



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

**GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ARDKOŞULLAMA UYGULAMASININ LİPİD PEROKSİDASYONU VE
APOPİTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. FARUK ABAŞ

UZMANLIK TEZİ

BURSA - 2007



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

**GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ARDKOŞULLAMA UYGULAMASININ LİPİD PEROKSİDASYONU VE
APOPTOZİS ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Faruk ABAŞ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ender KORFALI

BURSA – 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
SUMMARY.....	ii
GİRİŞ.....	1-4
GEREÇ ve YÖNTEM.....	5-9
BULGULAR.....	10-14
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	15-20
KAYNAKLAR.....	21-25
ÖZGEÇMİŞ.....	26
TEŞEKKÜR.....	27

ÖZET

İskemiye takiben reperfüzyonun erken döneminde kan akımının hızlı ve aralıklı olarak kesintiye uğramasına ardkoşullama denir. Çalışmamızın amacı, geçici fokal serebral iskemi modeli uygulanan sıçanlarda ardkoşullama uygulamasının lipid peroksidasyonu ve apoptozis üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

Geçici fokal serebral iskemi, 32 adet (275±25g) Spraque-Dawley erkek sıçanlarda intraluminal filament yöntemi ile orta serebral arterde geçici oklüzyon (OSAO) oluşturuldu. OSAO doğrulanması ipsilateral parietal kortekste Laser Doppler Flowmetre monitörizasyonu ve takiben nörolojik muayene ile yapıldı. Deney grupları; iskemi ve ardkoşullama grubu olarak planlandı. 120 dakikalık oklüzyonu takiben 24 saat reperfüze edilerek dekapite edildi. İmmunohistokimyasal analiz için antiapoptotik protein olan bcl-2, proapoptotik olan kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax immun boyamaları yapıldı. Lipid peroksidasyonu saptamak içinde her iki hemisferde dokuda malonildialdehit (MDA) seviyeleri saptandı.

Tüm sıçanlarda serebral kan akımı değerlerinde anlamlı düşüş saptandı ($p<0.05$). İskemik hemisferle normal hemisferler arasında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde MDA seviyelerinde artış saptandı ($p<0.05$). Grup içi iskemik hemisfer değerleri normal hemisfer karşılaştırıldığında ardkoşullama yapılan grupta MDA seviyelerinde yüzde değişim açısından %10.81'lik artış saptanırken, iskemi oluşturulan grupta %27.81'lik artış saptandı ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Ardkoşullama grubunda bcl-2 immunohistokimyasal skorlarında iskemi grubu ile karşılaştırıldığında artış saptandı ($p<0.05$). Kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax immun boyamaları açısından gruplar arası istatistiksel farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak ardkoşullamanın, lipid peroksidasyonu ve apoptozis üzerinden etki göstererek serebral iskemiden koruduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Geçici fokal serebral iskemi, ardkoşullama, apoptozis, lipid peroksidasyonu

SUMMARY

Neuroprotective Effects of Postconditioning Through Apoptosis and Lipid Peroxidation in Transient Focal Cerebral Ischemia in Rats

Postconditioning is defined as rapid and transient blood flow interruption in the early phase of reperfusion. In our study, we aimed to investigate the effects of postconditioning on the lipid peroxidation and apoptosis in the rat models of transient focal cerebral ischemia.

Transient focal cerebral ischemia was produced by intraluminal filament method in 32 Sprague-Dawley male rats (275 ± 25 g). Adequacy of MCA occlusion was monitored with Laser Doppler flowmetry over the ipsilateral cortex and tested with post procedural neurological examination. The groups were planned as ischemia and postconditioning. Rats were decapitated after 24 hours reperfusion following 120 minutes occlusion. Immunohistochemical stainings of bcl-2 as antiapoptotic protein, caspase 3, caspase 9 and bax as proapoptotic protein were performed. Determination of the lipid peroxidation of malonyldi-aldehyde (MDA) was measured in both of the cerebral hemispheres.

After MCA occlusion, there was a significant drop in the CBF in all rats ($p<0.05$). In groups, there was significant increase in the MDA levels when normal and ischemic hemispheres were compared ($p<0.05$). When MDA ingroup values of ischemic hemisphere were compared with normal hemisphere (100%); 27.81% and 10.81% increases were found in the ischemia group and the postconditioning group, respectively and this was statistically significant ($p<0.05$). When postconditioning group was compared with ischemia group, there was a statistically significant increase in bcl-2 immunohistochemical scores ($p<0.05$). There was no statistical significant change between groups in terms of caspase 3, caspase 9 and bax immune staining.

As a result, we suggested that postconditioning was effective against cerebral ischemia through lipid peroxidation and apoptosis.

Key Words: Transient focal cerebral ischemia, postconditioning, lipid peroxidation, apoptosis.

GİRİŞ

İnsan serebrumu vücut ağırlığının %2,5'ünü teşkil etmesine rağmen bazal metabolizmasının %25'ine sahiptir ve metabolik hızı diğer türlere göre 3.5 katı daha fazladır (1). Nöral dokuların iskemik harabiyete aşırı hassasiyetleri değişik beyin bölgelerindeki yüksek metabolik hızın sonucudur. Santral nöronların enerji kaynağı olarak tamama yakın glukozu bağımlı olmalarına rağmen glukozun beyinde depolanması çok sınırlıdır. Bununla beraber enerji kaynaklarının kısıtlı olması nöral dokuların iskemiye aşırı duyarlılığının tek nedeni değildir. Normalde bilgi işlemlerinden sorumlu intrinsik hücreden-hücreye ve hücre içi sinyal sistemleri iskemik şartlar altında zararlı olmaya başlarlar. Enerji yetmezliğini hızlandırır, tüm dokularda iskemik hücre ölümüne neden olan serbest radikal yapımını, katabolik enzimlerin aktivasyonunu, membran yetmezliğini, apoptozis ve inflamasyon gibi harabiyete neden olan yolların etkilerini artırırlar (2).

