

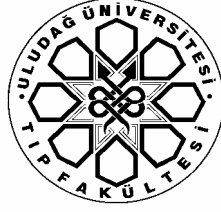
T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ UYGULANAN SIÇANLARDA,  
SİTİKOLİN VE HİPOTERMINİN NÖRONAL APOPİTOZİSDEKİ NÖRON  
KORUYUCU ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Soner ŞAHİN

BURSA – 2006



T.C.  
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI

GEÇİCİ FOKAL SEREBRAL İSKEMİ UYGULANAN SIÇANLARDA,  
SİTİKOLİN VE HİPOTERMINİN NÖRONAL APOPTOZİSDEKİ NÖRON  
KORUYUCU ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Soner ŞAHİN

Danışman: Prof. Dr. Ender KORFALI

BURSA – 2006

## İÇİNDEKİLER

1. TÜRKÇE ÖZET .....	ii-iii
2. İNGİLİZCE ÖZET .....	iv-v
3. GİRİŞ .....	1-4
4. GEREÇ VE YÖNTEM .....	5-10
5. BULGULAR .....	11-17
6. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	18-30
7. KAYNAKLAR .....	31-39
8. TEŞEKKÜR .....	40
9. ÖZGEÇMİŞ .....	41

## ÖZET

Strok ölümlerin ve uzun dönem ağır nörolojik bozuklukların en önemli nedenlerinden biridir ve apoptozis serebral iskemi patolojisinde kritik rol oynar. Çalışmamızın amacı, geçici fokal serebral iskemi reperfüzyon modeli uygulanan sıçanlarda nöronal apoptotik hücre ölümünün engellenmesinde sitikolin'in hafif dereceli hipotermi ile kombine edilmesinin nöron koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır. Erkek SD ( $275 \pm 25$  g) sıçanlarda orta serebral arterde geçici oklüzyon (OSAO) oluşturuldu. OSAO uygunluğu ipsilateral parietal kortekste Laser Doppler Flowmetre monitörizasyonu ve işlem sonrası nörolojik muayene ile doğrulandı. Tüm deney hayvanları (Grup 1, sham hariç) 2 saat oklüzyon ve takiben 24 saat reperfüzyona alındı. Grup 2'ye (Kontrol) %0,9 NaCl, Grup 3'teki normotermik ( $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) deney hayvanlarına Sitikolin (400mg/kg ip), Grup 4'teki hipotermik ( $34 \pm 1^\circ\text{C}$ ) deney hayvanlarına Sitikolin (400mg/kg ip) uygulandı. 24 saat reperfüzyon sonrası transkardiyak perfüzyon uygulandı. Dekapitasyon sonrası beyinler immunohistokimyasal işlemler için hazırlandı. Kesitler H&E ile boyandı ve OSAO sonrası infarkt sınırı lokalize edildi. Komşu alanlarda kesitlerde bcl-2, kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax immun boyamaları yapıldı. Grup 2 bcl-2 immunohistokimyasal skorlarında ( $0,71 \pm 0,75$ ) sırasıyla grup 3 ve grup 4 ile karşılaştırıldığında azalma saptandı ( $2,33 \pm 0,81$ ;  $p < 0,05$ ), ( $2,20 \pm 0,83$ ;  $p < 0,05$ ). Kaspaz 3 proteinleri, grup 2'de ( $2,28 \pm 0,95$ ) grup 4 ( $1,50 \pm 0,83$ ;  $p < 0,05$ ) ile karşılaştırıldığında yüksek ekspresyon gösterdi. Bax proteinleri grup 2'de ( $1,85 \pm 1,06$ ) grup 4 ( $0,40 \pm 0,54$ ;  $p < 0,05$ ) ile karşılaştırıldığında artmış olarak bulundu. Kaspaz 9 immunohistokimyasal skorlarının ortalama değerleri için Grup 2 ( $2,29 \pm 0,96$ ;  $p < 0,05$ ) ve Grup 4 ( $0,20 \pm 0,44$ ;  $p < 0,05$ ); Grup 3 ( $1,00 \pm 0,70$ ;  $p < 0,05$ ) ve Grup 4 ( $0,20 \pm 0,44$ ;  $p < 0,05$ ) karşılaştırılmalarında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi. Sonuçlarımız Sitikolin ve hafif dereceli hipoterminin geçici fokal serebral iskemi sonrası serebral hasarlanmayı iyileştirdiğini kanıtlamaktadır. Bu durum nöronal hasarlanmanın ilerlemesinin hem apoptotik süreçlerin azalması hem de iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının nötralizasyonu ile sınırlandırılabilirliğini akla getirmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Geçici fokal serebral iskemi, apopitozis, sitikolin, hipotermi

## SUMMARY

### NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF CITICOLINE AND HYPOTHERMIA ON NEURONAL APOPTOSIS FOLLOWING TRANSIENT FOCAL CEREBRAL ISCHEMIA IN RATS

Stroke is the leading cause of death and long term morbidity and apoptosis plays a critical role in pathology of cerebral ischemia. The aim of this study is to investigate the neuroprotective effects of a combined therapy with citicoline and mild hypothermia in prevention of neuronal apoptotic cell death following focal cerebral ischemia-reperfusion model in rats. Focal cerebral ischemia was induced in male SD ( $275 \pm 25$  g) rats by transient occlusion of middle cerebral artery (MCA). Adequacy of MCA occlusion was monitored with laser-Doppler flowmetry over the ipsilateral parietal cortex and tested with post procedural neurologic examination. All animals underwent ischemia (except group 1, sham) for two hours, followed by 24 hours of reperfusion. Group 2 (control) received 0,9% NaCl; group 3 received citicoline (400 mg/kg ip) in normothermic ( $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) animals; group 4 received citicoline in mild hypothermic ( $34 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) animals. After the rats were reperfused for 24h transcardiac perfusion was carried out. Following decapitations, brains were prepared for immunohistochemical studies. Sections from each rat were stained with H&E to localize the infarct borders after MCA occlusion. Adjacent sections were stained with bcl-2, caspase 3, 9 and bax immunostaining. Group 2 bcl-2 immunostaining scores ( $0,71 \pm 0,75$ ) were decreased when compared group 3 and group 4, respectively ( $2,33 \pm 0,81$ ;  $p < 0,05$ ), ( $2,20 \pm 0,83$ ;  $p < 0,05$ ). Caspase 3 proteins were highly expressed in group 2 ( $2,28 \pm 0,95$ ) when compared with group 4 ( $1,50 \pm 0,83$ ;  $p < 0,05$ ). Bax proteins were increased in group 2 ( $1,85 \pm 1,06$ ) when compared group 4 ( $0,40 \pm 0,54$ ;  $p < 0,05$ ). We determined statistically significant differences in group 2 ( $2,29 \pm 0,96$ ;  $p < 0,05$ ) vs group 4 ( $0,20 \pm 0,44$ ;  $p < 0,05$ ) and group 3 ( $1,00 \pm 0,70$ ;  $p < 0,05$ ) vs group 4 ( $0,20 \pm 0,44$ ;  $p < 0,05$ ) for mean values of cas 9 immunohistochemical scores. Our data proved that combination of citicoline with mild hypothermia ameliorated cerebral damage

after transient focal cerebral ischemia, by reducing apoptotic processes or by neutralizing the ischemia reperfusion injury.

**Key Words:** Transient focal cerebral ischemia, apoptosis, citicoline, hypothermia

## GİRİŞ

Serebral iskemi çeşitli etyolojik nedenlerle serebral kan akımı (SKA) azalması veya tam olarak durması sonucu oksijen, ATP ve glukoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan bir dizi olaylar zinciridir (1). Etiyolojiye bağlı olarak fokal veya global iskemi oluşabilir. Fokal serebral iskemi; orta serebral arterin embolik oklüzyonu, subaraknoid kanama sonrası oluşan vazospazm ve kafa travmalarının sonucunda görülebilir. Buna karşın global iskemi, kardiyak arrest veya subaraknoid kanama sonrası gelişen akut yaygın beyin ödemi neticesinde görülmektedir (1,2). Global iskemi sırasında SKA tam olarak kesilirken, fokal serebral iskemide kollateral dolanımdan düşük düzeylerde kan akımı oluşma potansiyeli mevcuttur (1). Bu rezidüel perfüzyon membran devamlılığını koruyarak, iskeminin geri dönüşsüz nöronal hasarına engel olabilecek ve düşük düzeylerde metabolik aktiviteyi devam ettirebilecek yeterli madde değişimini sağlayabilir (3-5). Fokal iskemide lezyon “core” olarak adlandırılan santral alan ve “penumbra” olarak adlandırılan perifokal alan olmak üzere iki bölümden oluşur. Santral alan dakikalar içerisinde geri dönüşsüz ağır hasarın olduğu bölgedir. Penumbra ise yapısal olarak hücrenin bütünlüğünün henüz bozulmadığı, elektriksel olarak sessiz olmasına rağmen, SKA'nın yeniden sağlanması ve/veya nöron koruyucu ajanların kullanımı ile iyon pompalarının işlevlerini tekrar devam ettirebilecek sağlamlıkta olduğu ve iskemik hasarlanmadan kurtarılacağı düşünülen bir bölgedir (4,5).

