilaktik antibiyotik kullanımı olan; penisilin 100000 ü/ml, streptomisin 10mg/ml, amfoterisin B 0.025 mg/ml, şeklinde ilk gün flasklara eklenerek kültürler korunmaya çalışıldı.

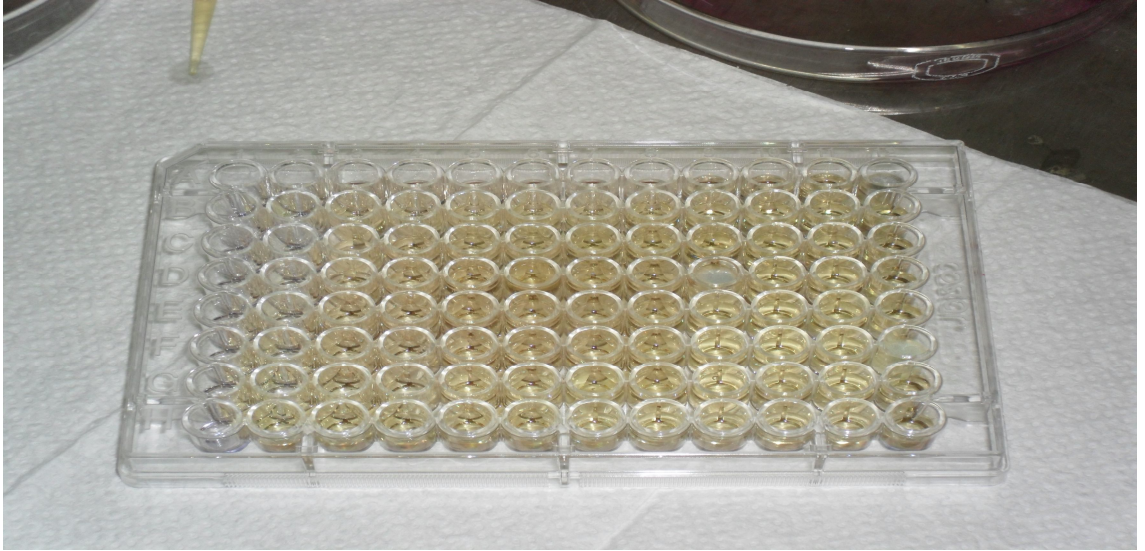
Deneyde kullanılan metod, sıçan serebral korteks dokularına, sıçan gelişiminin erken evrelerinde uygulandı. Tek hücre süspansiyonunun filizlendiği gözlenen kültürlerde, hücreler 5-10 gün yaşarken hücrelerin küçük agregatlarının filizlendiği durumlarda daha uzun ömür elde edildi. Öncelikle, yenidoğan sıçan derisi %95 etanol ile yıkandı. Sonra, 100 ml’lik boş bir plastik petri kabına konularak ve büyük makas kullanılarak dekapite edildi. Diğer yenidoğan hayvanlar için de bu işlem tekrarlandı. Eğimli forsepsle baş tutulurken, deriyi kesmek için küçük makas kullanıldı. Makaslarla Y şeklinde kesim yapıldı ve halen kıkırdak halde olan kafatası kesildi. Beyne zarar verilmeden nazıkçe disseke edildi. Eğilmiş forsepsle bütün kranyal sinirler uzaklaştırıldı. Korteks çıkartıldı.

Daha önce steril petri kabına konmuş olan 5 ml lik HBSS üzerine serebral korteks kondu ve iki bistüri ucu ile makro parçalama yapıldı. Bu bileşim, steril bir enjektöre çekilerek 5 ml HBSS + 2 ml Tripsin-EDTA şeklinde 25-30 dk 37°’de muamele edildi. Bu çözeltiye 8,5-9 mikrolitre DNase tip 1 (120u/ml, Sigma, St Louis, USA) eklenerek 1-2 dakika muamele edildi. 3 dk süre ile 800 RPM’de santrifüje edildi. Süpernatant atıldıktan sonra, mevcut tortuya 31,5 ml NBM 3,5 ml FCS eklendi. Daha önce PBS’de çözündürülmüş poly-D-lysine ile kaplanmış olan 10 flaskın herbirine 3,5 ml gelecek şekilde ekim yapıldı. Flasklar ventil pozisyonunda, 37°C’de %5 CO_2 içeren etüv ortamına bırakıldı. Flasklar üç günde bir, bünyelerindeki hücreler mikroskop altında dallanma gösterip belli bir olgunluğa erişene kadar, hacimlerinin 1/2 oranında taze medyumla değiştirildi (53).

Deneyde kullanılacak olan ilaçlar, mikroskop altındaki sayımdan 16 saat önce flask içine uygulanarak flasklar etüve geri kondu. Kaptopril 10 mikromolar, ramipril 30 mikromolar ve perindoprilat 1 mikromolar dozda verildi; glutamat da bu çalışmada 10^{-6}

ve 10^{-7} M konsantrasyonlarda, iki farklı doz şeklinde kullanıldı. Uygulanan ADE inhibitörleri sonrası yarım saat beklendi ve kültür ortamında bahsedilen dozlarda glutamat ilave edildi. 16 saat beklendikten sonra ölü hücrelerin ayırt edilebilmesi için MTT kiti kullanıldı. 570 nm dalga boyunda Microquant okuyucuda spektral olarak hücre değerlendirilmesi yapıldı.

Plate bölmelerinin kullanımı için hazırlama şablonu yoktur. Tipik bir deney plate'i hücre bulunmayan bölmeler, deneysel bileşik ile muamele edilmiş hücre içeren bölmeler ve deneysel bileşik ile muamele edilmemiş hücreler içermelidir (Şekil 4). Herbir muamele üç kez gerçekleştirildi ve herbir bölme için template içeriği kaydedildi.



Şekil 4. Düzenlenen Plate ve Hazırlanan Çözelti.

Düzenlenen platede oluşturulan gruplar:

1. İlaçsız kontrol
2. 10^{-6} M Glutamat
3. 10^{-7} M Glutamat
4. K1(10 μ M kaptopril)+ 10^{-6} M Glutamat
5. K2(10 μ M kaptopril)+ 10^{-7} M Glutamat
6. K3(10 μ M kaptopril)
7. P1(1 μ M perindopril)+ 10^{-6} M Glutamat

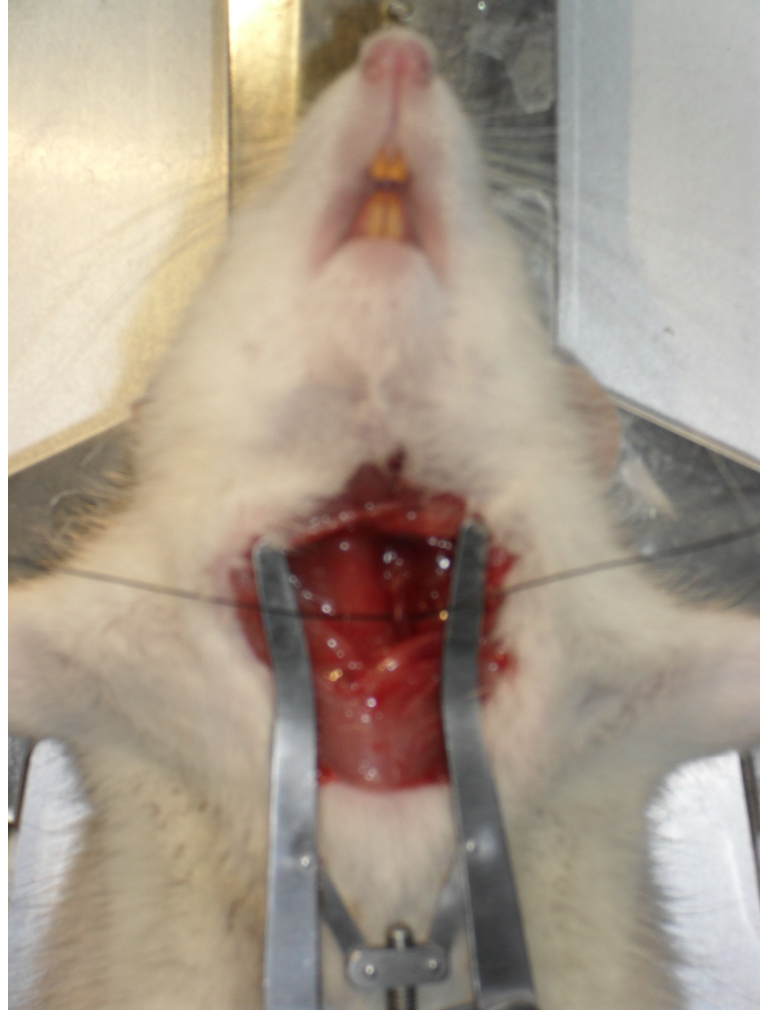
8. P2(1 μ M perindopril)+ 10^{-7} M Glutamat
9. P3(1 μ M perindopril)
10. R1(30 μ M ramipril)+ 10^{-6} M Glutamat
11. R2(30 μ M ramipril)+ 10^{-7} M Glutamat
12. R3(30 μ M ramipril)