Geçici iskemik olaylarda iki ayrı patofizyolojik olay infarktın gelişmesine katkıda bulunur: *iskemik evrede* infarktın başlaması, *reperfüzyon evresinde* ise infarktın gerilemesi veya artması (reperfüzyon travması). Başlangıç evresinde, serebral kan akımının (SKA) ileri derecede azaldığı bölgelerde oksijen ekstraksiyon fraksiyonunda artma oluşur (3). Deneysel çalışmalar reperfüzyon evresinden penumbral bölgedeki nöral yapıların en az zararla kurtulabilmesinin; SKA'nın azalma süresine ve miktarına, fizyolojisi ve biyokimyası değişen beyin dokusunun canlılığını ne kadar koruyabildiğine bağlı olduğunu göstermektedir (4). Penumbanın iskemiye toleransı sadece perfüzyon bozukluğunun derecesine bağlı olmayıp iskemi süresinin de bir fonksiyonu sonucudur. Bu ilişkinin derecesi ve buna ek olarak iskemik bölgeyi genişleten sekonder mekanizmalar penumbrayı en ağır hasarın olduğu iskemi merkezinden perfüzyonun azaldığı periferdeki vasküler bölgelere kadar uzanmasına neden olan dinamik bir oluşum haline getirir. Bu durum tıkanan arterin tekrar kanalizasyonuna kadar geçen süre ne kadar

kısa ise aynı zamanda rezidüel kan akımını fonksiyonlarını durdurarak sadece yaşamlarını sürdürübilme çabası için kullanan nöral doku kompartmanları için de o kadar faydalıdır. Bu yaşam sürdürübilme çabası "iskemik preconditioning (önkoşullama)" kavramının başlangıç noktası olmuştur (4).

Organizmalar potansiyel olarak tekrar oluşacak darbelere koruyucu mekanizmalarla karşılık verirler. Ağır hipoksik-iskemik stresten saatler veya günler önce öldürücü derecede olmayan hipoksik stres uygulanmasının hücre ölümünü azaltabileceği gösterilmiş ve bu olay 'tolerans' olarak tanımlanmıştır (4). İskemik toleransın insan beyninde de oluşmasının muhtemel olduğu öne sürülmüştür (5). Tolerans gelişimini sağlayan önkoşullama uyaranları: iskemi, hipoksi, hipotermi, hiperbarik oksijenizasyon veya metabolik inhibitörler sonucu oluşabilir (5). Beyin hücreleri, önkoşullama olmaksızın bile, iskemiye cevap olarak savunma sistemlerini harekete geçirerek hücresel hasarı ve ölümü azaltmaya çalışır (6). Pratik olarak nöral travmaya neden olan herhangi bir uyarı, harabiyete neden olabilecek doz eşiğine yakın fakat harabiyete neden olmayacak derecede uygulandığı zaman santral sinir sistemini daha sonraki iskemiye veya travmaya karşı dayanıklılığını arttıran kuvvetli endojen yolları upregüle ederek korur (7).

İskemiye takiben reperfüzyonun erken döneminde kan akımının hızlı ve aralıklı olarak kesintiye uğramasına ise ardkoşullama denir (8). Reaktif O₂ ürünleri ile klasik ligand uyaranlarının, ardkoşullama da uyaran olarak rol oynadığı, K_{ATP} kanalları ve protein kinaz C yolaklarının ise mediatör görevi yaptığı kabul edilmektedir (8). Ön ve ardkoşullamada benzer yolak ve moleküller yer alsalar bile rolleri ve zamanlamaları her iki durumda farklı olmaktadır. Taşkapılıoğlu ve ark., sıçanlarda geçici orta serebral arter oklüzyonu (OSAo) yaparak önkoşullama, ardkoşullama ve ön/ardkoşullamaların ayrı ayrı veya birlikte uygulanmalarının infarkt hacmini azalttığı gösterilmişlerdir (9). Zhao ve ark.'larının çalışmasında da ardkoşullamanın infarkt hacmini azalttığı saptanılmış ve nöron koruyucu etki

mekanizmasının apopitozis ve serbest O₂ radikallerinin salınımının önlenmesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (10).

Nörolojik hastalıkların ortaya çıkışında serbest oksijen radikalleri veya oksidanlar sorumlu tutulmuştur (11). Reperfüzyon sırasında oksijen radikallerinin aşırı üretimini bir sonucu olarak antioksidatif defans mekanizmalarının bozulması, defans mekanizmalarının inaktivasyonuna, antioksidanların tüketimine ve iskemik bölgede yeterince oluşamamasına neden olur (12). Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılarak membran yapısındaki poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur (12). Tüm biyolojik moleküller özellikle de lipidler serbest radikal hasarına açıktırlar. Doymamış yağ asitlerinden zengin hücre membranları serbest radikalleri kolayca tutmaktadırlar (13).

Lipid peroksidasyonun etkileri membran akışkanlığını azaltmak, membranın iki tabakası arasında fosfolipid değişimini kolaylaştırmak, normal olarak spesifik kanallardan geçemeyen maddeler için membran geçirgenliğini azaltmak (K⁺, Ca⁺⁺ v.b.) ve membran proteinlerini hasara uğratmak, reseptörleri, enzimleri ve iyon kanallarını inaktive etmektir (13). Lipid peroksidasyonunun, zarların lipid yapısındaki değişiklikler nedeniyle fonksiyonların bozulması, oluşan serbest radikallerin enzimler ve diğer hücre bileşenlerine etkisi, son ürünler olan aldehitlerin sitotoksik etkileri farklı yollarla hücre hasarına neden oldukları düşünülmektedir. Bununla birlikte aldehit yapısındaki bileşiklerin dayanıklı zarı geçebilme özelliğinde olmaları, lipid peroksidasyonunun hedef organlardaki etkilerinden bu bileşenlerin sorumlu olduğunu düşündürmektedir (14). Peroksidasyonla oluşan malonildialdehit (MDA) membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Böylece deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi interensek membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler, MDA'nın mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilerini açıklar (15).

Serebral iskemik harabiyetin gelişiminde rol oynayan ve nöronal ölümle sonuçlanan patofizyolojik değişikliklerden birisi de *apoptozistir* (16–20). İskemik harabiyeti takiben iskeminin santral bölgesinde nekrotik hücrelere ve penumbra alanda da apoptotik hücrelere rastlanılmaktadır (21). Son yıllarda yapılan çalışmalar programlı hücre ölümü olan *apoptozisin* organizmanın gelişiminin bir parçası olmasına rağmen, strok da dahil olmak üzere değişik patolojik durumlarda hücre ölümüne de katkıda bulunduğunu göstermektedir (22–24). Her ne kadar iskemik beyin harabiyetinin büyük bir kısmının eksitotoksik harabiyet sonucu oluşan nekroza bağlı olduğu düşünülmekte ise de apoptozisin penumbra beyin bölgesinde de gösterilmesi nöronal korunma sağlanması aşamasında dikkatlerin bu sessiz bölge üzerine de yoğunlaşmasına neden olmuştur (25).