Serebral iskemik harabiyetin gelişiminde rol oynayan ve nöronal ölümle sonuçlanan patofizyolojik değişiklikler *eksitotoksisite* (6,7), *inflamasyon* (8,9) ve *apoptozistir* (10-14). Serebral arter oklüzyonunun indüklediği, iskemi sonucu beyinin farklı bölümlerinde değişik derecelerde hasarlanmalar oluşur. Korteks, striatum, hipokampusun CA1 bölgesi ve serebellumdaki purkinje hücreleri en fazla hasar gören bölümlerdir (5). İskemik harabiyeti takiben

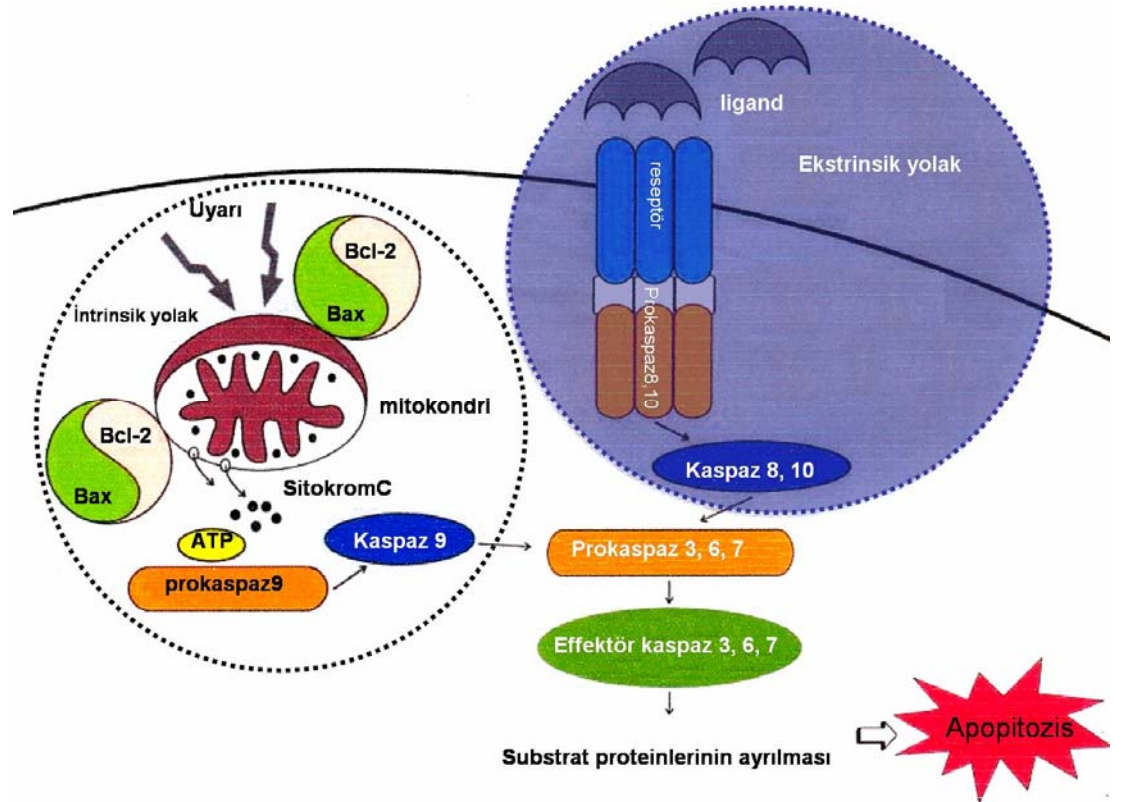


iskeminin santral bölgesinde nekrotik hücelere ve penumbral alanda da apopitotik hücelere rastlanılmaktadır (15).

Son yıllarda yapılan çalışmalar programlı hücre ölümü olan *apoptozis*in organizmanın gelişiminin bir parçası olmasına rağmen, strok da dahil olmak üzere değişik patolojik durumlarda hücre ölümüne de katkıda bulunduğunu göstermektedir (3,16-18). Apoptozis, DNA parçalanmasına yol açan enerji bağımlı bir işlemdir (17). Her ne kadar iskemik beyin harabiyetinin büyük bir kısmının eksitotoksik harabiyet sonucu oluşan nekroza bağlı olduğu düşünölmekte ise de apoptozisin penumbral beyin bölgesinde de gösterilmesi nöronal korunma sağlanması aşamasında dikkatlerin bu sessiz bölge üzerine de yoğunlaşmasına neden olmuştur (5).

Apoptozisin başlamasında etken olan hücre dışından kaynaklanan sinyallerin yanı sıra, hücre içinden kaynaklanan veya mitokondri bağımlı sinyaller de mevcuttur. DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme ve metabolik bozukluklar sonucu hücre içinden kaynaklanan sinyaller apoptotik süreci başlatabilir (10,17). Hücre içi veya hücre dışı sinyaller; hücre içerisinde bulunan proteazları, endonökleazları ve lipazları aktive ederler. Bu olayları takiben apoptotik hücrede; kromatin kondensasyonu, hücre gövdesinde ve sitoplazmada büzüöme, endonökleolitik DNA fragmantasyonu ve plazma membranının bütönlüğü kaybolur. Özellikle kaspaz cystein aspartyl specific proteases ailesi nöronal apoptoziste kritik mediatör olarak görev alır (15,19). Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik olaylar zincirini başlatırlar. Bazı kaspazlar başlatıcı; kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10, bazıları ise; kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7 efektör rol oynarlar (20).

Bcl-2 ailesi; *bcl-2*, *bcl-xL*, *bcl-w* ve *bcl-g* gibi anti-apoptotik ve *bax*, *bid*, *bad* ve *diva* gibi proapoptotik proteinler içeren, apoptoziste düzenleyici rol oynayan bir protein ailesidir (21). Bcl-2, mitokondrinin dış membranında yer alan 26 kDa moleküler ağırlığa sahip integral membran proteindir. Merkezi sinir sistemindeki gerek nekrotik gerekse apoptotik hasarlanmalar karşısında koruyucu rol oynadığı bilinmektedir (22).



**Şekil1:** Apoptotik süreç ve bu süreçte yer alan proteinler (Padosch ve ark, 2001 çalışmasından uyarlanmıştır).

Son yıllarda nöron koruyucu stratejiler başlığı altında; glutamat reseptör antagonistleri (23,24), kalsiyum kanal blokerleri (25), serbest oksijen radikallerini yok edici ajanlar (26,27), sitikolin (28-35) ve hipotermi (6,36) ile ilgili umut verici sonuçlar bildirilmiştir.

Serebral iskemi oluşturularak beyin sıcaklığındaki değişikliklerin etkilerinin incelendiği deneysel çalışmalarda beyin sıcaklığındaki 2-6°C'lik düşüşlerin iyi tolere edildiği ve nöron koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (36).

Derin hipotermi; miyokardiyal supresyon, trombositopeni, dissemine intravasküler koagülopati, solunum yetmezliği, ağır enfeksiyon ve renal yetmezlik gibi yan etkileri ve yoğun bakım şartları gerektirmesi nedeniyle tedavideki yerini daha düşük riskli hafif dereceli hipotermiye bırakmıştır (37).

Gerek global gerekse fokal iskemik beyin hasarlarında hafif dereceli hipoterminin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmasına rağmen hipoterminin metabolik hızı azaltarak, protein sentezini inhibe ederek, ATP depleksiyonunu azaltarak, serbest oksijen radikallerinin oluşumunu engelleyerek ve eksitatör nörotransmitterlerin salınımını bloke ederek etki ettiği düşünülmektedir (38,39). Hipoterminin özellikle nöron koruyucu maddelerle birlikte uygulanmasının daha etkin olduğu gösterilmiştir.

CDP-kolin olarak da bilinen sitikolin endojen bir nükleoziddir (28,29,31-35,40,41). Hücre içi ve dışı membranların devamlılığı için gerekli olan fosfotidilkolin formasyonu için beyinde hız kısıtlayıcı olarak rol oynar (41). Sitikolin ve onun ürünleri olan sitidin ve kolin, fosfolipidlerin oluşumunda gereklidir (32,41). Ayrıca membran formasyonu ve tamirinde de görev alırlar (35). Sitidin ve kolin kritik membran fonksiyonları için gerekli olan nükleik asitler, proteinler ve asetilkolin formasyonuna da katkıda bulunur (32,33,35,41). Sitikolin'in apoptotik süreçte görevli pro-kaspaz 1, 2, 3, 6 ve 8 ekspresyonunu ve iskemi sırasında ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu azalttığı da kanıtlanmıştır (41). Sobrado ve ark. bcl-2 proteinindeki artışın apoptozisi zayıflattığını bildirmişlerdir (42) .

Gerek hipoterminin gerekse sitikolin'in tek başına uygulandığı çalışmalarda apoptotik süreci engelleyerek nöron koruyucu etkileri çalışmalarla gösterilmiştir (6,36,38,41-45). Ancak hipotermi ve sitikolin'in birlikte uygulandığında apoptotik süreçle ilişkisini ortaya koyan herhangi bir çalışma daha önce yapılmamıştır.

Çalışmamızın amacı deneysel fokal serebral iskemide hipotermi ve sitikolin'in birlikte kullanılmasının apoptozis üzerindeki etkisini araştırmaktır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Tüm deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım ve Kullanım Komitesinin 08.02.2005/2 karar no'lu izni ile onaylanmış ve Lokal Etik Komitenin bilgisi dahilinde gerçekleştirilmiştir.

### Geçici Fokal Serebral İskemi Modeli

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 N<sub>2</sub>O ve %30 O<sub>2</sub> 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'nın intraluminal filament yöntemi ile oklüzyonu yapılarak oluşturuldu (46). Arteria karotis kommunis ve internal karotis arterleri komşu vagus sinirinden dikkatlice ayrıldı. Eksternal karotid arter distalinden bağlandı. Oksipital ve pterigopalatin arterler elektrokoagüle edilerek, arteria karotis kommunis ve internal karotid artere anevrizma klibi 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 sûtür (Ethilon, Ethicon Inc., Somerville, NJ, ABD) internal karotid arterin lümeni içerisinde, OSA'nın ostiumunu kapatana dek yavaşça ilerletildi ve arter bifurkasyon noktasından bağlanarak sûtür sabitlendi. Tam oklüzyon gerçekleştirildiğinde SKA monitoründe kan akımında düşüş saptandı. SKA'nın 0. dakika ölçümünden en az %50 kadar azaldığı ölçülenlerde sûtürün ostiumu kapattığı kabul edildi ve deneye devam edildi. Tüm cerrahi işlemler 15 dakikayı aşmadı. 120 dakikalık oklüzyonu takiben, anestezi altında sûtür çıkartılarak reperfüzyon sağlandı. Deney gruplarındaki sıçanlar, reperfüzyon sonrası 24. saatte transkardiyak perfüzyon uygulanmak üzere derlenme süreci için de su ve besin alma serbestisi sağlanarak kafeslerine bırakıldı.