3.2. Histopatolojik Çalışma

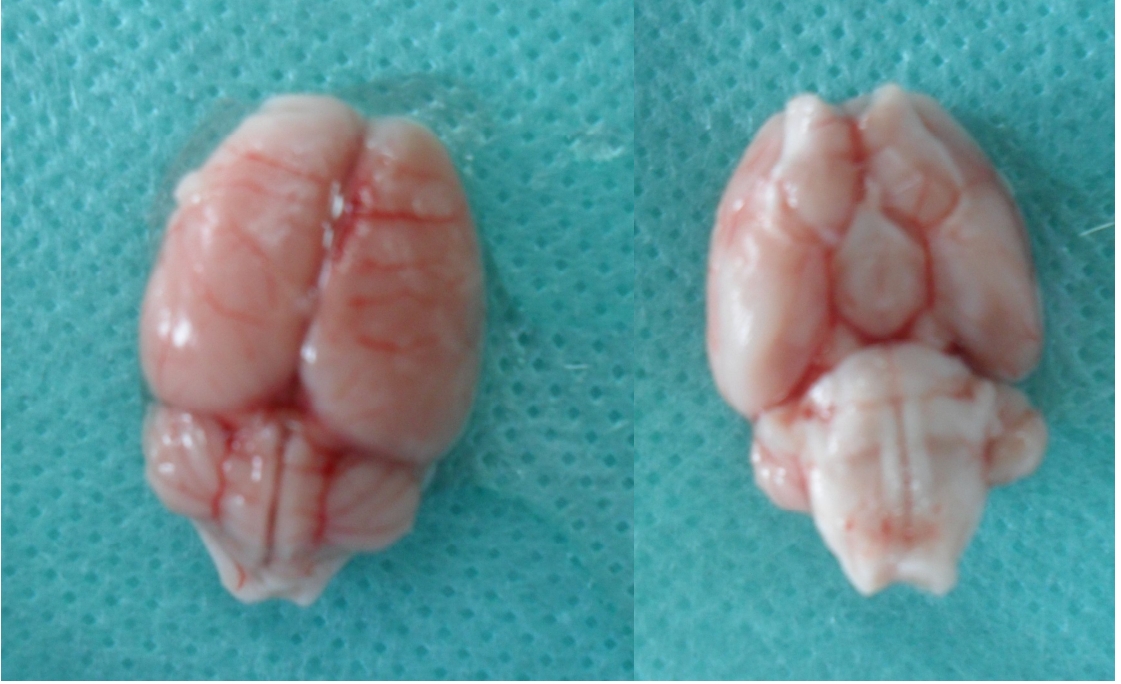
Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ABD bünyesindeki Deneysel Hayvan Laboratuvarından temin edilen ağırlıkları 180-220 gr arasında 30 adet Spraque-Dawley tipi dişi rat kullanıldı.

Hayvanlar deney süresince 7 gün uyku ve uyanıklık döngüsü içerisinde su ve yem alımları serbest bırakılarak, bir ısıtıcı yardımıyla ısıtılan ve oda sıcaklığı 21-24 derece olacak şekilde laboratuvar ortamında kalmaları sağlandı. Tüm hayvanlara, kilolarına uygun dozda ayarlanmış ve intraperitoneal olarak uygulanmış tiopental sodyum (Pental Sodyum, İ.E. Ulagay, İstanbul) ile genel anestezi uygulandı. Supin pozisyonda servikal bölgede %10 Povidone-İodine (Povicon, Dekim, İzmir) ile cilt temizliğini takiben vertikal insizyon yapıldı. Cilt, cilt altı dokusu ve adale geçildikten sonra trakea ve özofagus mediale ekarte edildi. Sol karotid arter vagal sinirden ayrılarak açığa çıkarıldı ve 3:0 ipek sütür ile bağlandı (Şekil 5). Tabakalar kapatılarak işlem sonlandırıldı. Ratlar rastgele 5 gruba ayrıldı. 5 gruba histopatolojik çalışma öncesi lokomotor aktivite deneyleri yapıldı. Birinci gruba kaptopril (Deva, İstanbul, Türkiye) 25 mg/kg/gün i.p, ikinci gruba ramipril (Aventis Pharma, İtalya) 20 mg/kg/gün i.p, üçüncü gruba perindopril (Servier, İstanbul, Türkiye) 5 mg/kg/gün i.p, dördüncü gruba serum fizyolojik 7 gün uygulandı. 5. grupta ratlar kontrol olarak kullanıldı. 7. gün sonunda lokomotor aktivite değerlendirilmesi (opto-varimex davranış testleri) yapıldı. Takiben uygun doz tiyopental ile anestetize edilen ratların beyinleri çıkarıldı (Şekil 6). Beyinler önceden hazırlanmış ayrı kavanozlarda her örnek için 10 kat miktarda ayarlanmış %10'luk formaldehit içerisinde fiksasyon amacıyla 5 gün bekletildi. Alınan örnekler çalışmadan haberi olmayan bir patolog tarafından değerlendirildi. Gross beyin spesimenlerinin herbirinden üç adet 2mm'lik koronal kesitler alındı ve ayrı ayrı isimlendirilip parafin bloklara gömüldü. Her bir bloktan değerlendirmeyi kolaylaştırmak

amacıyla en az 3 kesit alınarak preperatlar hematoksin-eozin ile boyandı. Preperatlarda, serebral iskemi sonrası serebral korteks bölgelerinde oluşan nöronal hasar incelendi. Hasarlanan nöronlarda asidofilik nöronal sitoplazma, piknoz ve karyoreksis ile (“kırmızı nöron”) karakterize histomorfolojik görünüm izlendi. Hasarlanma değerlendirilirken, ışık mikroskopunda 5 farklı alanda hasarlı nöronlar sayıldı. Bu alanlardaki sağlam nöronlara oranı belirlendi. Preperatlar Sony DXC-390P marka kamera ataçmanlı ışık mikroskopi altında incelenerek fotoğraflar çekildi.



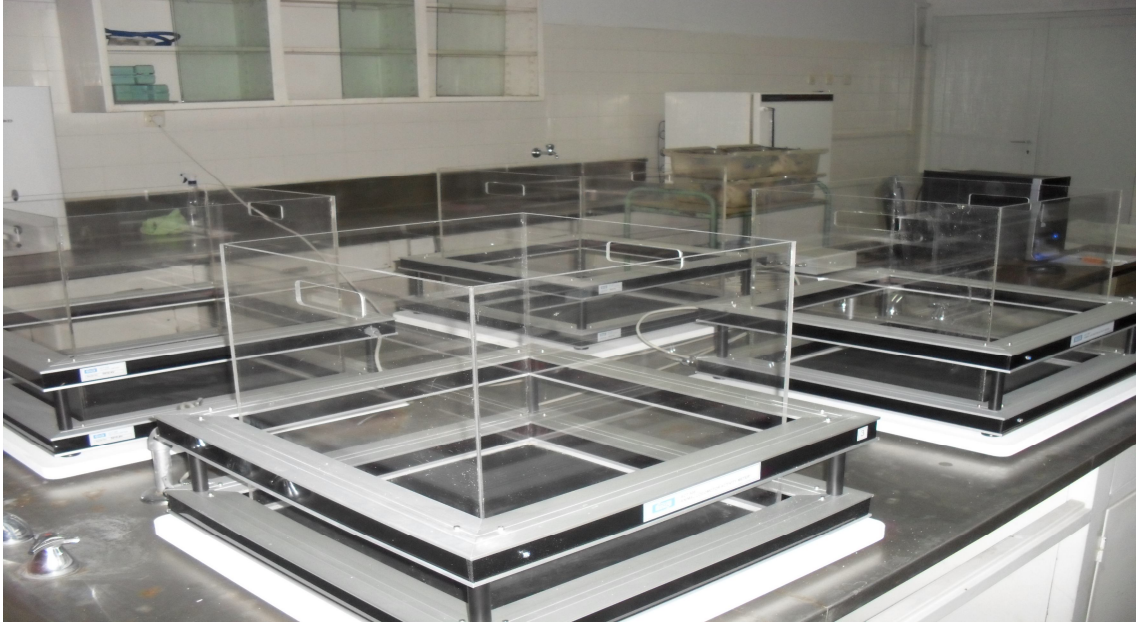
Şekil 5. Kommon Karotid Arterin Ligatüre Edilmesi.