Çalışmamızda, intraluminal filament yöntemi ile geçici fokal serebral iskemi yaratılan sıçanlarda serebral kan akımı monitörizasyonu uygulanarak, iskemik ardkoşullamanın apoptozis ve lipid peroksidasyonuna etkisinin araştırılması amaçlandı. Daha önce iskemik ardkoşullamanın serebral infarkt hacmi üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmış olmasına rağmen etki mekanizmasının incelendiği bir çalışma yapılmamıştır (9,10).

GEREÇ ve YÖNTEM

Tüm deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesinin **31.01.2006/1** karar no'lu izni ile onaylanmış ve Lokal Etik Komitenin bilgisi dahilinde gerçekleştirilmiştir.

Geçici fokal serebral iskemi oluşturulması

275±25 gr ağırlıktaki erkek Sprague-Dawley sıçanlar (n:32), deney gününe kadar sıcaklığı 21±1°C olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, 2–3 tanesi bir kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular.

Sıçanlara anestezi indüksiyonu %4 izofluran (Isoflurane, Abbott Labs, Queenborough, İngiltere) ile sağlandı. Devam dozlaması ise %70 N₂O ve %30 O₂ gaz karışımı içerisinde %2 izofluran ve spontan solunumda yüz maskesiyle sürdürüldü. Anestezi derinliği her 15 dakikada bir kuyruktan ağrı verilerek değerlendirildi. Tüm cerrahi uygulamalar mikroskop (Opmi 99, Carl Zeiss, Almanya) altında gerçekleştirildi. Sıçanların deney sürecince vücut sıcaklıkları; sıcaklık kontrollü ped üzerinde, rektal prob (Temperature controller probe, CMA, İsveç) uygulanarak monitörize edildi.

Takiben SKA monitorizasyonu için; sol orta fossaya yüksek hızlı drill (Aesculap Microtron GD 412, Tuttlingen, Almanya) ile burr-hole açılarak Laser Doppler probu (Vasamedics, Blood Perfusion Monitor, Model BPM 433–1, St Paul, MN, ABD) yerleştirildi. 0. dakika ölçümü yapıldıktan ve kaydedildikten sonra OSA oklüzyon işlemine geçildi. OSA oklüzyonu için ventral orta hat boyun insizyonu ile sol karotid arter bifurkasyonu disseke edildi. Geçici fokal serebral iskemi Kawamura ve ark.'nın tanımladığı OSA intraluminal filament yöntemi ile oklüzyonu yapılarak oluşturuldu (26). Arteria karotis kommunis ve internal karotid arterleri komşu vagus sinirinden dikkatlice ayrıldı. Eksternal karotid arter distalinden bağlandı. Oksipital ve pterigopalatin arterler elektrokoagüle edilerek arteria karotis kommunis ve

internal karotid artere klip yerleştirildi. Eksternal karotid artere arteriotomi yapıldı. Arteria karotis kommunis ve arteria karotis eksterna bifurkasyonundan, 17-22mm uzunluğunda ucu silikon ile güçlendirilmiş, 3-0 monofilament naylon sütün (Ethilon, Ethicon Inc., Somerville, NJ, ABD) internal karotid arterin lümeni iğerisinden, OSA'nın ostiumunu kapatana dek yavaşça ilerletildi ve arter bifurkasyon noktasından bağlanarak sütün sabitlendi. Tam oklüzyon gerçekleştirildiğinde SKA monitoründe kan akımında düşüş saptandı. SKA'nın 0. dakika ölçümünden en az %50 kadar azaldığı ölçülenlerde sütün ostiumu kapattığı kabul edildi ve deneye devam edildi. Tüm cerrahi işlemler 15 dakikayı aşmadı. 120 dakikalık oklüzyonu takiben, anestezi altında sütün çıkartılarak reperfüzyon sağlandı. Deney gruplarındaki sıçanlar reperfüzyon süresince su ve besin alma serbestisi sağlanarak kafeslerine bırakıldı. 24. saatte histopatolojik ve biyokimyasal inceleme süreci başlatıldı.

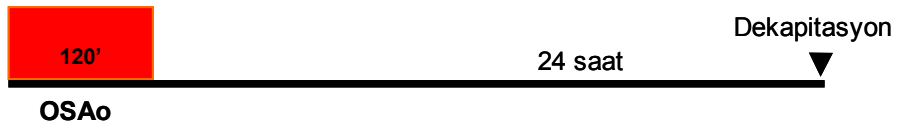
Deney Grupları

Grup 1 (n:16); iskemi grubundaki sıçanlara 120 dakika süre ile OSA oklüzyonu uygulandı. Reperfüzyonun 24. saatinde patolojik inceleme amacıyla 8 adet sıçana derin tiyopental sodyum (Pental Sodyum, I.E.Ulagay, İstanbul) anestezisi altında transkardiyak perfüzyon uygulandı ve takiben sakrifiye edilerek beyinleri süratle çıkarılıp formaldehit solüsyonuna kondu. Diğer 8 adet sıçan da tiyopental sodyum ile feda edilerek beyinleri süratle çıkarıldı ve biyokimyasal analiz için -20°C'de saklandı.

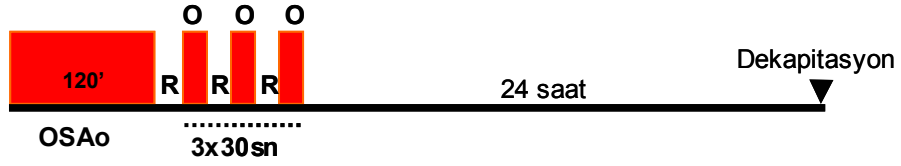
Grup 2 (n:16) ; ardkoşullama grubundaki sıçanlara 120 dakika OSA oklüzyonu uygulandıktan sonra üç kez 30 saniye aralıklarla ve 30 saniye süre ile (ardkoşullama) OSA oklüzyonu uygulandı. Reperfüzyonun 24. saatinde patolojik inceleme amacıyla 8 adet sıçana derin tiyopental sodyum (Pental Sodyum, I.E.Ulagay, İstanbul) anestezisi altında transkardiyak perfüzyon uygulandı ve takiben sakrifiye edilerek beyinleri süratle çıkarılıp formaldehit solüsyonuna kondu. Diğer 8 adet sıçan da tiyopental sodyum ile feda

edilerek beyinleri süratle çıkarıldı ve biyokimyasal analiz için -20°C'de saklandı. Deney akışı Şekil 1'de aktarılmıştır.