### **Deney Grupları**

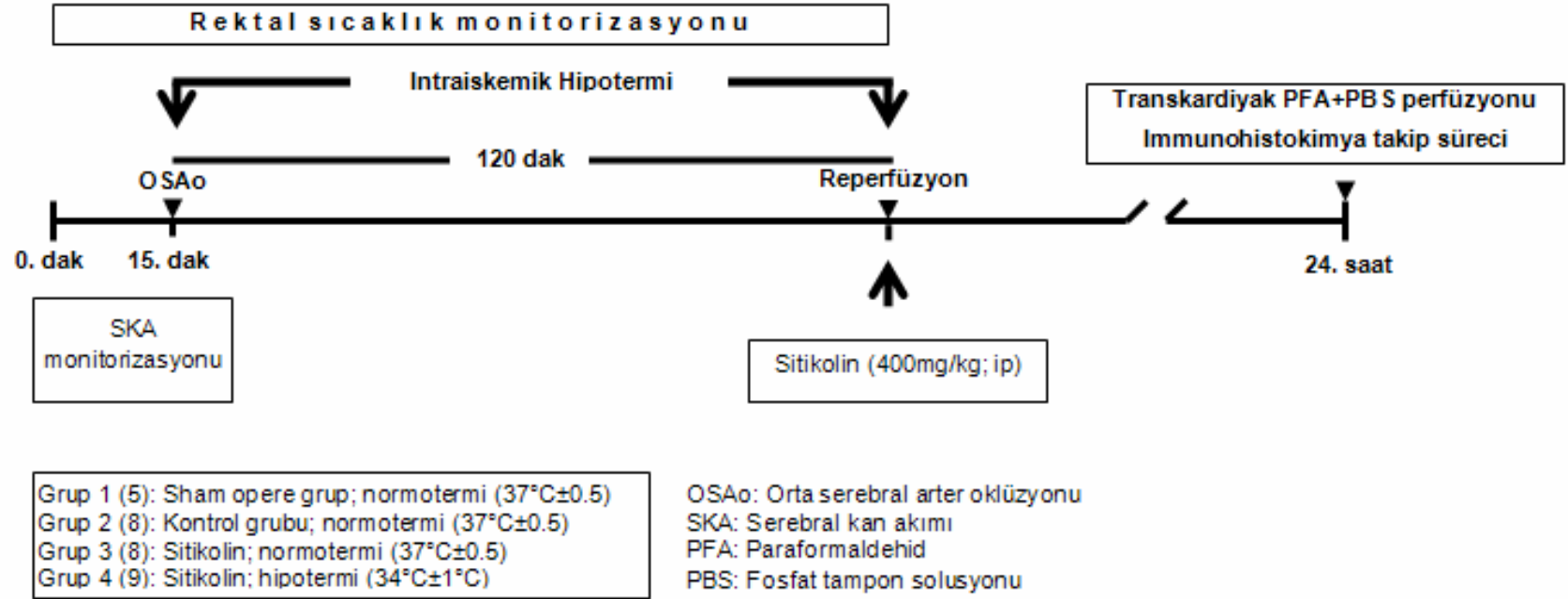
**Grup 1** (n:5); OSA oklüzyonu uygulanmaksızın tüm cerrahi girişimler gerçekleştirildi. Rektal sıcaklıkları, 0-120. dak arasında  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de tutuldu.

**Grup 2** (n:8); OSA oklüzyonu uygulandıktan sonra sıçanların rektal sıcaklıkları 0-120. dak arasında  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de tutulup, 120. dakikada 0,5 ml %0.9 NaCl intraperitoneal ip yolla uygulandı.

**Grup 3** (n:8); OSA oklüzyonu uygulandıktan sonra sıçanların rektal sıcaklıkları 0-120. dak arasında  $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de tutulup, 120. dakikada sitikolin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) 0,5 ml %0,9 NaCl içerisinde 400mg/kg ip olarak bolus tarzında verildi.

**Grup 4** (n:9); OSA oklüzyonu uygulandıktan sonra sıçanların rektal sıcaklıkları 0-120. dakikalar arasında  $34\pm 1^{\circ}\text{C}$  tutulup, 120. dakikada sitikolin 0,5 ml %0,9 NaCl içerisinde 400mg/kg ip olarak bolus tarzında verildi.

Reperfüzyon aşamasından sonra tüm sıçanlar spontan ısınmaya bırakıldı. Gruplar ve deney akışı şekil 2'de aktarılmıştır.



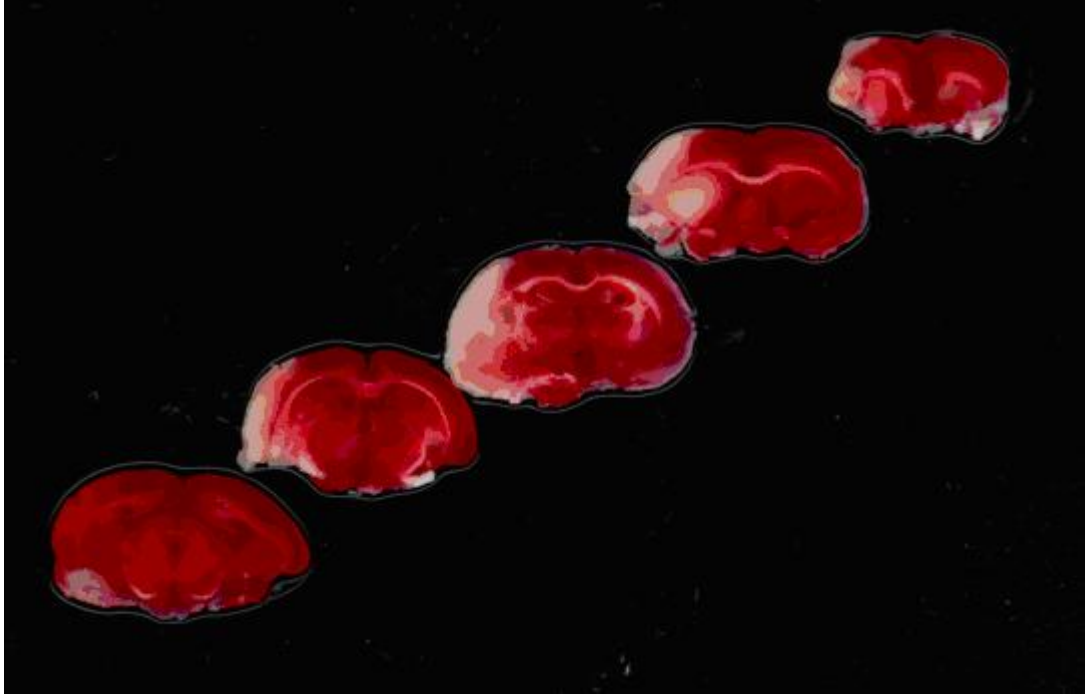
**Şekil-2:** Geçici fokal serebral iskemide sitikolin ve hipoteminin etkinliğinin araştırılması deneysel akışı

## **Nörolojik Semptomların Değerlendirilmesi**

Tüm deney hayvanları cerrahi işlem bitiminden 1 saat sonra nörolojik değerlendirmeye tabi tutuldu. Nörolojik değerlendirme, Bederson ve ark.'nın tanımladıkları yöntemle yapıldı (47). Bu değerlendirmeye göre; Grade 0: nörolojik defisit yok; Grade 1: ön bacak fleksiyon; Grade 2: dönme hareketi olmaksızın lateral itme hareketine azalmış direnç; Grade 3: Grade 2' ye ilave olarak dönme hareketinin eklenmesi.

## **Histopatolojik ve İmmunohistokimyasal Değerlendirme**

Oluşan infarkt alanınının gösterilmesi amacıyla beyin matriksinde (Zivic labs, Portersville, PA, ABD) 1mm kalınlığında koronal kesitleri alınan beyin dilimleri 37°C'deki etüvde 30 dakika sürede pH'sı 8,5 olan Na-difosfat tampon solüsyonunda %1'lik 2,3,5-Trifeniltetrazolium klorid TTC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) ile inkübe edildi (48). TTC boyaması sonrası infarkt alanı mitokondri iç membranındaki suksinat dehidrogenaz enzim inaktivasyonu nedeniyle boya tutmazken, normal beyin dokusu kırmızı renkte izlendi (34,49,50) .



**Şekil 3:** Geçici orta serebral arter oklüzyonu OSAo yapılan sıçan beyinde 2,3,5-Trifeniltetrazolium klorid boyaması sonrası açık renkli boya tutmayan alanlar kortikal ve subkortikal bölgelerde infarktı göstermektedir.

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 (51). 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 (52).



Tüm işlemleri takiben parafin bloklama sonrası immunohistokimyasal süreçler için uygulanan yöntem Minami ve ark.'nın çalışmasındaki şekilde uygulandı (51).

İmmunohistokimyasal 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. İmmunohistokimyasal değerlendirmeler: negatif - : boyanma yok; +: hafif derecede boyanma, ++: orta derecede boyanma, +++: şiddetli boyanma dördü skorlamasına (41) göre deney gruplarını bilmeyen nöropatolog tarafından yapıldı.

## BULGULAR

Tüm deney gruplarında sıçanların ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0,05$ ) (Tablo 1).

**Tablo 1:** Tüm deney gruplarının ağırlık değerleri (Ort±SD).

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Ağırlık (g)	272.18±19.55	265.76±11.28	270.47±12.20	257.80±8.31

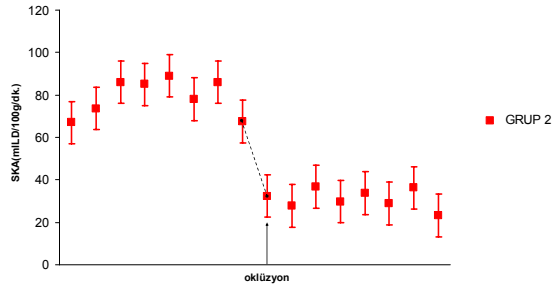
OSAO yapılan grupların SKA değerleri, ortalama±standart sapma Tablo 2'de verilmiştir. Oklüzyon yapılan sıçanların SKA değerlerinde Grup 2'de %60,6, Grup 3'de %58,1, Grup 4'de %58,2 düşüş saptandı. Gruplar arasında ise farklılık saptanılmadı ( $p>0,05$ ).

**Tablo 2:** Orta serebral arter oklüzyonu OSAO uygulanan grupların 0. ve oklüzyon sonrası serebral kan akımı değerleri (ml LD/100g/dak)

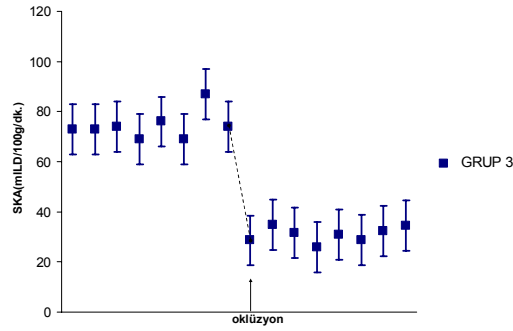
	Grup 2	Grup 3	Grup 4
0. dakika SKA ölçümü	79,01±8,78	70,11± 5,32	74,37±5,65
OSAO sonrası SKA ölçümü	31,12±4,56*	29,32±3,96*	30,90±3,09*

\* $p<0,05$ : Grup 2, 3 ve 4'ün başlangıç SKA ölçüm değerleri ve OSAO sonrası SKA ölçüm değerleri arasında anlamlı farklılık saptanmıştır.