Şekil 6. Serebral İskemi Sonrası Çıkarılan Beynin Makroskopik Görünümü.

3.3. Lokomotor Aktivite Değerlendirilmesi

Lokomotor aktivite cihazı ile yapıldı (MAY ACT508 IR LOCOMOTOR ACTIVITY METER). Horizontal, vertikal ve ambulator aktivite toplamı total aktivite olarak kaydedildi (54, 55) (Şekil 7).



Şekil 7. Lokomotor Aktivite Cihazı (MAY ACT508 IR LOCOMOTOR ACTIVITY METER)

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz için Windows uyumlu SPSS (versiyon 13.0) programı kullanıldı. Zedelenme skoruması, MTT canlılık testine göre canlılık ortalama değeri ve davranış testleri ile elde edilen sayısal sonuçlar Oneway ANOVA testi ile değerlendirildi. Gruplar arası ilişkide $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Nöron Kültürü Sonuçları

Yenidoğan sıçan korteks kültürleri glutamata maruz kaldığında kontrol grupları ve glutamat uygulanan gruplar arasında canlılık açısından farklılıklar olduğu gözlemlendi. Canlı hücre ortalamaları kontrol grubunda $0,47 \pm 0,06$ iken 10^{-7} M glutamata maruz kalan grupta $0,37 \pm 0,03$, 10^{-6} M glutamata maruz bırakılan grupta $0,37 \pm 0,01$ idi. 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamata karşı kaptopril $10 \mu\text{M}$, perindopril $1 \mu\text{M}$ ve ramipril $30 \mu\text{M}$ dozlarında kullanıldı. 10^{-6} M glutamata karşı canlılık ortalama değeri ramipril için $0,52 \pm 0,06$ ve perindopril için $0,48 \pm 0,07$ olarak test edilerek toksisiteyi geri çevirdi ($p < 0,05$). Kontrole göre kaptopril, perindopril ve ramiprilin tek başına kullanımı durumunda nöron koruyucu etkisi istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi (Tablo 1) ($p < 0,05$). 10^{-7} M glutamata karşı yukarıdaki dozlardaki kaptopril, perindopril ve ramiprilin nöroprotektif özelliği istatistiksel olarak anlamlı değildi. 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamate dozu nörotoksik olduğu gözlemlendi. 10^{-6} M glutamat konsantrasyonu en toksik doz olarak tespit edildi. En toksik doz olan 10^{-6} M glutamat konsantrasyonunda ramipril $30 \mu\text{M}$ ve perindoprilat $1 \mu\text{M}$ dozlarında en etkili bulundu ayrıca istatistiksel anlam tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. L-glutamatın 10^{-6} M ve 10^{-7} M Konsantrasyonundaki Dozuna Karşı ve Kaptopril, Perindopril, Ramipril Verilmesini Takiben MTT Canlılık Testine Göre Oluşan Canlılık Ortalama Değerleri.

	n (Kullanılan sıçan sayıları)	Canlı Hücre Ortalamaları	Kontrole göre p değeri
KONTROL	N=21	$0,47 \pm 0,06$	
10^{-6} Glutamat	N=4	$0,37 \pm 0,01$	0.032*
10^{-7} Glutamat	N=5	$0,37 \pm 0,03$	0.016*
10^{-6} Glutamat + $10 \mu\text{M}$ kaptopril	N=5	$0,47 \pm 0,11$	0.86
10^{-7} Glutamat + $10 \mu\text{M}$ kaptopril	N=5	$0,45 \pm 0,09$	0.67
$10 \mu\text{M}$ kaptopril	N=5	$0,59 \pm 0,16$	0.004*
10^{-6} Glutamat + $1 \mu\text{M}$ perindopril	N=6	$0,48 \pm 0,07$	0.74
10^{-7} Glutamat + $1 \mu\text{M}$ perindopril	N=5	$0,40 \pm 0,03$	0.07
$1 \mu\text{M}$ perindopril	N=5	$0,44 \pm 0,06$	0.48
10^{-6} Glutamat + $30 \mu\text{M}$ ramipril	N=4	$0,52 \pm 0,06$	0.22
10^{-7} Glutamat + $30 \mu\text{M}$ ramipril	N=4	$0,43 \pm 0,11$	0.43
$30 \mu\text{M}$ ramipril	N=4	$0,46 \pm 0,03$	0.77

* kontrol grubuna göre $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

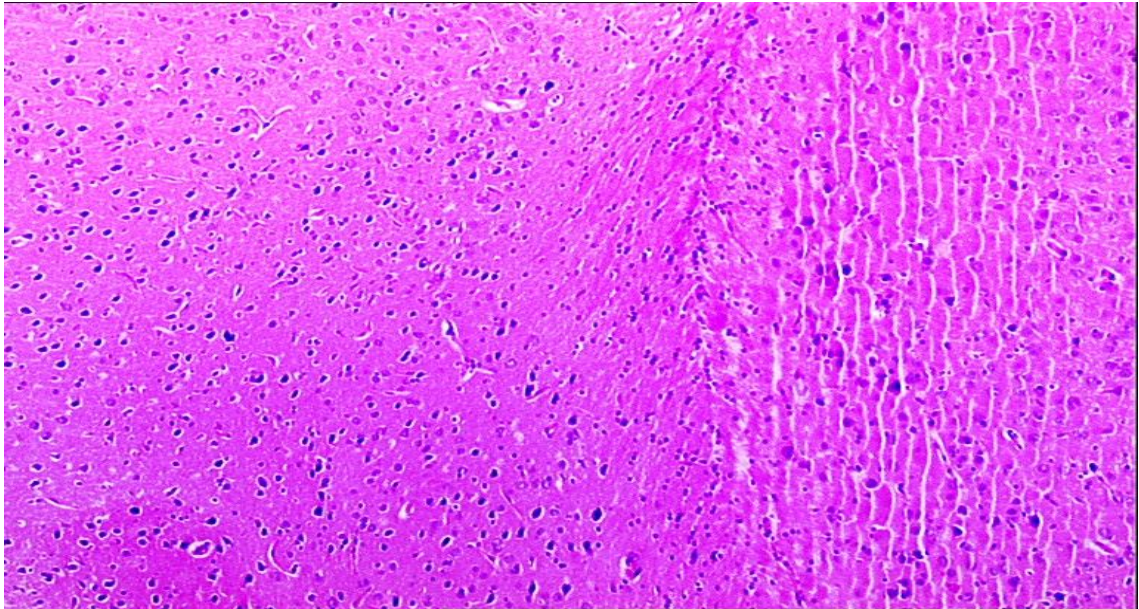
4.2. Histopatolojik Sonuçlar

ACE inhibitörlerinin verildiği gruplarda nöronal hasar serum fizyolojik grubuna göre daha azdı (Tablo 2). Nöron hasarını gösteren kırmızı nöron sayısı perindopril verilen grupta en azdı ($p<0.001$) (Şekil 12). Ramipril ve kaptopril verilen gruplarda ise kırmızı nöron sayısı perindopril verilen gruba göre daha fazla olmakla beraber serum fizyolojik verilen gruba göre belirgin olarak azdı ($p<0.05$), (Şekil 8, 9, 10, 11, 12).

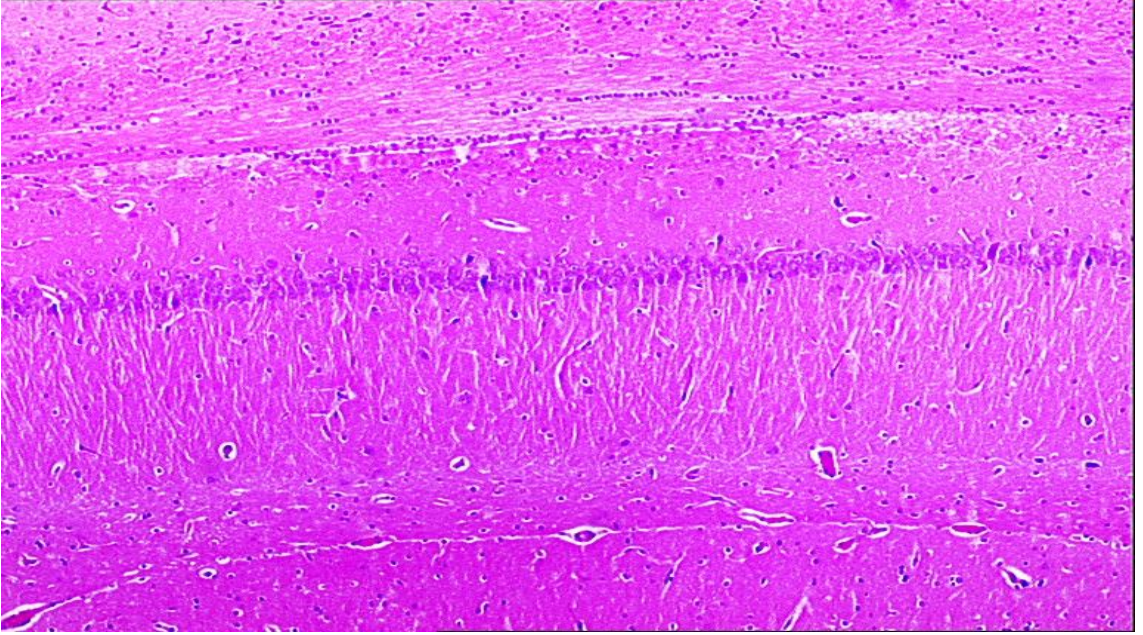
Tablo 2. Histopatolojik Sonuçların İstatiksel Analizi