İskemi grubu



Ardkoşullama grubu



Şekil 1: Deney akış Őeması

Nörolojik Değerlendirilme

Tüm deney hayvanları cerrahi işlem bitiminden 1 saat sonra nörolojik değerlendirmeye tabi tutuldu. Nörolojik değerlendirme, Bederson ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle yapıldı (27). Bu değerlendirmeye göre; Grade 0: Nörolojik defisit yok; Grade 1: n bacak fleksiyon; Grade 2: dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç; Grade 3: Grade 2' ye ilave olarak dönme hareketinin eklenmesi.

Histopatolojik ve immunohistokimyasal değerlendirme

Sıçanlara reperfüzyonun 24. saatinde derin tiyopental anestezisi uygulanarak transkardiyak %4 paraformaldehid ve 0,1 M fosfat tamponu pH 7,4 ile perfüzyon uygulandı ve takiben sakrifiye edildiler.

Kaspaz 3, Kaspaz 9, Bax Ve Bcl-2 İmmünohistokimyası

Tüm beyinler 0,1M fosfat tamponunda pH 7,4 %4 paraformaldehit solüsyonu ile fikse edildi (28). Aynı fiksatif içerisinde 24 saat süreyle post-fiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon işleminin sonrasında beyinler doku takibi işlemini takiben ksilollerde saydamlaştırılarak parafine gömüldü. Mikrotom ile koronal düzlemde 5 mikrometre kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitlerin alımında koronal beyin düzeyinin belirlenmesinde Paxinos ve Watson'un atlasındaki koordinatlar kullanıldı (29).

Tüm işlemleri takiben parafin bloklama sonrası immunohistokimyasal süreçler için uygulanan yöntem Minami ve ark.'nın çalışması doğrultusunda uygulandı (28).

İmmünohistokimyasal olarak bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), kaspaz 3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD) ve kaspaz 9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD) ile apoptotik süreç değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler: Negatif - : boyanma yok; +: hafif derecede boyanma, ++: orta derecede boyanma, +++: şiddetli boyanma dörtlü skorlamasına göre deney gruplarını bilmeyen nöropatoloji uzmanı tarafından yapıldı.

Biyokimyasal Analiz

Beyin doku MDA seviyeleri tiobarbiturikasit methodu ile nmol MDA / g doku olarak ölçüldü. Doku homojenatı; 0.25 g doku örneği, 2.5 ml'lik %1.15 lik donmuş potasyum klorid ile homojenize edilerek hazırlandı (30). Hazırlanan homojenat lipit peroksidlerinin analizi için kullanıldı.

İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Verilerin analizinde SPSS 13,0 for Windows istatistiksel analiz paket programı (Chicago, IL, ABD) kullanıldı. Sürekli değişkenler $\text{ort} \pm \text{SD}$ ve median değerleri ile birlikte kategorik değişkenler frekans dağılımları ile birlikte verildi. Apoptotik yolakta görevli dört ayrı proteinin immunohistokimyasal olarak boyanma derecelerinin karşılaştırılmasında non-parametrik Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farkı yaratan grup/grupları belirlemek amacıyla non-parametrik Mann-Whitney U testi yapıldı. Bağımlı zaman dilimlerinde gruplar arası karşılaştırmalar yapmak için yüzde değişimden yararlanıldı. Bu sayede gruplar arasında ilgilenilen parametrenin başlangıç baseline değerine göre bir değişim gösterip göstermediğine bakıldı. Biyokimyasal analiz sonucu MDA seviyelerinin değerlendirilmesinde gruplar arası analizde yüzde değişimden yararlanıldı. Grup içi analizde ise Mann-Whitney U testi yapıldı. Çalışmada $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tüm deney gruplarında sıçanların ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 1). Bu sonuç sıçanlar arasında yaş farklılığının olmadığı bir belirtisi olarak kabul edildi.

Tablo I: Tüm deney gruplarının ağırlık değerleri (Ort±SD).

	Grup 1	Grup 2
	n:16	n:16
Ağırlık (g)	277.41±14.14	279.28±13.43

Gruplar arasında sıçanların vücut sıcaklıkları açısından da anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tablo II: Tüm deney gruplarının rektal sıcaklık değerleri (Ort±SD)

	Grup 1	Grup 2
	n:16	n:16
Sıcaklık (°C)	36.95±0.15	36.93±0.11

OSAO yapılan grupların SKA değerleri (Ort±SD), Tablo 3'de verilmiştir. Oklüzyon yapılan sıçanların SKA değerlerinde Grup 1'de 13.40±4.04 (%73.38), Grup 2'de 15.82±4.19 (%78.7) kadar düşme saptandı. Gruplar arasında ise farklılık saptanmadı ($p>0.05$)

Tablo III: OSAo uygulanan grupların 0. ve oklüzyon sonrası serebral kan akımı değerleri ml LD/100g/dak

	Grup 1	Grup 2
	n:16	n:16
0. dakika SKA ölçümü	80.58±33.57	74.25±34.80
OSAo sonrası SKA ölçümü	13.40±4.04*	15.82±4.19*

* p< 0.05

Tüm gruplar arasında Bederson'un nörolojik skorlamasına göre farklılık saptanılmadı (p>0.05). Bu durum OSAo'nun tüm gruplarda oluştuğunun kanıtı olarak kabul edildi (Tablo IV).