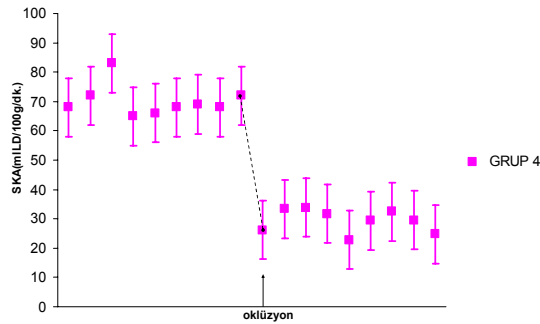
OSAO yapılan grupların SKA değerleri şekil 4, 5, 6 da sunulmuştur.



**Şekil 4:** Grup 2'deki sıçanların deney süresince SKA (ml LD/100g/dak) değerleri. OSAo sonrası SKA'da %60,6 düşme gözlenildi.



**Şekil 5:** Grup 3'deki sıçanların deney süresince SKA (ml LD/100g/dak) değerleri. OSAo sonrası SKA'da %58,1 düşme gözlenildi.



**Şekil 6:** Grup 4'deki sıçanların deney süresince SKA (ml LD/100g/dak) değerleri. OSAo sonrası SKA'da %58,2 düşme gözlenildi.

Deneyin 0. dakikasından OSAo başlangıcına kadar olan süre içinde  $\leq 15$  dakika Grup 4 dışındaki deney gruplarının rektal sıcaklık değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ( $p>0,05$ ). Hipotermik grupta ise beklenildiği üzere diğer gruplara göre anlamlı farklılık saptandı ( $p<0,05$ ).

Tüm deney gruplarının OSAo sonrası 120 dakikalık zaman dilimindeki rektal sıcaklık değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olacak şekilde Tablo 3' de verilmiştir.

**Tablo 3:** Grupların rektal sıcaklık değerleri ( $^{\circ}\text{C}$ ) (Ort $\pm$ SD)

	<b>Grup 1</b>	<b>Grup 2</b>	<b>Grup 3</b>	<b>Grup 4</b>
<b>Rektal sıcaklık değerleri <math>^{\circ}\text{C}</math></b>	37,08 $\pm$ 0,03	37,22 $\pm$ 0,01	36,98 $\pm$ 0,03	33,96 $\pm$ 0,26*

\*Hipotermik Grup 4' te rektal sıcaklık değerleri, diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak farklılık saptandı ( $p<0,05$ ).

OSAo yapılan gruplar arasında Bederson'un nörolojik skorlamasına göre farklılık saptanılmadı ( $p>0,05$ ). Bu durum OSAo'nun tüm gruplarda oluştuğunun kanıtı olarak kabul edildi (Tablo 4).

**Tablo 4:** OSAo oluşturulan gruplardaki sıçanların nörolojik muayene sonuçları Ort $\pm$ SD olarak verilmiştir.

	<b>Grup 2</b>	<b>Grup 3</b>	<b>Grup 4</b>
<b>ORTALAMA SKOR</b>	1.50 $\pm$ 0.53	2.00 $\pm$ 0.75	1.66 $\pm$ 0.76

Tüm gruplardaki sıçanların beyinleri Hemotoksilen-Eozin ile boyanarak iskemik nöronlar tespit edildi. Histolojik olarak nöropil, perisellüler ve perivasküler alanlarda vakuolizasyon olduğu ve hücrelerin süngerimsi görünüm aldığı izlendi (Şekil 7). İskemi sonrası 24. saat incelemelerinde nöronal büzülme, eozinofilik sitoplazma, nüklear kondensasyon ve fragmente olmuş apoptotik piknotik cisimler gibi letal değişiklikler saptandı. Ayrıca Grup 2 de Grup 3 ve Grup 4'e göre daha fazla periventriküler ödem görüldü.

Bu histolojik bulgular kontrol grubunda belirgin iken Grup 3 ve Grup 4 de şiddeti ve yaygınlığı daha az belirgindi.

Gruplar arasında bcl-2, kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax için immünohistokimyasal skorlama ortalamaları bakımından farklılık saptandı ( $p<0,05$ ). Grupların immünohistokimyasal skorlama sonuçları tablo 5'te verilmiştir.

**Tablo 5:** Grupların immünohistokimyasal skorlama sonuçları (Ort±SD).

	<b>Bcl-2</b>	<b>Kaspaz 3</b>	<b>Kaspaz 9</b>	<b>Bax</b>
<b>Grup 1</b>	0,25±0,50	0,25±0,50	0,25±0,50	0,50±0,57
<b>Grup 2</b>	0,71±0,75 <sup>*,**</sup>	2,28±0,95 <sup>**</sup>	2,29±0,96 <sup>**</sup>	1,85±1,06 <sup>**</sup>
<b>Grup 3</b>	2,33±0,81	1,66±1.03	1,00±0,70 <sup>**</sup>	0,83±0.40
<b>Grup 4</b>	2,20±0,83	1,50±0.83	0,20±0,44	0,40±0,54

\* : Grup 3 ile karşılaştırıldığında anlamlı  $p<0,05$

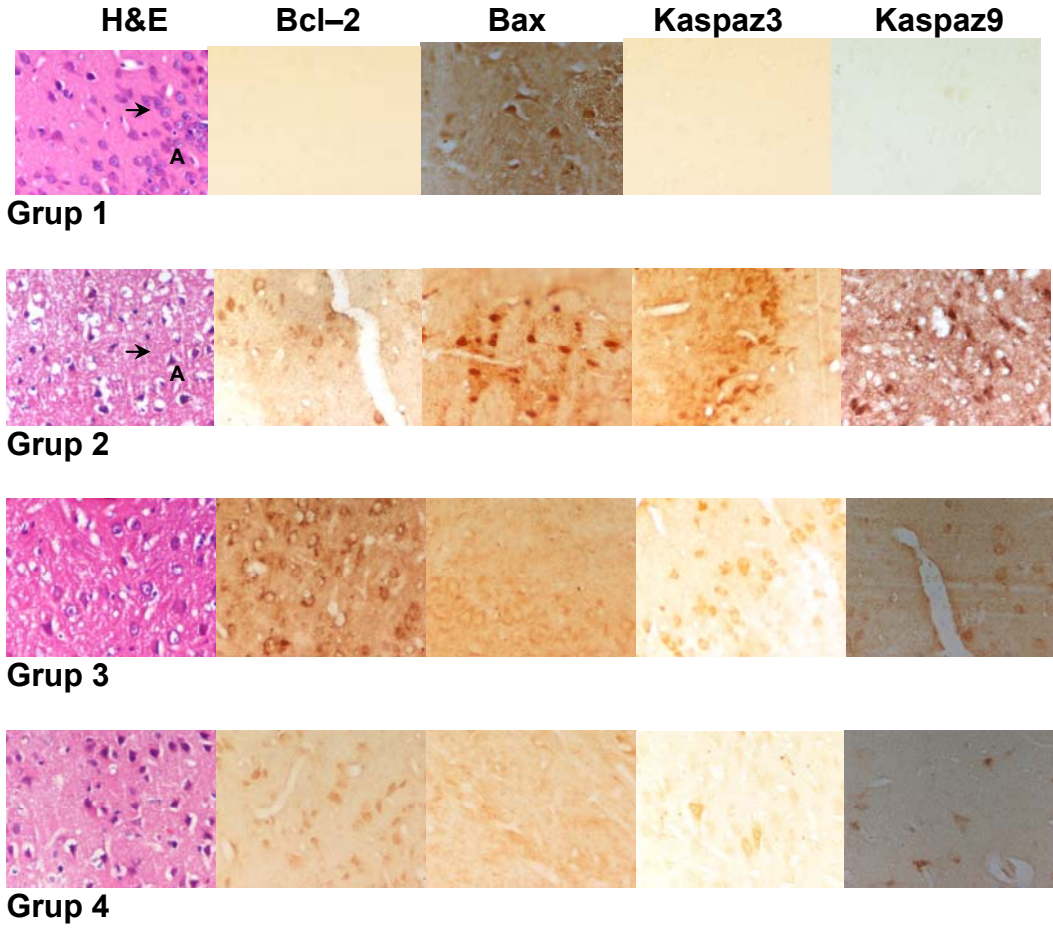
\*\* : Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı  $p<0,05$

Bcl-2 immünoaktivitesi için Grup 2'de hafif derecede boyanma izlenirken, Grup 3 ve Grup 4'de penumbra bölgesinde belirgin boyanma saptandı (Şekil 7). İmmünohistokimyasal skor ortalamaları gruplar arasında incelendiğinde Grup 2 ile Grup 3 ve Grup 4'ün arasında ayrı ayrı istatistiksel fark saptanırken ( $p<0,05$ ), Grup 3 ve Grup 4 arasında fark bulunmadı ( $p>0,05$ ) (Tablo 5). Bcl-2 immünoaktivitesi tüm gruplarda normal karşı hemisferlerde izlenmedi.

Kaspaz 3 immünoaktivitesi tüm grupların normal hemisferlerinde izlenmedi. Penumbra bölgesinde kaspaz 3 immünohistokimyasal skor ortalamaları incelendiğinde; Grup 2 - Grup 3 ve Grup 3 - Grup 4 arasında istatistiksel farklılık saptanmazken, Grup 2 ve Grup 4 arasında ortalama skor bakımından anlamlı fark elde edildi ( $p<0,05$ ) (Tablo 5). Grup 2'de şiddetli kaspaz 3 boyanması gözlenirken Grup 3 ve Grup 4'de ise Grup 2'ye göre daha az şiddette boyanma izlendi (Şekil 7).

Bax immünoaktivitesi tüm gruplarda normal hemisferlerde izlenmedi. Penumbra bölgesinde bax proteininin ekspresyonu incelendiğinde Grup 2 - Grup 3 ve Grup 3 - Grup 4 arasında istatistiksel anlamlılık saptanmazken Grup 2 - Grup 4 arasında fark bulundu ( $p<0,05$ ) (Tablo 5). Grup 2'de bax protein ekspresyonu +++ izlenirken, Grup 3'te ++ ve Grup 4'de ise + olarak saptandı (Şekil 7).