	N	Ort.±SD	p değeri (Cerrahiye göre)	p değeri (Kontrole göre)
Grup 1	6	1,9±0.3	0,03*	0,0001*
Grup 2	6	1,8±0.5	0,009*	0,0001*
Grup 3	6	1,00±0.0	0,0001*	1
Grup 4	6	2,2±0.41		0,0001*
Grup 5	5	1,00±0.0	0,0001*	

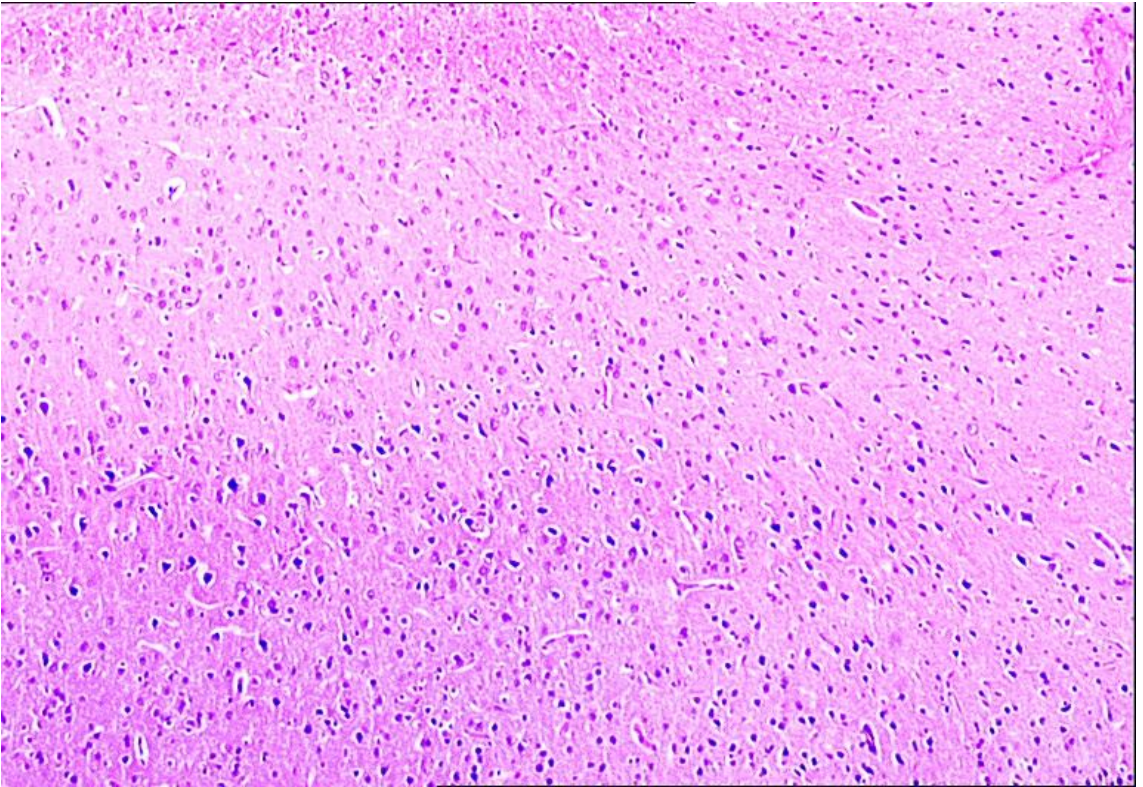
* cerrahi grubuna göre $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir



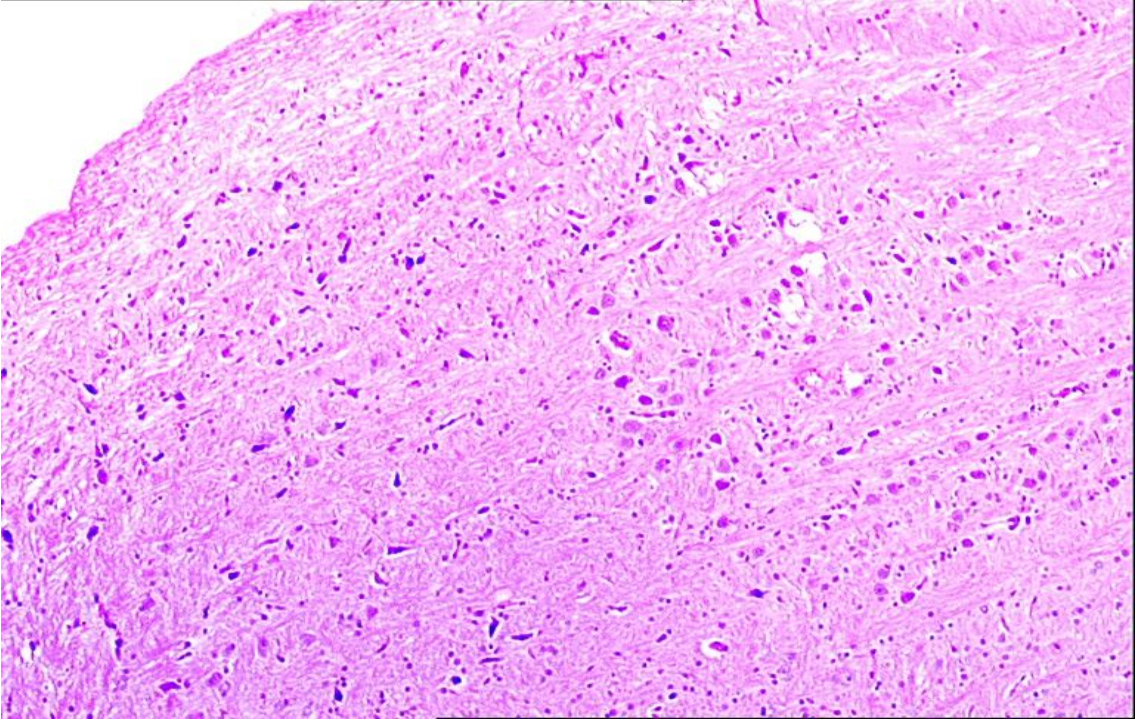
Şekil 8. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan Ve Kaptopril Tedavisi Verilen Gruptan Elde Edilen Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü (HE 4*100).



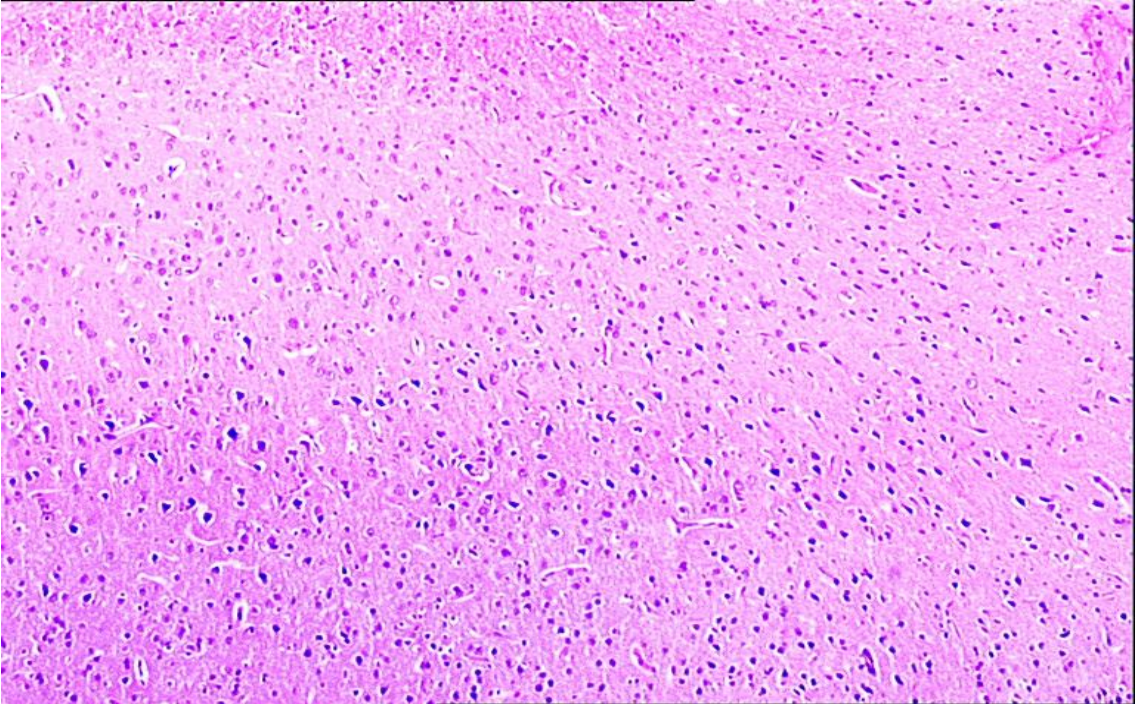
Şekil 9. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan ve Ramipril Tedavisi Verilen Gruptan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü (HE 2.5* 100).