Tablo IV: OSAo oluşturulan gruplardaki sıçanların Bederson'un Nörolojik Skorlamasına göre muayene sonuçları (Ort±SD)

	Grup 1	Grup 2
	n:16	n:16
Ortalama skor	2.85±0.23	3.00±0.00

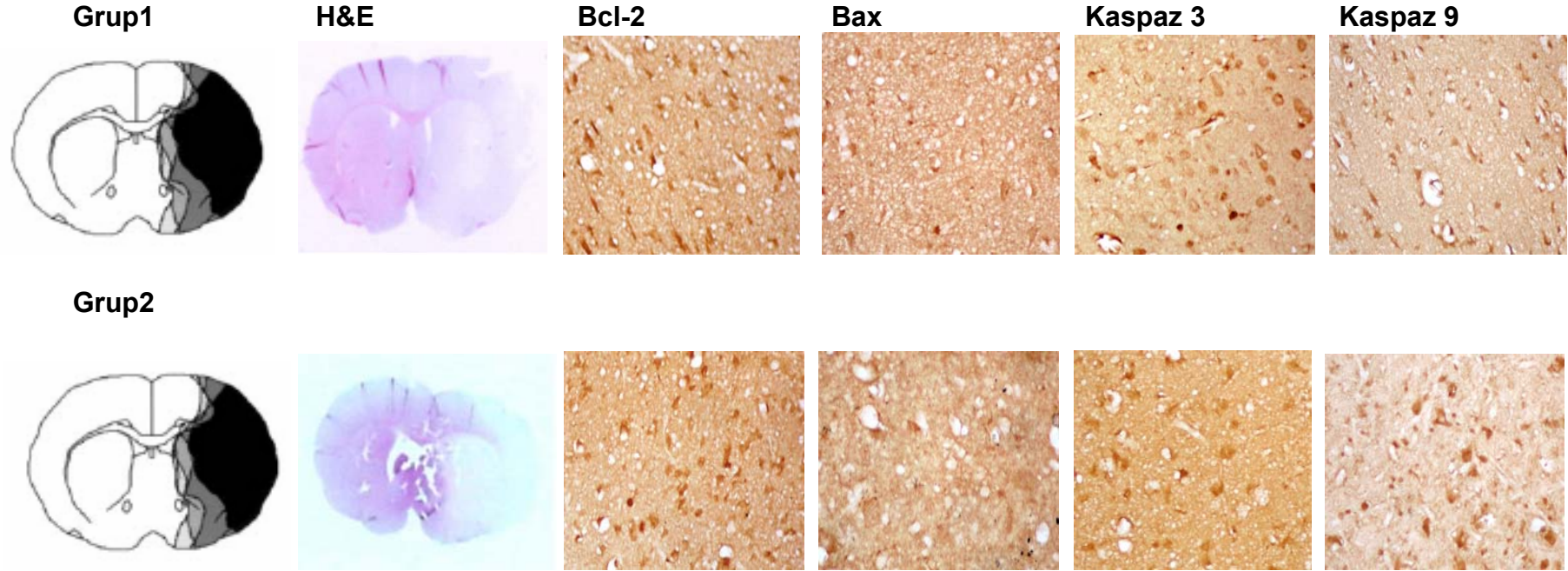
Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan beyin kesitleri Hemotoksilen-Eozin ile boyanarak iskemik nöronlar tespit edildi. Histolojik olarak iskemik nöronlarda nöropil, perisellüler ve perivasküler alanlarda vakuolizasyon olduğu ve hücrelerin süngerimsi görünüm aldığı izlendi (Şekil 2). İskemi sonrası 24. saat incelemelerinde nöronal büzülme, eozinofilik sitoplazma, nükleer kondensasyon ve parçalamış apoptotik piknotik cisimler gibi dejenerasyona ait değişiklikler saptandı.

Gruplar arasında kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax için immünohistokimyasal skorlama ortalamaları bakımından farklılık saptandı. Bcl-2 skorlamasında ise ardkoşullama yapılan grupta istatistiksel olarak anlamlılık saptandı (p<0.05) (Şekil 2). Grupların immünohistokimyasal skorlama sonuçları tablo V'te verilmiştir.

Tablo V: Grupların immünohistokimyasal skorlama sonuçları (Ort±SD)

	Bcl-2	Bax	Kaspaz 3	Kaspaz 9
Grup1	1.50±0.53	0.50±0.53	1.37±0.51	2.00±0.00
Grup2	2.50±0.53*	1.12±0.35	1.60±0.74	1.87±0.64

*p<0.05



Şekil 2: Bcl-2 immunoekspresyonu (nüklear ve sitoplazmik boyanma) ise Grup 2' da iskemi grubuna göre artmış olarak görüldü. Grup 1 ve 2 'da kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax ekspresyonları (sitoplazmik boyanma) açısından anlamlı farklılık izlenmedi [Koronal kesit illüstratif çizimleri Erdö F ve ark.'nın 2004 yılı çalışmasından uyarlanmıştır (31)].

Grupların biyokimyasal analiz sonuçlarında, iskemik hemisferle normal hemisferler arasında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde MDA seviyelerinde artış saptandı ($p<0.05$). (Tablo VI). Grup içi iskemik hemisfer değerleri normal hemisfer değerleri ile karşılaştırıldığında ise ardkoşullama yapılan grupta (Grup 2) MDA seviyelerinde yüzde değişim açısından %10.81'lik artış saptanırken, iskemi uygulanan grupta (Grup 1) ise %27.81'lik artış saptanmış ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo VI).

Tablo VI: Malonildialdehit seviyeleri (nmol MDA / g)

	Sol hemisfer	Sağ hemisfer	Yüzde değişim (%)
Grup 1 n:16	279.75±50.03	203.75±42.56	27.29
Grup 2 n:16	307.50±41.21	272.25±39.15	10.81*

* $p<0.05$

TARTIŞMA ve SONUÇ

Serebral iskemi, kognitif bozukluk ve nöbetleri de içine alan geniş bir nörolojik bozukluk spektrumu içinde hem çocukluk hem de erişkin dönemde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Çeşitli etyolojik nedenlerle SKA azalması veya tam olarak durması sonucu oksijen, ATP ve glukoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlar da dejenerasyonla sonuçlanan olaylar zinciridir (3).

İskemik olay sonrası oluşan hasar, “*core*” olarak adlandırılan santral alan ve “*penumbra*” olarak adlandırılan perifokal alan olmak üzere iki bölümden oluşur. Santral alan ağır iskeminin bulunduğu, kan akımının %10-25’in altına düştüğü sahadır. Bu sahada yetersiz oksijen ve glikozdan dolayı enerji depoları hızla tükenir nöronlarda ve glial hücrelerde nekroz gözlenir ve dakikalar içerisinde geri dönüşümsüz ağır hasar oluşmaktadır (32,33). İskemik penumbra, genel olarak iskeminin olduğu fakat nöronların canlılığını sürdürdüğü sahadır. Penumbradaki hücreler iskemik doku ile normal perfüze olan doku arasında yer alır ve kan akımı normalin %20-50’si kadardır. Bu saha vasküler kollateraller tarafından beslendiği için infarkt sonrası nöronlar saatlerce canlı kalabilir. Erken dönemde reperfüzyon gerçekleşmezse nöronların gereksinimi olan yeterli oksijen ve glukoz sağlanamayacağından bu sahadaki hücreler zaman içinde ölecektir. Penumbra bölgesindeki immunohistokimyasal incelemelerin sonuçları, nöronal korunmada en hassas ve infarktın belirlenmesinde rol oynadığı bilinen penumbral bölgedeki nöronların apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin değerlendirilmesinin sessiz ama hala kurtarılabilecek nöronların olduğunu göstermede önemli olduğunu ortaya koymuştur (33).