Kaspaz 9 immünoaktivitesi tüm gruplarda karşı hemisferde izlenmedi. Penumbra bölgesinde kaspaz 9 immunohistokimyasal skor ortalamaları incelendiğinde Grup 2 - Grup 3 arasında istatistiksel farklılık saptanmazken, Grup 2 - Grup 4 ve Grup 3 - Grup 4 arasında ortalama skorlar bakımından anlamlı sonuç elde edildi ( $p<0,05$ ) (Tablo 5). Grup 2'de şiddetli kaspaz 9 boyanması elde edildi. Grup 3 ve Grup 4'de ise Grup 2'ye göre daha az boyanma izlendi (Şekil 7).



**Şekil 7:** Grup 1 A Hematoksilen-Eozin boyama (x20) sonucu normal nöron morfolojisi → ve intakt nöropil izlenmektedir. Grup 2 A Apoptotik hücre →, iskemiden etkilenmiş nöropilin yapısının bozulduğu süngerimsi form görünüm; vakuolizasyon ve diğer hücrelerde nüklear kondansasyon, eozinofilik sitoplazma, dark *nucleus* görülmektedir. Grup 2 kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax ekspresyonları sitoplazmik boyanma Grup 3 ve Grup 4'e göre artmış olarak izlendi. Bcl-2 immunoekspresyonu nüklear ve sitoplazmik boyanma ise Grup 3 ve Grup 4'te kontrol grubuna artmış olarak görüldü.

## **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. Böylelikle gruplar arasında ilgilenilen parametrenin başlangıç baseline değerine göre bir değişim gösterip göstermediğine bakıldı. Çalışmada  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## TARTIŞMA ve SONUÇ

Strok günümüzdeki ölümlerin ve ağır sakat kalımların en önemli nedenlerinden biridir ve üzerinde en çok çalışma yapılan nörolojik bozukluktur (28,53,54). Bu yoğun araştırmaların sonuçları hala nöronal ölümü engelleyecek veya hafifletecek bir ajan ya da etkin tedavi yöntemi bulunmasını sağlayamamıştır. Ancak yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarında iskemik kaskatı belli bazı basamaklarda durdurmak ve iskemik harabiyeti önlemek mümkün olabilmektedir. Çalışmamızda tek bir “*silver bullet*” tedavisi kullanılması yerine literatürdeki bilgiler ışığında kombinasyon tedavisinin seçilmesi düşünüldü. Bu amaçla yaptığımız çalışmada nöron koruyucu etkileri deneysel çalışmalarla gösterilmiş olan Sitikolin ve hipoterminin apoptotik yolaktaki etkileri araştırıldı (3,6,10,16-18,28,29,31-33,36,38,41,42,44,55-61).

İskemik olay sonrası hasar belirgin olarak iki sahada gözlenir. Bunlar iskemik saha core ve iskemik penumbradır. “*Core*” ciddi 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. İskemik penumbra ise genel olarak iskemik fakat hala canlılığını sürdüren 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 ölecektir. Nöronların ölümü temel olarak iskemik olaylar sonucunda kalsiyumla aktive olan proteazlar hücre proteinlerini sindiren enzimler, lipazlar ve serbest oksijen radikallerinin etkileri sonucu oluşmaktadır (3,4). Penumbra bölgesindeki immunohistokimyasal incelemelerimizin sonuçları, nöronal korunmada en hassas ve infarktın belirlenmesinde rol oynadığı bilinen penumbral bölgedeki nöronların apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerinin değerlendirilmesinin

sessiz ama hala kurtarılabilir nronların olduunu göstermede önemli olduunu ortaya koymuştur (4).

Günümüzde serebral kan akımı ölçüm için değişik ve gelişmiş birden fazla ölçüm yöntemi olmasına rağmen sadece LDF ve termal diffüzyon akım ölçer aletleri sürekli ölçüm yapılmasına olanak sağlamaktadır (62). Transkraniyal doppler metodu da serebral kan akım hızını sürekli monitorize edebilmekte fakat bazal serebral arterlerden geniş toplayıcı derin venlerden ve parankimal arterlerden gelen akım hakkında çok kısıtlı bilgi verebilmektedir (63). Çalışmamızda deneysel OSA oklüzyonun gerçekleştirildiğini tespit etmek amacıyla “*real-time*” ölçüm değerleri elde edilen ve oklüzyon sonrası sıçanların nörolojik değerlendirmeleriyle de doğruladığımız LDF yöntemini SKA ölçümleri için kullanıldı. Orta serebral arter oklüzyonu sonrası tüm gruplarda ilk ölçüm değerinin %50’sinden daha fazla bir düşüş elde edildi ve bu akımdaki azalmanın kanıtı olarak oklüzyon sonrası yapılan nörolojik değerlendirmelerinde sıçanlarda belirgin nörolojik defisit gözlemlendi. Değerlerimiz OSA oklüzyonuna karar vermede LDF’nin önceki çalışmalarla da benzerlik içeren yeterli bir yöntem olduğunu ortaya koydu ve sonuçlarımız yapılan OSA oklüzyonunun tüm sıçanlarda aynı derecelerde oklüzyon yaptığını ve gruplar arasında farklılık olmadığını kanıtı olarak da değerlendirildi (49,50).

Geçici fokal serebral iskemi oluşturma amacıyla, Kawamura ve ark.’nın tanımladığı ve tüm araştırmacılar tarafından insanlardaki strok’a benzerliği nedeniyle model olarak kabul edilen intraluminal sütün tekniği kullanıldı (46). Global iskemi modellerinin insanlarda fokal iskemiler kadar yaygın olmaması da modelin tutulmasının diğer bir nedenidir (64,65). Ayrıca geçici serebral iskemi modelinde moleküler mekanizmaların dinamikleri nedeniyle global iskemiden farklılıklar içerdiği ve kaspaz 3 ekspresyonunu arttırdığı da gösterilmiştir (66).

İskemi sırasında beyinde hücresel enerji depolarının tükenmesi iskemik kaskat olarak bilinen olaylar zincirini başlatır. İskemi sonucu harabiyeti belirleyen en önemli iki faktör iskeminin derinliği ve süresidir. İskemik dokunun reperfüzyonu ise bir yandan iskemi sırasında kaybolan bazı fonksiyonların geri gelmesini sağlarken diğer yandan ani ve fazla miktarda oksijen ve dolaşımdaki kan elemanları iskemik hasara uğramış dokularda özellikle serbest oksijen radikallerinin oluşmasına ve hasarın ilerlemesine neden olmaktadır (26).

Çalışmamızda reperfüzyon hasarını engellemek için kaspaz bağımlı apoptozisi inhibe ettiği bilinen sitikolin, intraluminal sütürün çekilmesini hemen takiben Krupinski ve ark.'nın önerdiği gibi reperfüzyon aşamasında kullanıldı (41).

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından çok farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (10,17). Apoptozis hücre içinde çeşitli mediatörler tarafından düzenlenmektedir (17). Bu mediatörler arasında iyonlar (kalsiyum) bazı moleküller, seramid, genler (67) 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<sub>S</sub> bir kısmı ise apoptozisi baskırlar (10,57,58). Hücrelerin yaşayabilirlik durumu içinde bulunduğu bu proapoptotik / antiapoptotik üyelerinin Bcl-2/Bax rölatif oranına bağlıdır. Bu üyeler kendi aralarında homo-heterodimer şeklinde bulunabilirler. Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunur ve iyon transportunu düzenler (57). 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 (10,68). Takiben apoptozisi indükleyen Bax ekspresyonu artarak Bcl-2 / Bax oranını bax yönünde değiştirir (58). Sitokrom c mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteini (57). Son yıllarda anlaşılmaya

başlanan önemiyle apopitozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesinin apopitozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğinin işareti olduğu öne sürülmüştür (69). Sitokrom c apopitozis-indükleyici faktör AIF ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan apoptotic protease activating factor-1 APAF-1 'e bağlanır ve onu aktive eder. Ardından ATP'nin de katılımıyla *apoptozom* adı verilen bir kompleks oluşur.

Anti-apopitotik protein olan bcl-2'nin aşırı ekspresyonu sitokrom c salınmasını ve kaspaz 3'ünde aktive olmasını inhibe eder (57). Bu kompleks inaktif olan prokaspaz 9'un aktif kaspaz 9 haline dönüşmesini sağlayarak kaspaz sisteminin aktive edilmesine neden olur. Kaspaz'lar inaktif prekürsör olarak sitoplazmada bulunan bir grup enzimlerdir (41). Birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir etkiye neden olurlar. Sonuçta apopitozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olarak hücre ölümünü gerçekleştirirler (10,16,17,55,56,59,70). Apopitotik hücreler inflamatuvar reaksiyon olmaksızın fagositoz yoluyla hızlıca ortadan kaldırılır. Nekroz ise plazma membranlarının yırtılmasına, hücrelerin lizisini takiben de inflamatuvar reaksiyona neden olur (42). Mouw ve ark. yaptıkları çalışmalarında fokal serebral iskemide kullandıkları spesifik kaspaz 9 inhibitörünün nöronal hasarlanmayı etkin bir biçimde azalttığını ortaya koymuşlardır (59). Kaspaz inhibitörleri ailesi olan apopitozis inhibitörleri kaspazları selektif olarak inhibe ederek apopitotik mekanizmayı durdurur. Ayrıca henüz mekanizması tam aydınlatılmamış olsa da AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilen kaspaz bağımsız bir mekanizmadan da bahsedilmektedir (56). İmmunohistokimyasal boyanma skorları ortalamalarımıza göre; gerek kaspaz 3, gerekse kaspaz 9 proteinlerinin sitikolin ve hipotermi grubunda hem kontrol hem de yalnız sitikolin uygulanan Grup 3'de normotermik sıçanlardan daha az ekspresyon gösterdiği gözlemlendi. Çalışmamızda, sitikolin ve hipotermi kombinasyonunun ise özellikle kaspaz 9'un ekspresyonunu daha güçlü bir şekilde baskıladığını saptadık. Sonuçlarımız bu kombinasyonun apopitotik hücre ölüm

basamaklarını apoptozom oluşmadan engelleyebileceğini ve nöronal hasarlanmayı azaltabileceğini literatürdeki apoptotik hücre ölüm basamakları ile ilgili bilgilerle de korrelasyon gösterecek şekilde ortaya koymaktadır (10,17).