Şekil 10. Unilateral Karotid Ligasyonu Yapılan ve Perindopril Tedavisi Verilen Gruptan Alınan Beyin Korteks Kesitinin Işık Mikroskopi Görünümü (HE 2.5*100).



Şekil 11. Unilateral Karotid Ligasyon Yapılan ve Serum Fizyolojik Verilen Gruptan Alınan Beyin Kortek Kesitinin Işık Mikroskopik Görünümü (HE 2.5*100).



Şekil 12. Kontrol Grubundan Alınan Beyin Kortek Kesitinin Işık Mikroskopik Görünümü (2,5*100 büyütme).

4.3. Davranış Testleri Sonuçlar

Aşağıdaki tablolarda ilaç verilen gruptaki davranış testleri sonuçlarının bazıları her ne kadar istatistiki anlam taşısalarda, ilaç verilen grupların ortalama değerleri kontrol grubuna yakın değildi (Tablo 3-6). Opto-varimex davranış testlerinin sonuçları serebral iskemide ACE inhibitörleri kaptopril, ramipril ve perindoprilin stereotipi, vertikal, ambulator ve horizontal hareket bakımından davranış üzerine etkisi bulunmadığını gösterdi.

Tablo 3. Stereotipi %(yüzde) Sonuçları

	N	Ort. + SD	Kontrole göre p değeri
Kontrol	5	10.8±1.78	
Cerrahi	6	9,8±2.71	0.554
Kaptopril	6	6,2±2.94	0.012*
Ramipril	6	9,1±3.06	0.320
Perindopril	6	7.8±2.48	0.078

Tablo 4. Vertikal Hareket Sonuçları

	N	Ort. + SD	Kontrole göre p değeri
Kontrol	5	69,40±25.53	
Cerrahi	6	59,00±30.77	0.554
Kaptopril	6	24,33±26.71	0.007*
Ramipril	6	21,50±14.57	0.004*
Perindopril	6	44,66±25.41	0.118

Tablo 5. Ambulator Hareket Sonuçları

	N	Ort. + SD	Kontrole göre p değeri
Kontrol	5	1232,40±376.47	
Cerrahi	6	1335,67±379.09	0.993
Kaptopril	6	800,33±399.86	0.421
Ramipril	6	839,00±346.48	0.512
Perindopril	6	1156,00±505.17	0.998

Tablo 6. Horizontal Hareket Sonuçları

	N	Ort. + SD	Kontrole göre p değeri
Kontrol	5	3850,0±1097.4	
Cerrahi	6	3513,0±993.9	0.989
Kaptopril	6	2054,0±1059.9	0.115
Ramipril	6	2195,3±780.8	0.167
Perindopril	6	3257,3±1691.6	0.916

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada, glutamatin çeşitli dozlarının yeni doğan sıçan beyin korteks hücreleri üzerinde oluşturduğu nörotoksik etkileri ve kaptopril, perindopril, ramiprilin bu toksik etkileri geri çevirebilme yeteneği araştırılmıştır. Histopatolojik olarak da desteklenmesi amaçlanmıştır.

ADE inhibitörlerinin farklı gruplarındaki değişik ilaçlarının farklı özellikler gösterebileceği ilkesinden yola çıkarak çalışma yapılmıştır. Bunu yaparken ADE inhibitörlerinin istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarını değerlendirmek için glutamatin nörotoksisite yaptığı konsantrasyonuna karşı bu etki araştırılmıştır (47-51).

Deney sonuçlarımızdan elde ettiğimiz verilere göre yenidoğan sıçan korteks kültürleri glutamata maruz kaldığında kontrol grupları ve glutamat uygulanan gruplar arasında canlılık açısından farklılıklar oluşmuştur. En toksik glutamat dozu 10^{-7} M konsantrasyon olarak gözükmemektedir. 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamatin istatistiksel olarak anlamlı toksisiteye neden olduğu görülmüştür. Bu durumu izah için literatürde de çeşitli yorumlar bulunmaktadır. Bu yorumlardan en güçlüsü glutamat taşıyıcı aktivitedeki değişimlerdir. Sinaptik aralıktaki glutamat düzey değişimleri glutamat taşıyıcı aktivitenin hangi konsantrasyondan sonra tetikleneceğini ve hangi aktivitede çalışacağını belirleyen en önemli faktördür.

Merkezi Sinir Sisteminde glutamat seviyeleri, glutamat salınımı ve geri alınımı arasında dengelenir. Bazal hücre dışı glutamat nöron hücrelerinden salınım ve astrosit ve nöronlarca geri alınımıyla sürdürülür. Eksojen glutamat alım ve geri alım mekanizmaları ile uzaklaştırılır. Bu olay glutamat toksisitesinde önemli bir rol oynar.

Araquae ve ark. (56) 1998'de astrosit stimülasyonunun astrosit ve nöron kültürü içeren karma kültürlerdeki presinaptik metabotropik glutamat reseptörlerinin seçici aktivasyonu ile eksitator ve inhibitör iletimi azalttığını göstermiştir. Biz de bu çalışma neticesinde glutamat konsantrasyonunun bir eşik değerini geçtiğinde astrositik glutamat taşıyıcılarının aktiflendiğini ve fizyolojik nöron iletimi için temel olan hücre dışı glutamat konsantrasyonunun azaldığını düşünmekteyiz. Astrosit fonksiyonlarındaki hasar beyin yaralanma fizyopatolojisinde önemli bir rol oynar. Takasaki ve ark. (57)

beyindeki yaralanma bölgesinde glutamat seviyelerinin 10^{-4} M seviyelerine çıktığını görmüştür. Fakat yaralanan bölgenin 3 mm uzağında glutamat değerleri, 10^{-5} M in altında bulunmuştur. Ve glutamat düzeylerindeki normale dönüş 200 dakika alırken, 3 mm uzaktaki bölgede glutamat seviyeleri 25 dakikada geriye dönmüştür. Hasarlı bölgede glutamatın uzaklaştırılmasının uzun sürmesi ve seviyelerin daha yüksek seyretmesi nörotoksisite oranını artırmıştır.

Sistin glutatyon sentezi için gerekli bir aminoasittir ve hücre dışı glutamat ile seviyesi azalır. Glutamat-sistin antiporterleri sistini hücre içerisine ve glutamatı hücre dışına taşır. Glutamat-sistin antiporterleri astrosit ve meninjiyal hücreler gibi non-nöronal hücrelerden glutamat atılımını artırarak, nöroproteksiyon sağlar (56).

Astrosit içeren nöron kültürlerinde glutamatın daha az toksik olduğu gösterilmiştir. Sagara ve Schubert 10^{-4} M konsantrasyondaki glutamatın, nöron hücre kültürlerinde sistin geri alımını tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir (58). Bu konsantrasyon felç ve travmadaki hücre dışı glutamat seviyelerinden daha düşüktür. Bizim çalışmamızdaki toksisite sistindeki azalmadan kaynaklanmamaktadır. Çünkü 10^{-4} M'ın altındaki glutamat konsantrasyonlarında (10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamat dozlarında) toksisite gözlemledik. Sagara ve bizim çalışmamız arasında herhangi bir zıtlık yoktur; çünkü Sagara' nın çalışmasında astrosit yoktur ve sinaptik aralıkta astrositlere bağlı bir glutamat alımı söz konusu değildir. Ayrıca Sagara, çalışmalarında en toksik glutamat doz olarak 10^{-4} M glutamatı göstermiş ve sistin geri alımının azalışını göstermişlerdir. Bu açıklamalara göre bizim çalışmamızda glutamat toksisitesine sistinin etkisi yoktur. Çünkü bizim kültürlerimiz ko-kültürdür ve astrosit hücreleri içermektedir.