Sıçanlarda intraluminal suture ile OSA tıkanması, kalıcı ve geçici fokal serebral iskeminin patofizyolojisini çalışmak için son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu model, Koizumi ve ark.’ları tarafınca

tanımlanmış, daha sonra bunun pek çok modifikasyonu bildirilmiştir (34–36). Global iskemi modellerinin insanlarda fokal iskemiler kadar yaygın olmaması da modelin popüleritesinin diğer bir nedenidir (37). Kolay yapılabilir oluşu, minimum girişimsel işlem gerektirmesi ve intrakraniyal basıncı etkileyebilecek kraniyektomi gerektirmemesi gibi nedenlerle çalışmamızda da bu model tercih edilmiştir.

Orta serebral arter oklüzyonu sonrası, serebral kan akımında tüm gruplarda ilk ölçüm değerinin %50'sinden daha fazla bir düşüş elde edildi ve bu akımdaki azalmanın kanıtı olarak da sıçanların oklüzyon sonrası yapılan nörolojik değerlendirmelerinde belirgin nörolojik defisit oluşumu gözlemlendi. Kan akımı %50' den fazla düşen ve nörolojik skoru iki ve üzerinde olan sıçanlar deneye alındı. Sonuçlarımız yapılan OSA oklüzyonunun tüm sıçanlarda aynı derecelerde oklüzyon yaptığını ve gruplar arasında farklılık olmadığını göstermiştir.

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdaki birçok özelliği açısından çok farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (16,23). Apoptozis hücre içinde çeşitli mediatörler tarafından düzenlenmektedir (23). Bu mediatörler arasında iyonlar kalsiyum bazı moleküller seramid genler proteinler p53, Bcl-2 ailesi, kaspaz yolağı ve hatta bütün bu olayların merkezinde de mitokondri bulunmaktadır. Bcl-2 ailesi üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklerken Bax, Bad, Bid, Bcl-X_S bir kısmı ise apoptozisi baskırlar (16,38,39). Hücrelerin yaşayabilirlik durumu içinde bulunduğu bu proapoptotik/antiapoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır (Bcl-2/Bax). Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunur ve iyon transportunu düzenler (39). Bax ise sitozolde bulunur ve hücrenin apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanarak "pore" oluşumunu indükler. Böylece hücrenin seçici geçirgenliği kaybolur. Bunun sonucunda sitokrom C ve apoptozis-indükleyici faktör AIF 'ün mitokondriden sitozole çıkması sağlanır (16). Takiben apoptozisi

indükleyen Bax ekspresyonu artarak Bcl-2/Bax oranını bax yönünde değiştirir (39).

Kaspaz ailesi, inaktif prekürsör olarak sitoplazmada bulunan bir grup enzimdir ve serebral iskemide aktive oldukları kanıtlanmıştır (40). Geçici fokal serebral iskemide (41,42) ve global serebral iskemide (43,44), özellikle hipokampus, kaudat nükleus ve putamendeki etkilenmiş nöronlarda artmış kaspaz 3 aktivitesi gösterilmiştir. Birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir etkiye neden olurlar. Sonuçta apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olarak hücre ölümünü gerçekleştirirler (16,19,22,23,45,46).

Çalışmamızda Bcl-2 ekspresyonunda ardkoşullama grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptanmıştır. Anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin aşırı ekspresyonu sitokromC salınmasını ve kaspaz 3'ünde aktive olmasını inhibe ederek apoptozisten korur (47). Bu sonuç ardkoşullamanın apoptozisi engelleyerek serebral iskemiden koruyucu etki yaptığını düşündürdü.

Geçici iskemik olaylarda iki ayrı patofizyolojik olay infarktın gelişmesine katkıda bulunur: iskemik evrede infarktın başlaması, reperfüzyon evresinde ise infarktın gerilemesi veya artması (reperfüzyon travması). Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin beyin hücresi, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asidlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur (48). Lipid peroksidasyon ürünleri fosfolipaz aktivitesini stimüle etmektedirler. Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asidleri, oksijen ve metal katalizörler (Fe^{+2} , Cu^{+2}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin

oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur. Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücrel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır (48,49).

Çalışmamızda normal hemisferle iskemik hemisfer arasında her iki grupta da MDA seviyeleri açısından anlamlı düzeyde artış saptandı. Ancak ardkoşullama grubunda MDA seviyelerindeki artış, normal hemisferle kıyaslandığında iskemi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha az saptandı. Serebral iskemide lipid peroksidasyonun ürünü olan MDA, iskeminin şiddetine göre artış göstermektedir. Serteser ve ark. yaptığı çalışmada oklüzyon sonrası 60. dakikada, iskemik kortekste, ipsilateral korteksle karşılaştırıldığında MDA seviyesinde anlamlı olarak artış saptamışlardır (50). Yapılan başka çalışmalarda da lipid peroksidasyonun serebral iskemide katkısı gösterilmiştir (51,52). Çalışmamızda MDA seviyelerinin, iskemi grubunda ardkoşullama grubuna göre anlamlı olarak daha fazla artış göstermesi, ardkoşullamanın serebral iskemide lipid peroksidasyonunu engelleyerek koruyucu etki yaptığını düşündürmektedir.

Ardkoşullamanın modifiye bir reperfüzyon olduğu ve iskemi-reperfüzyon hasarına karşı serebral dokuyu koruduğu bizim ve diğer araştırmacıların yaptığı çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir (9,10). Burda ve ark.'ları sıçanlarda 4 damar oklüzyon modelinde ardkoşullamayı başarıyla uygulamışlar, başka modellerde doğrulanmasını önermişlerdir (53). Biz de çalışmamızda benzer sonuçlara farklı bir modelle ulaştık.