İskemi esnasında veya iskemi sonrası erken devrede hipotermimin nöron koruyucu etkisi değişik klinik ve deneysel çalışmalarla tanımlanmıştır (71,72). Bu çalışmalarda iskemi sonrası 30 dakikaya kadar '*tedavi penceresinin*' mevcudiyeti tanımlanmış ve bu süre içinde hafif hipotermimin 32-34°C uygulanmasının nöron koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (73,74). Çalışmamızda da bu tedavi penceresi düşünülerek hipotermi intra-iskemik periodda uygulanmıştır.

Hafif hipotermi, derin hipotermide görülen kardiyak aritmi, kan hiperkoagülopatisi, hemodinamide değişiklikler ve asit-baz dengesinde bozukluklara neden olmadığından tüm araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir (75-78).

Bazı çalışmalarda hafif hipotermimin (32-34°C) kalıcı fokal iskemiden sonra serebral infarktın büyüklüğünde azalma ortaya çıkardığı da gösterilmiştir (79). Literatürde önerildiği gibi çalışmamızda hafif hipotermi nöron koruyucu ajan olan sitikolinin terapötik penceresinin artırılması amacıyla kullanıldı (71,80,81). İntraiskemik hipotermimin nöron koruyucu etkisinin nasıl oluştuğu bilinmemektedir. Araştırmacılar hipotermimin hipoksik-iskemik hasarlanma esnasında serebral enerji kullanımını azaltarak glutamat ve aspartatın nörotoksik etkisini ve inhibitör nörotransmitter glisinin ekstrasellüler mesafede kalma zamanını azaltarak tesir ettiğini öne sürmüşlerdir (82,83).

Çalışmalarda, hipotermimin enerji kullanımını azaltarak EAA'lerin fonksiyonu bozulmadan önce beynin hipoksik-iskemiye toleransını arttırdığı da gösterilmiştir (84). Normotermik şartlar altında toksik konsantrasyonlarda EAA'lerin ekstrasellüler mesafede toplanmasına neden olacak derecede enerji yetmezliğinin hipotermimin uygulanmasıyla azaldığı da saptanılmıştır (84). Normotermik sıçanlarda glutamat düzeyleri 15-80 misli artarken hipotermiklerde 30-33°C glutamat salınması kısmen veya tamamıyla inhibe edilmektedir (85,86). Bu çalışmaların sonuçlarına dayanılarak hipotermimin koruyucu etkisinin iskemi ile ortaya çıkarılan glutamat salınması ile meydana geldiği öne sürülmüştür. Bununla beraber Chopp ve ark. yaptıkları çalışmada hipotermimin iskemik hasarlanma ile ortaya çıkan yüksek enerjili fosfatların azalmasını önlediğini göstermişlerdir (87).

Ayrıca serebral ödemin gelişmesinde rol oynayan fizyolojik parametrelerin örneğin iyon homeostazının kan-beyin bariyeri permeabilitesinin ve  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine girişinin sıcaklığa duyarlı olduğu da gösterilmiştir (18).

İskemi sırasında hipotermimin ATP'yi koruduğu anormal iyon akımlarını doku asidozunu ve eksitator nörotransmitter salınmasını azalttığı ve lipoprotein membranların akışkanlığını koruduğu saptanılmıştır (79,88). Enerji depolarının hızla yerine konulamayı ve hücre membranlarının tekrar stabilizasyonun olmayışının normalde düzelebileme ihtimali olan penumbra hücrelerin de ölümüne neden olabileceği ileri sürülmüştür (89).

Sıcaklıktaki düşüşlerle birlikte intraiskemik fosforile edilen metabolitlerde azalma oluştuğu, metabolitlerdeki bu azalmanın sıcaklıkta hafif veya orta derecede azalmalar yapıldığında daha az belirgin olduğu bulunmuştur (90).

Okada ve ark. erişkin sıçanlarda normotermik değerlerden 4°C ile 8°C'lik azalmaların iskemi esnasında başlangıçta ATP düzeylerinde daha fazla inorganik fosforlarda ise iskemi süresinde daha küçük artışlara neden olduğunu saptamışlardı (91).

İskemik olaylarda endojen EAA beyinin ekstrasellüler mesafesinde yığılarak EAA reseptörler üzerinde eksitotoksik etkisini ortaya çıkarır. Muhtemelen enerji bağımlı homeostatik mekanizmalar geri alım işlemleri de dahil olmak üzere intrasellüler EAA içeriğinden sorumludurlar ve bu mekanizmalar enerji kullanımı ortaya çıkan enerji miktarını aştığı zaman bozulmaya başlarlar (83). Hipotermimin enerji kullanımını azaltarak EAA'lerin fonksiyonu bozulmadan önce beyin iskemiye toleransını arttırdığı, normotermik şartlar altında toksik konsantrasyonlarda EAA'lerin ekstrasellüler mesafede toplanmasına neden olacak derecede enerji yetmezliğinin hipotermimin uygulanmasıyla da azaldığı gösterilmiştir (84). Ayrıca erişkin sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda iskemi esnasında hipotermi uygulanmasıyla yüksek enerjili fosfatlarda azalma olmadığı gösterilmiştir (92). Buna karşın hücre ATP'nin koruma kabiliyeti ise bozulmuştur (93).

Nito ve ark. 35°C'nin yararlı etkilerinin yalnızca ulaşılan sıcaklık ile ilgili değil iskeminin tipi ve hasarlanmanın şiddetiyle yakın ilişki içinde olduğunu bildirmişlerdir (44). Araştırmacılar yalnızca post-iskemik hafif hipotermimin hasarlanmayı azaltmadığını ancak geçici fokal serebral iskemide uyguladıkları NO inhibitörü FK 506 ile kombine edildiğinde ilacın terapötik etkisini arttırdığını ve serbest oksijen radikallerini azalttığını rapor etmişlerdi (44). Bazı otörler (36,60) intraskemik hipotermiyi bazıları ise (61,94) post-iskemik hipotermiyi kullanarak apoptotik süreçlerle ilişkisini araştırmışlardır. Her iki tedavide de apoptotik hücre ölümünün zayıfladığı ve apoptotik proteinlerin ekspresyonlarının azaldığını bildirmişlerdir (36,60,61,94). Krieger ve ark. ise intraskemik hipotermimin post-iskemik hipotermiden daha fazla yararlı etkileri olduğunu bildirmişlerdir (39). İmmunohistokimyasal olarak

apoptotik süreçlerin değerlendirildiği çalışmamızda da sitikolin ve hipotermi'nin birlikte uygulandığı Grup 4'teki deney hayvanlarında yalnızca sitikolin uygulanan normotermik Grup 3 sıçanlara göre anti-apoptotik protein bcl-2'nin artmış olduğu buna karşın apoptotik yolaktaki kaspaz 3 ve 9'un ise belirgin şekilde baskılandığı görüldü. Ayrıca hem Grup 3 hem de Grup 4'te kontrol grubuna göre anti-apoptotik sürecin hızlandığı da saptandı.

Inamasu ve ark. bax protein ekspresyonunun hipotermide önemli rol oynayan bir protein olduğunu öne sürmüşlerdi (61). Çalışmamızda, Grup 2 ile Grup 4 arasında bax protein ekspresyonu açısından anlamlı farklılık saptandı ( $p<0,05$ ). Grup 2 ve Grup 3, Grup 3 ve Grup 4 arasında istatistiksel anlamlılık saptanmamasına rağmen bax immunohistokimyasal skor ortalamalarının hem tek başına sitikolin uygulanan Grup 3 hem de beraberinde hipotermi uyguladığımız Grup 4 sıçanlarda kontrol grubuna göre belirgin olarak düştüğü izlendi. Özellikle hipotermi'nin kombine edildiği Grup 4'teki sıçanlarda boyanmanın şiddetinin ve yaygınlığının az olduğu görüldü. Elde ettiğimiz bu bulgularla apoptotik yolun belirteçlerinden olan bax proteininin kombine terapide belirgin olarak baskılandığı gösterildi. Sonuçlarımız literatürdeki diğer sonuçlarla da paralellik göstermektedir (14,55,68).

Alkan ve ark.'nın yaptığı çalışmada MK 801 tedavisi ile kombine edilen hipotermi'nin hipoksik iskemik beyin hasarlanmasını MK 801 ve hipotermi'nin tek başına uygulamalarına göre belirgin olarak azalttığı saptanmıştır (6). Yazarlar bu yararlı etkinin, hipotermi'nin enerji kullanımını hücre içi asidozu serebral metabolizma hızını azaltması iskemik serebral ödem gelişimi ve kan beyin bariyeri değişimlerini önlemesi ve eksitatör aminoasitlerin salınımını azaltıcı etkisiyle elde edildiğini bildirmişlerdir (6). Çalışmamızda yukarıda bahsedilen çalışma sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde, hipotermi'nin tek başına değil kombinasyon tedavisinde kullanılan nöroprotektif ajanın etkilerini güçlendirerek nöron koruyucu görevi yaptığı sonucuna varılabilir. Bulgularımız immunohistokimyasal değerlendirmeler neticesinde hücresel düzeyde de bu yararlı etkilerin oluştuğunu göstermektedir.



Prakasa-Babu ve ark. geçici fokal serebral iskemi uyguladıkları ve hipotermi uygulanan sıçanların H&E ile yapılan histolojik incelemelerinde hücrelerdeki büzülmenin ve köpüksü spongy form görünümünün normotermik olanlara göre daha az şiddet ve yaygınlıkta olduğunu bulmuşlardır (95). Çalışmamızda, H&E boyamaları neticesinde kontrol grubu olan Grup 2'de iskemiden etkilenmiş nöropil yapısının devamlılığının bozulduğu, eozinofilik sitoplazmanın olduğu, nöronların piknotik hal alarak büzüldüğü, vakuolizasyonun arttığı ve kromatinlerin kondanze olduğu buna karşın Grup 3 ve özellikle hipotermiye kombine edildiği Grup 4'te hala canlılıklarını sürdüren normal yapıdaki nöronların olduğu görüldü. Phanithi ve ark.'da çalışmalarında benzer sonuçlara ulaşmışlardır (38). Aynı araştırmacılar penumbra bölgesinde hipotermik gruptaki sıçanların bcl-2 immunoreaktivitesinin normotermik sıçanlara göre daha fazla olduğunu buna karşın bax ve sitokrom c proteinlerinin normotermik grupta daha fazla eksprese olduğunu da saptamışlardır (39). Çalışmamızda antiapoptotik protein olan bcl-2'nin immunohistokimyasal skor ortalamalarının hem Grup 3 hem de sitikolin ve hipotermiye birlikte uygulandığı Grup 4 deney hayvanlarında kontrol grubuyla istatistiksel anlamlı farklılık gösterdiği gözlemlendi. Özellikle penumbra bölgesinde lokalize nöronlarda sitoplazmik membran boyanmasının saptanması iskemiyeye maruz kalmış nöronların hala canlılıklarını sürdürebileceklerinin bir göstergesi olarak kabul edildi. Ayrıca bax ekspresyonunun hem Grup 3 hem de Grup 4'te kontrol grubuna göre belirgin olarak azalması bcl-2 varlığında apoptotik yolağın baskılanması sonucu olduğunun göstergesi olarak da yorumlanabilir.

Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesi olan bax proteininin salınımının hipotermi varlığında antiapoptotik bcl-2 proteini ile bloke edildiği ve nöronal hücre yaşam şansını bu sayede arttırdığı öne sürülmüştür (95). Bcl-2 / bax oranı hipotermi varlığında artarken normotermik deneklerde bu oran bax lehine bozulmaktadır (38). Çalışmamızda, hipotermi ile sitikolin'in kombine

edildiği Grup 4 sıçanların kontrol grubuyla karşılaştırılmasında literatürdeki bulgulara benzer şekilde bcl-2 ekspresyonunun arttığı bax ekspresyonunun ise azaldığı saptanılmıştır.

Zhang ve ark.'nın çalışmasında global serebral iske mi'yi takiben hipotermi uygulanmasının mitokondri dış membranında lokalize olmuş integral membran proteini olan bcl-2'nin aşırı ekspresyonuna neden olduğu gösterilmiştir (96). Aynı çalışmada Bcl-2 proteinin mitokondri dış membranına ve Apaf-1'e tutunduğu, takiben de, hücre içi sinyaller aracılığı ile Apaf-1'in mitokondri zarından ayrılmasına ve geçirgenlik artışına neden olduğu ifade edilmiştir. Bu durumun sitokrom c'nin iç membrandan salınmasına ve sitozole çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir. Literatürdeki diğer çalışmalarla da benzer şekilde sitokrom c, prokaspaz 9 ve Apaf-1 ile apoptozom kompleksini oluşturarak önce kaspaz 9'u takiben de kaspaz 3'ü aktive ederek DNA fragmentasyonuna ve kromatin yoğunlaşmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (38). Böylelikle apoptotik hücre ölümünün gerçekleştiği öne sürülmüştür. Çalışmamızın sonuçları, hipotermik Grup 4 sıçanlarda bcl-2 artışı görülürken hem kaspaz 3 hem de kaspaz 9 skorlarında azalma olduğunu göstermiştir. Elde edilen bulgular kaspaz yolağını inhibe eden nöroprotektif sitikolin'in hipotermi ile kombine edilmesi durumunda sitikolin'in etkilerini arttırdığını göstermektedir. Bu durum Sobrado ve ark.'larının ileri sürdüğü gibi hipoterminin etkisiyle bcl-2 varlığında sitokrom c baskılanması ve sitikolinle kaspaz yolağının bloke edilmesinin dolayısıyla da apoptozom oluşumunun engellenmesiyle açıklanabilir (42).

Chen ve ark. Bax ekspresyonunun fokal ve global serebral iskemide farklılık göstermesi ilginç olarak nitelendirmişlerdir. Global iske mi sonrası hassas CA1 nöronlarında Bax mRNA'sında artış olduğu dokümente edilmiştir (97). Bax mRNA artışı Bax immun boyanma ile de korrelasyon göstermektedir. Bax regülasyonu geç dönem nöronal hücre ölümü için aktif rol oynamaktadır. Bunun tam tersi fokal serebral iskemide bax ekspresyonu pasif düşüş eğilimindedir. Fokal serebral iskemide reperfüzyon hasarı olması

dolayısıyla iskemik hasarlanmanın daha ciddi oluşu ve hücre kaybı nedeniyle santral nekroz alanında bax gen ekspresyonu oluşmamaktadır. Bu nedenle penumbral bölgede hali hazırda canlılığını sürdüren nöronların olması sebebiyle bax ekspresyonu oluşması doğaldır. Çalışmamızda penumbral bölgedeki nöronlarda bax ekspresyonunu şiddetli olarak görülmeside bu bulguları desteklemektedir.

Bugünkü bilgilerimize göre anti-eksitotoksik, anti-inflamatuvar, anti-oksidan ve/veya anti-apoptotik olan, santral sinir sistemine kolaylıkla geçebilen, yan etkisi minimal veya olmayan, iskemi oluşumundan 4-6 saat geçtikten sonra bile kullanıldığında etkisi olan, trombolitik ve diğer nöron koruyucu maddelerle olumsuz etkileşimi olmayan maddeler ideal nöron koruyucudur. Deneysel çalışmalarda, iskemi oluşumundan 6 saat geçtikten sonra ilaçların kullanılmasının nöron koruyucu etki oluşturduğu gösterilememiştir. Ayrıca çalışmaların çoğunluğunda da geri dönüşümsüz infarktın arteriyal oklüzyonu takiben 2-6 saat içerisinde meydana geldiği saptanılmaktadır. Bu yüzden genelde 6 saatlik “tedavi aralığı” tüm araştırmacılar tarafından olmasa bile çoğunluk tarafından kabul edilmektedir (1,2). Çalışmamızda tercih ettiğimiz nöron koruyucu ajan olan sitikolin’i 2 saat’lik oklüzyonu takiben reperfüzyon aşamasında kullanmamızın temelinde de literatürdeki bu araştırma sonuçları yatmaktadır.

Sitikolin hücre içi ve hücre dışı membranların devamlılığı için gerekli olan fosfotidilkolin formasyonu için beyinde hız kısıtlayıcı olarak rol oynamaktadır (29). Sitikolin, sitidin ve kolinden oluşur. Ayrıca membran formasyonu ve tamirinde de görev alırlar. Sitidin ve kolin kritik membran fonksiyonları için gerekli olan nükleik asitler proteinler ve asetilkolin yapımında da katkıda bulunurlar (28,29,31-33,35,41). Lipid içeriği yüksek santral sinir sisteminde nöronal fonksiyonların devamı için gerekli olan fosfolipidlerin gerek global gerekse fokal serebral iskemi deneysel modellerinde ve kafa travması çalışmalarında sitikolin tedavisi ile yeterli düzeylere ulaştırılabildiği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Sitikolin’in

apoptotik süreçte görevli pro-kaspaz 1, 2, 3, 6 ve 8 ekspresyonunu ve iskemi sırasında ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır (41). Sobrado ve ark.'da bcl-2 proteininin artışının apoptozisi zayıflattığını bildirmişlerdir (42). Strok modeli uygulanan deneysel çalışmaların çoğunluğunda sitikolin'in iskemik hasar volümünü azalttığı ve davranışsal parametreleri iyileştirdiği saptanılmıştır (98). Akut serebral iskemili hastalarda yapılan çok merkezli çalışmalarda da sitikolin'in efektif etkileri yanında iyi tolerabilite özelliği olduğu sonucuna da ulaşılmıştır (99). Andersen ve ark. sıçan embolik strok modelinde düşük doz sitikolin ve trombolitik tedavi kombinasyonunun infarkt volümünü küçülttüğünü bildirmişlerdir (100). Çalışmamızda, membran stabilizatör etkilerinden yararlanmayı düşündüğümüz sitikolin'in, normotermik Grup 3 deney hayvanlarında kontrol grubuna göre apoptotik süreçteki koruyucu etkileri immnohistokimyasal olarak ortaya konulmuştur. Kontrol grubunda apoptotik yolağın belirteçleri kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax ekspresyonları şiddetliyen normotermik sitikolin grubunda ekspresyonda belirgin olarak azalma saptandı. Antiapoptotik protein bcl-2'nin ise grup 3'te kontrol grubuna göre belirgin ekspresyon gösterdiği bulundu. Bu bulgular literatürdeki bilgilerle de örtüşmektedir (41). Ayrıca araştırmamızda sitikolin'in hipotermi kombinasyonu ile etkisinin güçlendirilmiş olması önemli bir bulgudur. Hipotermi ile güçlendirilmiş sitikolin grubunda immnohistokimyasal sonuçlar neticesinde kaspaz 3 kaspaz 9 ve bax ekspresyonlarının hem sitikolin'in tek olarak kullanıldığı normotermik Grup 3 hem de kontrol grubuna göre düşük olduğunu bunun yanısıra bcl-2 proteini ekspresyonunun şiddet ve yaygınlığının ise artmış olduğu görüldü. Çalışmamızda, sitikolin membran stabilizatör etkisi nedeniyle reperfüzyon aşamasında oluşacak yaygın ve şiddetli hasarlanmayı önlemek amacıyla intraluminal sütür çıkarılmasını takiben diğer araştırmacıların önerdiği şekilde uygulandı (9,41). Sonuçta iskemi süresince uygulanan hipoterminin özellikle kaspaz yolağındaki kaspaz 9'u baskılayarak nöronal ölümü engellediği düşünüldü. Araştırmamızda kombine tedavinin uygulandığı Grup 4'te kaspaz 9 immnohistokimyasal skor sonuçlarının hem Grup 3 hem de kontrol grubu ile istatistiksel olarak anlamlı olması da bunun bir kanıtı olabilir. Bu bulgular

ışığında apoptozom oluşum aşamasında kaspaz 9'un bloke edilmesi ile kaspaz 3'ün aktive olamaması böylelikle de hücreyi apoptotik süreçten koruduğu sonucuna varılabilir.

Sonuç olarak çalışmamız da kaspaz yolağını inhibe ettiğini bilinen sitikolin'in hipotermi ile kombine edildiğinde diğer apoptotik yolak proteinleri kaspaz 3 ve bax skor ortalamalarında belirgin düşüğe neden olduğu ve en önemli etkisinin kaspaz 9 ekspresyonlarında olduğu saptandı. Ayrıca bcl-2 ve bax arasında gerçekleştiği düşünülen mitokondrial membrandaki yarışmanın bir sonucu olarak bcl-2 protein ekspresyonunun hipotermik sıçanlarda belirgin artış gösterdiği buna karşın bax ekspresyonunun azaldığı bulundu.

Çalışmamız iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında nöroprotektif sitikolin'in hipotermi ile kombine terapide apoptotik yolağı baskılayarak ve anti-apoptotik proteinleri artırarak nöronal korunma sağladığını immunohistokimyasal olarak ortaya koymuştur. Bu bulgular nöron koruyucu ajanların tedavi penceresinin artırılması ve tedavinin etkilerinin güçlendirilmesine yardımcı olabileceğinin bir kanıtı olarak literatüre yeni bir açılım katacaktır.