İki ayrı yolak glutamatın oluşturduğu nörotoksisite için bildirilmiştir. Bunlar eksitotoksik yolak ve oksidatif yolaktır. Eksitotoksik yolak, glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna ve sonuçta hızlı ve yavaş sitotoksik olayların her ikisinin de tetiklenmesine yol açar.

Eksitotoksik yolaktaki hızlı etkiler, N-metil-D-Aspartat Reseptörünün (NMDAR) aktivasyonu sonrası zararlı olan Ca^{+2} elementinin yüksek konsantrasyonda hücre içine girişine yol açar. Yavaş etkiler ise daha çok metabotropik glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişir.

Oksidatif yolak, glutamat-sistin antiport sistemini bozar, glutatyon seviyelerini azaltır ve nörotoksik olan aşırı reaktif oksijen oluşumuna yol açar.

Hücre içi Ca^{+2} un aşırı miktarları nöronal disfonksiyon ve hücre ölümüne yol açabilir. Nöronal Ca^{+2} artışı ATPaz, fosfolipazlar, proteazlar, endonukleazlar gibi birçok enzimi aktive edebilir. Bu enzimlerin aktivitesindeki artış geri dönüşümsüz nöronal hasara yol açar.

Glutamat reseptör aktivasyonu sonrası gelişen kalsiyum artışı; protein kinaz, fosfolipaz, NO sentezi, mitokondriyal fonksiyon bozulması ve serbest radikal oluşumuna yol açar. Kalsiyumun artışı, bu sayılan öldürücü süreçlerin birini veya birkaçını aktive edebilir. Bazı araştırmacılara göre serbest kalsiyum artışı, membran bütünlüğünün bozulması sonrası gelişen bir olaydır ve oksidanların indüklediği hücre ölümüne katkısı yoktur. Fakat diğer bir görüşe göre hücre içi kalsiyum seviyelerindeki erken yükselmenin oksidatif stresi oluşturduğu, mitokondrilere zarar verdiği ve kalsiyum bağımlı sindirici enzimleri aktiflediği, mitokondri ve iskeleti hasara uğrattığı ve sonuçta oksidanların indüklediği hücre ölümlerinde merkezi bir rol oynadığı savunulmuştur.

Endoplazmik retikulum (ER) kalsiyumun hücre içindeki major depo yeridir ve hücrel kalsiyum homeostazisini sağlar. Oksidanlar, sulfidril aktif ajanlar ve serbest radikaller kalsiyum-ATPazı inhibe eder. ER'den kalsiyum salar. Bu durum ER kalsiyumunun oksidan toksisitesinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Serbest oksijen radikalleri; süperoksid dismutaz enzimlerinin, katalazın ve glutatyon peroksidazın sıkı kontrolü altındadır. Buna rağmen serbest radikal oluşumundaki artış ve antioksidan savunmadaki azalma oksidatif stresin oluşmasına neden olur. Serbest radikallerin ana üreticisi mitokondridir. Oksijen radikalleri hücre, doku ve organ hasarı oluşumuna katkı yaparlar. Serbest oksijen radikalleri glutamat geri alım inhibisyonu yapabilir. Ayrıca NMDA reseptör aktivasyonu yaparak, süperoksit salınımına, hücre içi kalsiyum artışına ve NO oluşumuna yol açabilir. ADE inhibitörlerinde antioksidan etki oluşturduğu düşünülmektedir (44).

Akut eksitotoksitenin postsinaptik membranın aşırı depolarizasyonu sonucu geliştiğini savunanlar vardır. Bu durumda Cl^- un hücre içine girişine sinirin eksitotoksiteye akut cevabı olarak bakılmaktadır. Bu girişin katyon bağımlı Cl^-

transport protein $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-Cl}^-$ kotransporter izoform-1 (NKCC1) yoluyla olduğu düşünülmektedir. NKCC1 serebral iskemideki iyon homeostazisinin bozulmasında rol oynar.

NMDA ve KA reseptör aktivasyonunun serebellar parçalarda argininden NO sentezini indüklediği gösterilmiştir. NO serebral iskemide ikili rol oynar; nöroproteksiyon ve nörotoksisite. Nörotoksin olarak NO, glutamat salınımını ve NMDA reseptörlerin aşırı aktivasyonu ile iskemik eksitotoksik beyin hasarını artırır. Diğer taraftan serebral iskeminin erken basamaklarında iskemik bölgenin kanlanmasını artırır.

Bir nitrik oksit sentaz inhibitörü olan 7-nitroindazolün, NMDA'nın intrastriatal enjeksiyonu ile oluşturulan hasarı azalttığı fakat KA veya AMPA'yla oluşturulan hasara etkisi olmadığı gösterilmiştir. Nitrik oksit bir çok beyin fonksiyonunda (hafıza ve öğrenme gibi) NMDA reseptörünün etkisine eşlik eder.

NO'nin, glutamat nörotoksisitesinde NMDA reseptör kenetli iyon kanallarını kapatarak koruyucu rol oynadığı, fakat NO'nin artan konsantrasyonlarının, oksijen radikal oluşumuyla ilişkili olduğu ve toksik hale gelmeye başladığı, retinal nöron kültürlerinde gösterilmiştir (44).

Ekstraselüler glutamatın, iyonotropik glutamat reseptörleri, metabotropik glutamat reseptörleri uyarımından sonra 3. hedefi glutamat/sistin antiportu Xc-'nin inhibisyonudur. Bu bir çeşit oksidatif stres oluşumuna ve oksidatif glutamat toksisitesi ile hücre ölümüne yol açar. Glutamat/sistin antiportu sistini hücre içine, glutamati hücre dışına taşır. 10^{-4} M'lık ekstraselüler glutamat konsantrasyonunda sistin alımı tamamen durur. Sistin, glutatyon (GSH)'un sentezi için gereklidir. GSH, ekstraselüler glutamat tarafından tüketilirse hücreler bir çeşit programlı hücre ölümüyle ölebilirler. Bu tip hasar antioksidanlarla bariz şekilde azaltılabilir.

Elde edilen bulgulara göre 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye karşı kaptopril 10 μM , perindopril 1 μM ve ramipril 30 μM dozlarında etkili bulunmuş, nörotoksisiteyi azaltmıştır. En toksik doz olan 10^{-7} M glutamat konsantrasyonunda perindopril 1 μM dozlarında en etkili bulunmuştur.

Kaptoprilin tek başına kullanımı durumunda nöron koruyucu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamatın oluşturduğu nörotoksisiteye

karşı yukarıdaki dozlardaki kaptopril, perindopril ve ramiprilin nöroprotektif özelliği istatistiksel olarak anlamlı değildir. Kaptoprilin 10 μ M dozlarında koruyucu bulunması bu konuda yapılmış histopatolojik çalışmalarla ve bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir (59).

Deneysel iskemilerden sonraki beyin doku histopatolojik çalışmaların sonuçları gösteriyor ki; nöroprotektif aktivitede perindopril, kaptoprilden üstündür (60). Bu perindoprilin karaciğerden metabolize olan bir ön ilaç olmasından kaynaklanıyor olabilir. Fakat her şeye rağmen en toksik doz olan 10^{-7} M glutamat konsantrasyonunda perindopril 1 μ M dozlarında en etkilidir ve bizim elde ettiğimiz histopatolojik sonuçlardada perindopril nöroprotektif aktivitede hem kaptopril hemde ramiprilden üstündür.

Bir başka çalışmada; Iwasaki ve ark. (61) bir başka ADE inhibitörü olan temocaprilin neonatal hücre kültür modelinde 10^{-5} M glutamat dozunda motor nöron ölümünün COX-2 nin upregulasyonu ile önlenebileceğini ileri sürmüştür.