İskemik toleransın oluşumunda en az 3 protein sentez dalgası gereklidir. İlk dalga iskemiden 4 saat sonra ortaya çıkan baskılanmış protein sentezinin toparlandığı ama etkili korumanın sağlanamadığı süreç olup bu sırada, süperoksit dizmutaz (SOD) ve katalaz gibi endojen

antioksidan enzim sentezi gerçekleşir (54). 2 dalga nkoşullamadan 2 gün sonra ortaya çıkar; HSP 72'nin gecikmiş sentezi ile karakterizedir (55). Ardkoşullamayla uyarılan 3. dalga 2. dalgayla birleştiğinde tam tolerans gelişimiyle sonuçlanır. İlk iki dalga sırasında görülen koruyucu protein sentezi, ilk patofizyolojik stresin gen ekspresyonundan protein sentezine geçişi uyarması sonucu olurken ardkoşullama sonrası gerçekleşen protein sentezinin ilk iki sürece ilave olması kuvvetli ve uzun süreli nroproteksiyonu sağlar (53).

Burda ve ark.'ları iskemik önkoşullama niteliğindeki 5 dakikalık iskeminin hipokampüste HSP 72'nin artmış üretimini, Danielisova ve ark.'ları ise iskemiden 5 dakika sonra ve 5 saatlik reperfüzyon sonrası SOD ve katalaz aktivitesinde anlamlı artışı göstermişlerdir (54,55). Burda ve ark.'ları iskemi sonrası artmış endojen antioksidan enzim aktivitesinin hipokampüsün CA1 bölgesindeki nöronları gecikmiş nöronal ölümden korumaya yetmediğini 5 dakikalık iskeminin 2 gün sonra uygulanan 20 dakikalık iskemiyile beraber bu nöronların %95'ini koruduğunu göstermiştir (56). Benzer Şekilde Danielisova ve ark.'ları da ardkoşullama ile iskemiden iki gün sonra CA1 nöronlarındaki hasarın geri döndürülebilir olduğunu göstermiştir (54).

Zhao ve ark.'ları, bilateral kommon karotid arter oklüzyonu uygulayarak yaptıkları çalışmalarında, iskemik ardkoşullamanın fokal serebral iskemi sonrası infarkt hacmini küçülttüğünü saptamışlardır (10). Bu da farklı deneysel iskemi modeli uygulansa dahi ardkoşullamanın serebral reperfüzyon hasarı üzerindeki koruyucu etkisini göstermektedir. Zhao ve ark. iskeminin ciddiyeti ile bağlantılı olarak ardkoşullamanın penumbra da apoptozisi ve serbest radikal üretimi üzerine etki ederek iskemi sonrası infarkt hacmini azaltabileceğini belirtmişlerdir (10). alışmalarında apoptozis için marker sayılan ve DNA fragmantasyonunu gösteren TUNEL yöntemi ve süperoksid radikallerini göstererek ardkoşullamanın koruyucu etki gösterdiğini belirtmiş olmakla beraber bu

koruyucu etkinin mekanizmalarının ortaya konulabilmesi için ek çalışmalara ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Bu güne kadar bu konuda yayınlanmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ise ardkoşullamanın hem apoptozisi engelleyerek hem de lipid peroksidasyonu baskılayarak serebral iskemiden koruduğu gösterilmiştir. Bu özelliği ile çalışmamız bu konuda literatürde yapılan ilk çalışmadır.

Serebral iskemik ardkoşullama tekrarlayıcı strok'da koruyucudur ancak klinik kullanımı sadece iskemi gelişeceği önceden tahmin edilen durumlarda olabilir. Strok sonrası reperfüzyon serebral hasarda kritik bir rol oynar. Nöroşirurji pratiğinde iskemi gelişebileceğinin önceden tahmin edilebildiği durumlar anevrizma operasyonu sırasında geçici klip uygulaması, erken cerrahi sonrası vazospazm gelişmesi, ana damara geçici klip konulması, süperfisiyal temporal arter-orta serebral arter anostomoz operasyonlarında geçici oklüzyon yapıldığında veya strok'da doku plazminojen aktivatörü kullanılmasına bağlı reperfüzyonda sıklıkla görülür. Serebral anevrizma operasyonlarında sıklıkla kullanılan geçici klibin aralıklarla açılıp kapatılarak uygulanacak ardkoşullamanın postoperatif dönemde gelişecek reperfüzyon hasarını azaltabileceği düşünülmüştür.

İskemik ardkoşullama endojen nöral korunma mekanizmalarından sorumlu moleküler mekanizmalara yeni bir bakış açısı getirmekte ve beyin hücrelerinin iskemik travmaya karşı daha dayanıklı hale getirilebilmeleri için yeni stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Cerebral Blood Flow ; the Cerebrospinal Fluid; and Brain Metabolism. In: Textbook of Medical Physiology. 10nd edition. Philadelphia: Saunders Company. 2000. 709–14.
2. Calabresi P, Picconi B, Sualle E, et al. Is pharmacological neuroprotection dependent on reduced glutamate release ? Stroke 2000; 31:766–72.
3. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. J Neurosurg 1992; 77(2):169–84.
4. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. Nat Rev Neurosci 2006; 7(6): 437–48.
5. Kirino T. Ischemic tolerance. J Cereb Blood Flow Metab. 2002; 22:1283-96.
6. Sapolsky RM. Cellular defenses against excitotoxic insults. J Neurochemist 2001;76(6):1601–11.
7. Kitagawa K, Matsumoto M, Kutawabara K, et al. 'ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. Brain Res 1991; 561(2):203–11.
8. Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. Postconditioning: Reduction of reperfusion-induced injury. Cardiovascular Research 2006;1;70(2):200–11.
9. Taşkapılıoğlu Ö: Sıçanlarda iskemik önkoşullamanın ve ardkoşullamanın geçici fokal serebral iskemi modelinde nöron koruyucu etkileri (Uzmanlık Tezi), Bursa: Uludağ Üniversitesi, 2006:1–24.
10. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rat. J Cerebral Blood Flow Metab 2006; 26(9): 1114–22.
11. Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. Brain Pathol 1994;4:59-65.
12. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke 1996;27:1124–29.
13. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarker of tissue damage. Lin Chem 1995;41:1819-25.