Kim ve ark. (49) ramiprilin bilateral karotid ligasyonu yapılarak oluşturulan kronik iskemide serbest radikalleri azaltarak beyin beyaz madde lezyonlarındaki nöroprotektif etkisini göstermiştir. 14 gün ramipril tedavisinin (20mg/kg/gün) beyaz cevher lezyonlarını iyileştirdiğini ve MDA seviyesi ile GSSH/GSH oranlarının kronik iskemili farelerde normal seviyelere döndüğünü tespit etmişlerdir. Yüksek MDA seviyesi ile beyaz cevher lezyonlarının koopere yükseldiğini ve serbest radikallerin progressif oluşumlarının; sağlam nöronlara zarar verdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca glutatyon seviyelerinde azalma saptamışlardır. Glutatyon hem bir esansiyel tripeptid hem de tüm hayvan hücrelerinde tespit edilen bir endojen antioksidandır. Serbest radikallerle tepkimeye girer ve böylece; hidroksiradikallerin superoksidal zararından korumaktadır. Serbest radikallerin aşırı artışından sonraki indirgenmiş glutatyon seviyesi artışı, bunun oksidatif stresle müdehalenin bir kompensatuar sonucu olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir. GSSH/GSH artışı ise bilateral common carotid arter oklüzyonu sonrasındaki, seconder MDA artışında sonucu olabilir. Burada başka mekanizmalar da; nöroprotektif etki gösterip beyaz cevher lezyonlarını bastırıyor olabilir. Proteaz vb. sitotoksik maddelerin salınımını engelliyor, ramiprilin beyin arteriollerindeki vazodilatör etkisini takiben kan akımını artırıyor ve böylece beyaz

cevher lezyonlarının iyileşmesine katkıda bulunuyor olabilir. Ya da ADE inhibitörlerinin hücre apoptosisine faydalı etkileri beyaz cevher lezyonları patojenezisinde rol oynuyor olabilir. Bu bizim yaptığımız ramiprilin histopatolojik nöroprotektif etkileri ile uyushmaktadır. Yani çalışmalar ramiprilin serebrovasküler yetmezlik ve serebral demanstaki tedavi edici etkilerini arttırma amaçlı planlanmalıdır.

Bu sonuçlar bizi kronik hipoperfüzyon sonucu beyaz cevherde serbest radikallerin oluşumuna yönlendirmektedir. Ravati ve ark. (60) enalapril ve moexipril gibi ADE inhibitörlerinin in vivo ve in vitro fokal iskemik yaralanmada serbest radikallerin toksik etkilerine karşı nöroprotektif bir etki ile beyaz cevheri koruduğunu belirtiyor. Farelerdeki kronik serebral hipoperfüzyon; belki de akut iskemik hasarın etkisini kapsamış, akut kısmın üstünü örtmüş olabilir. Bizim invitro olarak yaptığımız hücre kültüründe ve invivo fokal serebral iskemi modeliyle elde ettiğimiz histopatolojik bulgularda ADE inhibitörlerinin bu nöroprotektif etkilerini desteklemektedir.

ADE inhibitörleri rahatlıkla beyinde ve sıklıkla basal ganglionlarda, sirkumventriküler organlarda, hipotalamik nörosensitif nükleusta, hipokampusun dentat girusunda ve serebellumda kullanılmaktadır. Basal ganglionlarda ADE nöronlar ve striatumla birleşir. ADE ayrıca, nöropsikiyatrik problemleri olan postmortem beyinlerde, farklı farklı bölgelerde değişikliklere uğramaktadır. İlginç bir şekilde, yapılan son çalışmalardan birinde, ADE inhibitörü perindoprilin striatal ADE'yi inhibe ettiği ve 2-3 kat dopamin düzeyini arttırdığı ve sıçan striatumunda salındığı bildirilmiştir (62). ADE inhibitörleri kan-beyin bariyerini çok iyi geçer ve santral nörotransmitter seviyesini module edebilir. Ayrıca, ADE inhibitörlerinin santral etkileri dopaminerjik nörotransmisyonu module edebilmektedir. Güncel çalışmalarda, ADE inhibitörü perindoprilin parkinsonlu hastalarda dopamin düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Yine de, ADE inhibisyonu ile nöronal korumanın arasındaki ilişki çok az bilinmektedir. Kurosaki ve ark. (62) perindoprilin dopaminerjik sistem üzerinde methyl-phenyl-tetrahydropyridine (MPTP) kaynaklı serbest radikalleri azaltarak neurodejenaratif hastalıkların tedavisinde etkili olduğunu bildirmiştir.

Horizontal, vertikal, ambulator ve stereotipi aktivitelerine istatistiksel olarak baktığımızda elde ettiğimiz değerler her ne kadar istatistiksel olarak anlam taşıyalarda, tarafımızdan anlamsız olarak değerlendirilmiştir. Çünkü biz bu çalışmada total aktivite

sonuçlarının normal gruba yakın ve aktivitelerinde artma olmasını bekliyorduk. Haliyle serebral iskemide ADE inhibitörlerinin davranış üzerine olumlu etkisi olmadığını söyleyebiliriz

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. 10^{-7} M ve 10^{-6} M glutamate dozu nörotoksik olarak gözükmetedir. En toksik doz olan 10^{-6} M glutamat konsantrasyonunda ramipril 30μ M ve perindoprilat 1μ M dozlarında en etkili bulunmuştur ayrıca istatistiksel anlam tespit edilmiştir.

2. Glutamat toksisitesine sistinin etkisi olmadığı kanaatine varılmıştır.

3. Kaptoprilin tek başına kullanımı durumunda nöron koruyucu etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

4. Nöroprotektif etki bakımından yapılan hem invitro hemde invivo çalışmalarda perindopril, hem kaptopril hemde ramiprilden üstündür.

5. Çalışmalar ADE inhibitörlerinin serebrovasküler yetmezlik ve serebral demanstaki tedavi edici etkilerini arttırma amaçlı planlanmalıdır.

6. Serebral iskemide ADE inhibitörlerinin davranış üzerine olumlu etkisi olmadığını söyleyebiliriz.

7. ACE inhibitörleri subsellüler oksidasyon mekanizmaları üzerinde etkiliyse, endojen antioksidan savunma mekanizmalarını arttırarak, nöronlarda kalsiyum bağımlı sindirici enzimlerin aktivitesini inhibe ederek, serbest radikalleri azaltarak ya da serbest radikal tutucu etki göstererek glutamat nörotoksitesinde nöroprotektif etki oluşturmuş olabilir.

8. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar dikkate alındığında; glutamatın nörotoksiste oluşumunda hangi mekanizmaları ne ölçüde kullandığı ve ADE inhibitörlerinin bunu nasıl önlediğini kesin olarak ortaya koyabilmek için daha ileri araştırmalara gerek olduğu gerçeği ortaya çıkmaktadır.

Destekleyen Kurumlar:

Bu çalışma Tübitak 107S 067 ve Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi No: 2008/126, 2009/307 projeleri tarafından desteklenmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Siesjo BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. J.Neurosurg. 1992; 77: 169-84.
2. Dignagl U, Iadecole C, Moscovitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends. Neurosci. 1999; 22: 391-7.
3. Korfalı E, Kahveci N. Serebral iskeminin patofizyolojisi. İçinde: Aksoy K (ed). Temel Nöroşirurji, Buluş Tasarım ve Matbacılık, 2005: 384-7.
4. Siesjo BK, Katsura K, Zhao Q, et al: Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a speculative synthesis. J.Neurotrauma. 1995; 12: 943-56.
5. Selman WR, Crumrine RC, Ricci AJ, et al: Impairment of metabolic recovery with increasing periods of middle cerebral artery occlusion in rats. Stroke 1990; 21: 467-71.
6. Lin TN, He YY, Wu G, et al: Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. Stroke 1993; 24: 117-21.
7. Opie LH. Angiotensin converting enzyme inhibitors: scientific basis for clinical use. 1994; 1-22.
8. Hirooka K, Shiraga F. Potential role for angiotensin-converting enzyme inhibitors in the treatment of glaucoma. Clin Ophthalmol. 2007; 1: 217-23.
9. Liu X, Lukasova M, Zubakova R, Lewicka S, Hilgenfeldt U: Kallidin-like peptide mediates the cardioprotective effect of the ACE inhibitor captopril against ischaemic reperfusion injury of rat heart. Br J Pharmacol 148: 825-32, 2006
10. Ozer MK, Sahna E, Birincioglu M, Acet A: Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. Pharmacol Res 45: 257-63, 2002
11. Beşkonaklı E. Tıkaçıcı damar hastalıkları ve tedavisi. İçinde: Aksoy K (ed). Temel Nöroşirurji, Buluş Tasarım ve Matbacılık, 2005: 388-96.

12. Brust JCM: Circulation of the brain. In, Principles of neural sciences. Kandell ER, Swards JH, Jessel TM (Eds), Fourth Ed., Newyork, Mc Graw Hill, 2000: 1302-16.
13. Mccullough LD, Beauchamp NB, Wityk R: Recent advances in the diagnosis and treatment of stroke. *Surv ophthalmol* 2001; 45: 317-30.
14. Erbenli A. History and development of neurosurgery in Anatolia. *Turkish neurosurg* 1993; 3: 1-5.
15. Dere F (ed). *Nöroanotomi*, Adana: Nobel, 2000: 32-42.
16. Worth RW. Anotomy and physiology of peripheral nerves. In Wilkins RH, Rengachary SS (eds). *Neurosurgery*, 2nd ed., New York: Mc Graw- Hill, 1996: 3099-104.
17. Siegelbaum SA, Koester J. Ion channels. In Kandell ER (ed). *Principles of Neural Science*, New York: Elsevier, 1991: 66-79.
18. Kirino T, Tamura A, Sano K: Selective vulnerability of the hippocampus to ischemia—reversible and irreversible types of ischemic cell damage. *Prog. Brain Res.* 1985; 63: 39-58.
19. Garcia JH: Experimental ischemic stroke: a review, *Stroke* 1984; 15: 5-14.
20. Back T: Pathophysiology of the ischemic penumbra—revision of a concept. *Cell Mol. Neurobiol.* 18: 621-38.
21. Choi, D. W. Calcium: stil center-stage in hypoxic-ischemic neuronal deth. *Trends Neurosci.* 1995: 18,58-60.
22. Garcia JH, Anderson ML: Physiopathology of cerebral ischemia. *Crit Rev. Neurobiol.* 1989; 4: 303-24.
23. Schmidley JW: Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21: 1086-90.
24. Albers GW, Hart RG, Lutsep HL, ve ark. Supplement to the guidelines for the management of transient ischemic attacks. *Stroke* 1999; 30: 2502-11.
25. Alberts MJ. Diagnosis and treatment of ischemic stroke. *Am J Med.* 1999;106: 2112.

26. Adams HP Jr, Adams RJ, Brott T, ve ark. Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke. *Stroke*. 2003; 34: 1056-83.
27. Biller J, Feinberg WM, Castaldo JE, ve ark. Guidelines for carotid endarterectomy. *Stroke*. 1998; 29: 554-62.
28. Blaser T, Hofmann K, Buerger T, ve ark. Risk of stroke, transient ischemic attack, and vessel occlusion before endarterectomy in patients with symptomatic severe carotid stenosis. *Stroke*. 2002; 33: 1057-62.
29. Lees KR. Does neuroprotection improve stroke outcome? *Lancet*. 1998; 16: 1447-8.
30. Dökmeci İ. Farmakoloji temel kavramlar. Tayf ofset. 2000: 343-53.
31. Sourbrier F, Alhenc-Gelas F, Hubert C, et al. Two putative active centers human angiotensin I converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 9386-90.
32. Ondetti MA, Rubin B, Cushman DW. Design of spesific inhibitors of angiotensin converting enzyme: New class of orally active antihypertensive agents. *Science* 1977; 196: 441-44.
33. Baumgarten CR, Linz WL, Kunkel G, Scholkens BA, Weimer G. Ramiprilat increases bradykinin outflow from isolated hearts of rat. *Br J Pharmacol* 1993;108: 293-5.
34. Roland E. Schmieder. Mechanisms for the Clinical Benefits of Angiotensin II Receptor Blockers *Am J Hypertens* 2005; 18: 720–30.
35. Brown NJ, Vaughan DE. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Circulation* 1998; 97: 1411-20.
36. Iraz M. Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu ve AT1 reseptör blokajının sıçanda miyokardiyal iskemi-reperfüzyon hasarındaki mortalite ve kardiyak markırlara etkisi. Uzmanlık Tezi. 2000.
37. White CM. Pharmacologic, pharmacokinetic, and therapeutic differences among ACE inhibitors. *Pharmacotherapy* 1998; 18: 588-599.
38. David ED, Baker KM. The cardiac renin-angiotensin system conceptual, or a regulator of cardiac function? *Circ Res* 1999; 85: 640-650.

39. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Pharmacology. Fourth edition. Edinburgh London New York Philadelphia Sydney Toronto. 1999: 291.
40. Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology. 7. edition. Appleton & Lange. Stamford. 1998; 170-186.
41. Kayaalp SO(ed). Tıbbi farmakoloji, Ankara: Hacettepe-Taş, 2005: 376-7.
42. Kabadere S. Glutamat toksisitesi oluşturulmuş glioma hücre dizilerinde MgSO₄ ve lazaroid U-83836E' nin hücre yaşam oranına etkisi. Doktora Tezi. Eskişehir; 2002.
43. Nicholls, D., Attwell, D.: The release and uptake of excitatory amino acids, *armacol. Trends. Sci.*, 1990; 11: 462-468.
44. Hacımuftuoğlu, A., Nörotoksisite ve Glutamat İlişkisi, 19. Ulusal Farmakoloji Kongresi, 24-27 Ekim 2007, Trabzon.
45. Chan, P.H., Chu, L. Chen, S.; Effects of MK-801 on glutamate-induced swelling of astrocytes in primary culture, *J. Neurosci. Res.*, 1990; 25: 87-93.
46. Ganong, W.F.: Review of Medical Physiology 19th ed., Appleton & Lange Stanford, Connecticut, (1997).
47. Papazisis G, Kallaras K, Kaiki-Astara A, Pourzitaki C, Tzachanis D, Dagklis T, Kouvelas D. Neuroprotection by lamotrigine in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008; 11: 321-9.
48. Voigt JP, Bramlage P, Fink H. Hypophagic effect of the angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan in rats. *Eur J Pharmacol.* 2007; 14: 131-7.
49. Kim JS, Yun I, Choi YB, Lee KS, Kim YI. Ramipril protects from free radical induced white matter damage in chronic hypoperfusion in the rat. *J Clin Neurosci* 2008; 15: 174-8.
50. Sag C, Yokusoglu M, Cincik M, Ozkan M, Kayir H, Uzun M, Baykal B, Ozogul C, Baysan O, Uzbay IT. The prevention of myocardial ultrastructural changes by perindopril, atenolol and amlodipine in chronic alcohol administered rats. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 142-8.
51. Robert B.Chiasson. Laboratory Anatomy of the White Rat. WM. C Brown Company Publishers, 1978: 53.

52. Gepdiremen A, Düzenli S, Hacimüftüoğlu A, Bulucu D, Süleyman H. The effects of melatonin in glutamate-induced neurotoxicity of rat cerebellar granular cell culture. *Jpn J Pharmacol.* 2000; 84: 467-9.
53. Daikhin, Y., Yudkoff, M., Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia, *J. Nutrition* 2000; 130: 1026-31.
54. Uzbay IT, Erden BF, Tapanyığıt EE, Kayaalp SO. Nitric oxide synthase inhibition attenuates signs of ethanol withdrawal in rats. *Life sciences* 1997; 61: 2197-209.
55. Uzbay IT, Yeşilyurt O, Çelik T, Ergun H, Isimer A. Effect of agmatine on ethanol withdrawal in rats. *Behav. Brain res.* 2000; 107: 153-9.
56. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Glutamate-dependent astrocyte modulation of synaptic transmission between cultured hippocampal neurons. *Eur J Neurosci.* 1998;10: 2129-42.
57. Takasaki C, Okada R, Mitani A, Fukaya M, Yamasaki M, Fujihara Y, Shirakawa T: Glutamate transporters regulate lesion-induced plasticity in the developing somatosensory cortex. *J Neurosci.* 2008; 28: 4995–5006.
58. Ishige K, Schubert D, Sagara Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med.* 2001; 15: 433-46.
59. Werner C, Hoffman WE, Kochs E, Rabito SF, Miletich DJ. Captopril improves neurologic outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1991; 22: 910-4.
60. Ravati A, Junker V, Kouklei M, Ahlemeyer B, Culmsee C, Kriegelstein J. Enalapril and moexipril protect from free radical-induced neuronal damage in vitro and reduce ischemic brain injury in mice and rats. *Eur J Pharmacol* 1999; 373: 21-33.
61. Iwasaki Y, Ichikawa Y, Igarashi O, Ikeda K, Konno S, Aoyagi J, Kinoshita M. Temocapril prevents motor neuron damage and upregulation of cyclooxygenase-II in glutamate-induced neurotoxicity. *Neurol Res.* 2003; 25: 301-4.
62. Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H, Watanabe Y, Imai Y, Itoyama Y, Araki T. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005: 15.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

ANJİOTENSİN DÖNÜŞTÜRÜCÜ ENZİM İNHİBİTÖRLERİNİN SEREBRAL
İSKEMİ SONRASI SIÇAN BEYİN HÜCRELERİNDEKİ NÖROPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr.Süleyman COŞKUN

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi :14.11.2005

Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi :02.05.2011

Uzmanlık Sınavı Tarihi : 02.05.2011

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Gökşin ŞENGÜL

Jüri üyesi : Prof. Dr. Hakan Hadi KADIOĞLU

Jüri üyesi : Prof. Dr. Yusuf TÜZÜN

Jüri üyesi : Prof. Dr. Durkaya ÖREN

Jüri üyesi : Prof. Dr. Hüsnü KÜRŞAD

Jüri üyesi : Yrd. Doç. Dr. Gökşin ŞENGÜL


Prof. Dr. Hakan Hadi KADIOĞLU
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı V.

Mayıs-2011
ERZURUM