14. Fam SS, Morrow JD. The isoprostanes: unique products of arachidonic acid oxidation – a review. *Curr Med Chem* 2003;10:1723-40.
15. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free radical & medici* 2006; 40: 376–87.
16. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(2):267-82.
17. Li Y, Chopp M, Powers C, Jiang N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1997; 765(2):301-12.
18. Li Y, Powers C, Jiang N, Chopp M. Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neurol Sci* 1998; 156(2):119–32.
19. Plesnila N, Zhu C, Culmsee C, Groger M, Moskowitz MA, Blomgren K. Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24(4):458-66.
20. Schmidt-Kastner R, Truettner J, Zhao W, et al. Differential changes of bax, caspase-3 and p21 mRNA expression after transient focal brain ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 79(1-2):88-101.
21. Yu L, Miao H, Hou Y, Zhang B, Guo L. Neuroprotective effect of A20 on TNF-induced postischemic apoptosis. *Neurochem Res* 2006; 31(1):21-32.
22. Plesnila N. Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 2004; 89:15-19.
23. Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74(1):1–20.
24. Korenkov AI, Pahnke J, Frei K, et al. Treatment with nimodipine or mannitol reduces programmed cell death and infarct size following focal cerebral ischemia. *Neurosurg Rev* 2000; 23(3):145-50.
25. Zheng Z, Lee JE, Yenari MA. Stroke: molecular mechanisms and potential targets for treatment. *Curr Mol Med* 2003; 3(4):361-72.
26. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H. Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique. *Acta Neurochir (Wien)* 1991; 109(3-4):126-32.

27. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; 17(3):472–76.
28. Minami M, Jin KL, Li W, Nagayama T, Henshall DC, Simon RP. Bcl-w expression is increased in brain regions affected by focal cerebral ischemia in the rat. *Neurosci Lett* 2000; 279(3):193-95.
29. Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates 2nd edition. California: Academic Press. The rat brain in stereotaxic atlas 1997.
30. Tominaga T, Sato S, Ohnishi J, Ohnishi ST. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: in vivo detection of nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Brain Res* 1993;614:342-6.
31. Erdö F, Trapp T, Mies G, Hossmann KA. Immunohistochemical analysis of protein expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *Acta Neuropathol* 2004; 107:127–36.
32. Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(6):621-38.
33. Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 2003; 34(1):214-23.
34. Koizumi J, Yoshida Y, Nazakawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *JPN J Stroke* 1986; 8:1–8.
35. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989; 20: 84–91.
36. Schmid-Elsaesser R, Zausinger S, Hungerhuber E, Baethmann A, Reulen HJ. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: Evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* 1998; 29: 2162–70.

37. Chauhan N, Zhao Z, Barber PA, Buchan AM. Lessons in experimental ischemia for clinical stroke medicine. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(1):65-71.
38. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem* 2003; 85(4):1026-36.
39. Matsushita K, Matsuyama T, Kitagawa K, Matsumoto M, Yanagihara T, Sugita M. Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. *Neuroscience* 1998; 83(2):439-48.
40. Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M, Secades JJ, Mercadal J, Lozano R. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neuropharmacology* 2002; 42(6):846-54.
41. Chen J, Nagayama T, Jin K, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18(13):4914-28.
42. Namura S, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 1998; 18(10):3659-68.
43. Ni B, Wu X, Su Y, et al. Transient global forebrain ischemia induces a prolonged expression of the caspase-3 mRNA in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(3):248-56.
44. Niwa M, Hara A, Iwai T, et al. Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia. *Neurosci Lett* 2001; 300(2):103-6.
45. Mooney SM, Miller MW. Expression of bcl-2, bax, and caspase-3 in the brain of the developing rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2000; 123(2):103-117.

46. Mouw G, Zechel JL, Zhou Y, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Caspase-9 inhibition after focal cerebral ischemia improves outcome following reversible focal ischemia. *Metab Brain Dis* 2002; 17(3):143–51.
47. Steinberg GK, Panahian N, Sun GH, Maier CM, Kunis D. Cerebral damage caused by interrupted, repeated arterial occlusion versus uninterrupted occlusion in a focal ischemic model. *J Neurosurg* 1994; 81:554-9.
48. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology* 1993; 43:1656-65.
49. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993;364:626-32.
50. Serteser M, Özben T, Gümüslü S, Balkan S, Balkan E. Lipid peroxidation in rat brain during focal cerebral ischemia: prevention of malonildialdeyde and lipid conjugated diene production by a novel antiepileptic, lamotrigine. *Neurotoxicology* 2002; 23:111–19.
51. Block F, Kunkel M, Sontag KH. Posttreatment with EPC-K1, an inhibitor of lipid peroxidation and of PLA2 activity, reduces functional deficits after global ischemia in rats. *Brain Res* 1995;36:257-60.
52. Kato N, Yanaka K, Nagase S, Hirayama A, Nose T. The antioxidant EPC-K1 ameliorates brain injury by inhibiting lipid peroxidation in a rat model of transient ischemia. *Acta Neurochir (Wien)* 2003;145:489-93.
53. Burda J, Danielisová V, Némethová M, et al. Delayed postconditioning initiates additive mechanism necessary for survival of selectively vulnerable neurons after transient ischemia in rat brain. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26 (7-8):1139-49.
54. Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* 2005;30(4):559-65.

55. Burda J, Hrehorovska M, Bonilla LG, et al. Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 2003; 28(8):1213-19.
56. Burda J, Matiasova M, Gottlieb M, et al. Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* 2005;30(11):1397-1405.

ÖZGEÇMİŞ

1975 Kütahya doğumluyum. 1998 yılında Eskişehir Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Temmuz 2001'de Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım.

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmalarım sırasında her tŒrlŒ desteği veren Prof. Dr. E. Korfalı'ya, deneysel modeli Œęrenmeme yardımcı olan ve tezimin her aşamasında desteğini gŒrdŒęŒm Dr. Ő. Taőkapılıoęluna, nŒropatolojik değerlendirmeler sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. ő. Tolunay'a, biyokimyasal çalışmalar için Doç. Dr. E SarandŒl' e, deneylerin yapım ve yazım aşamasında yardımları için Dr. B. GŒren'e, deneysel aőamalarımın gerçekleőmesinde zamanımın bŒyŒk kısmını geçirdiğim Fizyoloji bŒlŒmŒnŒ evim gibi hissetmeme olanak sağlayan Prof. Dr. K. ŐzlŒk ve tŒm Fizyoloji Anabilim dalı çalıőanlarına ve en Œnemlisi çalıőmalarımın her aşamasında beni destekleyen ve cesaretlendiren Doç. Dr. T. Alkan'a teőekkŒr ederim