## KAYNAKLAR

- (1) Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992; 77(2):169-84.
- (2) Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 1992; 77(3):337-54.
- (3) Onteniente B, Couriaud C, Braudeau J, Benchoua A, Guegan C. The mechanisms of cell death in focal cerebral ischemia highlight neuroprotective perspectives by anti-caspase therapy. *Biochem Pharmacol* 2003; 66(8):1643-9.
- (4) Back T. Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 1998; 18(6):621-38.
- (5) Ginsberg MD. Adventures in the pathophysiology of brain ischemia: penumbra, gene expression, neuroprotection: the 2002 Thomas Willis Lecture. *Stroke* 2003; 34(1):214-23.
- (6) Alkan T, Kahveci N, Buyukuysal L, Korfali E, Ozluk K. Neuroprotective effects of MK 801 and hypothermia used alone and in combination in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Arch Physiol Biochem* 2001; 109(2):135-44.
- (7) Ali C, Nicole O, Docagne F, Lesne S, MacKenzie ET, Nouvelot A et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(6):956-66.
- (8) Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke* 2003; 34(10):2495-501.
- (9) Schabitz WR, Li F, Irie K, Sandage BW, Jr., Locke KW, Fisher M. Synergistic effects of a combination of low-dose basic fibroblast growth factor and citicoline after temporary experimental focal ischemia. *Stroke* 1999; 30(2):427-31.
- (10) Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27(2):267-82.
- (11) 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.

- (12) 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.
- (13) 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.
- (14) Schmidt-Kastner R, Truettner J, Zhao W, Belayev L, Krieger C, Busto R 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.
- (15) 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.
- (16) Plesnila N. Role of mitochondrial proteins for neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* 2004; 89:15-19.
- (17) Sastry PS, Rao KS. Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* 2000; 74(1):1-20.
- (18) Korenkov AI, Pahnke J, Frei K, Warzok R, Schroeder HW, Frick R 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.
- (19) Zheng Z, Lee JE, Yenari MA. Stroke: molecular mechanisms and potential targets for treatment. *Curr Mol Med* 2003; 3(4):361-72.
- (20) Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat. *Neuroscience* 2002; 115(1):125-36.
- (21) Padosch SA, Vogel P, Bottiger BW. [Neuronal apoptosis following cerebral ischemia. Basis, physiopathology and treatment strategies]. *Anaesthesist* 2001; 50(12):905-20.
- (22) Chen J, Graham SH, Chan PH, Lan J, Zhou RL, Simon RP. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport* 1995; 6(2):394-8.
- (23) LeBlanc MH, Li XQ, Huang M, Patel DM, Smith EE. AMPA antagonist LY293558 does not affect the severity of hypoxic-ischemic injury in newborn pigs. *Stroke* 1995; 26(10):1908-14.
- (24) Childs AM, Evans RH, Watkins JC. The pharmacological selectivity of three NMDA antagonists. *Eur J Pharmacol* 1988; 145(1):81-6.

- (25) Franke CL, Palm R, Dalby M, Schoonderwaldt HC, Hantson L, Eriksson B et al. Flunarizine in stroke treatment (FIST): a double-blind, placebo-controlled trial in Scandinavia and the Netherlands. *Acta Neurol Scand* 1996; 93(1):56-60.
- (26) Cho S, Park EM, Febbraio M, Anrather J, Park L, Racchumi G et al. The class B scavenger receptor CD36 mediates free radical production and tissue injury in cerebral ischemia. *J Neurosci* 2005; 25(10):2504-12.
- (27) Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21(7):1086-90.
- (28) Adibhatla RM, Hatcher JF. Cytidine 5'-diphosphocholine (CDP-choline) in stroke and other CNS disorders. *Neurochem Res* 2005; 30(1):15-23.
- (29) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Cytidine-5'-diphosphocholine affects CTP-phosphocholine cytidyltransferase and lysophosphatidylcholine after transient brain ischemia. *J Neurosci Res* 2004; 76(3):390-6.
- (30) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5(5):647-54.
- (31) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline mechanisms and clinical efficacy in cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2002; 70(2):133-9.
- (32) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; 80(1):12-23.
- (33) Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32(10):2376-81.
- (34) Muralikrishna AR, Hatcher JF, Tureyen K. CDP-choline liposomes provide significant reduction in infarction over free CDP-choline in stroke. *Brain Res* 2005; 1058(1-2):193-7.
- (35) Weiss GB. Metabolism and actions of CDP-choline as an endogenous compound and administered exogenously as citicoline. *Life Sci* 1995; 56(9):637-60.
- (36) Maier CM, Ahern K, Cheng ML, Lee JE, Yenari MA, Steinberg GK. Optimal depth and duration of mild hypothermia in a focal model of transient cerebral ischemia: effects on neurologic outcome, infarct size, apoptosis, and inflammation. *Stroke* 1998; 29(10):2171-80.



- (37) Shibano T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Shikama H, Hisano K, Hua Y. Effects of mild and moderate hypothermia on apoptosis in neuronal PC12 cells. *Br J Anaesth* 2002; 89(2):301-5.
- (38) Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N. Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathology* 2000; 20(4):273-82.
- (39) Krieger DW, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for acute ischemic stroke: what do laboratory studies teach us? *Stroke* 2004; 35(6):1482-9.
- (40) Adibhatla RM, Hatcher JF. Citicoline decreases phospholipase A2 stimulation and hydroxyl radical generation in transient cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2003; 73(3):308-15.
- (41) 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.
- (42) Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, Garcia AG, Roda JM. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience* 2003; 118(1):107-13.
- (43) Krupinski J, Lopez E, Marti E, Ferrer I. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2000; 7(4):332-42.
- (44) Nito C, Kamiya T, Ueda M, Arai T, Katayama Y. Mild hypothermia enhances the neuroprotective effects of FK506 and expands its therapeutic window following transient focal ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 1008(2):179-85.
- (45) Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 95(1-2):75-85.
- (46) 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.
- (47) 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):472-6.

- (48) Joshi CN, Jain SK, Murthy PS. An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts. *Brain Res Brain Res Protoc* 2004; 13(1):11-7.
- (49) Tureyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery* 2005; 57(6):1254-63.
- (50) Tureyen K, Vemuganti R, Sailor KA, Dempsey RJ. Infarct volume quantification in mouse focal cerebral ischemia: a comparison of triphenyltetrazolium chloride and cresyl violet staining techniques. *J Neurosci Methods* 2004; 139(2):203-7.
- (51) 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):193-5.
- (52) Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates* 2nd edition. California: Academic Press. *The rat brain in stereotaxic atlas* 1997.
- (53) Martinez-Vila E, Sieira PI. Current status and perspectives of neuroprotection in ischemic stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 2001; 11 Suppl 1:60-70.
- (54) Guo WP, Wang J, Li RX, Peng YW. Neuroprotective effects of neuregulin-1 in rat models of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2006; 1087(1):180-5.
- (55) 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):103-17.
- (56) Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2003; 29(5):472-81.
- (57) 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.
- (58) 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.

- (59) 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.
- (60) Ferrand-Drake M, Wieloch T. The time-course of DNA fragmentation in the choroid plexus and the CA1 region following transient global ischemia in the rat brain. The effect of intra-ischemic hypothermia. *Neuroscience* 1999; 93(2):537-49.
- (61) Inamasu J, Suga S, Sato S, Horiguchi T, Akaji K, Mayanagi K et al. Postischemic hypothermia attenuates apoptotic cell death in transient focal ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl* 2000; 76:525-7.
- (62) Arbit E, DiResta GR. Application of laser Doppler flowmetry in neurosurgery. *Neurosurg Clin N Am* 1996; 7(4):741-8.
- (63) Wechsler LR, Ropper AH, Kistler JP. Transcranial Doppler in cerebrovascular disease. *Stroke* 1986; 17(5):905-12.
- (64) Jieyong B, Zhong W, Shiming Z, Dai Z, Kato Y, Kanno T et al. Decompressive craniectomy and mild hypothermia reduces infarction size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after permanent focal ischemia in rats. *Neurosurg Rev* 2006; 29(2):168-72.
- (65) Chauhan N, Zhao Z, Barber PA, Buchan AM. Lessons in experimental ischemia for clinical stroke medicine. *Curr Opin Neurol* 2003; 16(1):65-71.
- (66) Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci* 1999; 19(14):5932-41.
- (67) Huang CY, Fujimura M, Noshita N, Chang YY, Chan PH. SOD1 down-regulates NF-kappaB and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(2):163-73.
- (68) Hu XM, Zhang Y, Zeng FD. Effects of beta-aescin on apoptosis induced by transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(10):1267-75.
- (69) Yenari MA, Iwayama S, Cheng D, Sun GH, Fujimura M, Morita-Fujimura Y et al. Mild hypothermia attenuates cytochrome c release but does not alter Bcl-2 expression or caspase activation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22(1):29-38.

- (70) Harrison DC, Davis RP, Bond BC, Campbell CA, James MF, Parsons AA et al. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 2001; 89(1-2):133-46.
- (71) Kader A, Brisman MH, Maraire N, Huh JT, Solomon RA. The effect of mild hypothermia on permanent focal ischemia in the rat. *Neurosurgery* 1992; 31(6):1056-60.
- (72) Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A. Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 1985; 5(3):413-9.
- (73) Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. The importance of brain temperature in cerebral ischemic injury. *Stroke* 1989; 20(8):1113-14.
- (74) Busto R, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD. Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke* 1989; 20(7):904-10.
- (75) Marion DW, Obrist WD, Carlier PM, Penrod LE, Darby JM. The use of moderate therapeutic hypothermia for patients with severe head injuries: a preliminary report. *J Neurosurg* 1993; 79(3):354-62.
- (76) Karibe H, Chen J, Zarow GJ, Graham SH, Weinstein PR. Delayed induction of mild hypothermia to reduce infarct volume after temporary middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosurg* 1994; 80(1):112-19.
- (77) Combs DJ, Dempsey RJ, Maley M, Donaldson D, Smith C. Relationship between plasma glucose, brain lactate, and intracellular pH during cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 1990; 21(6):936-42.
- (78) Goto Y, Kassell NF, Hiramatsu K, Soleau SW, Lee KS. Effects of intraischemic hypothermia on cerebral damage in a model of reversible focal ischemia. *Neurosurgery* 1993; 32(6):980-4.
- (79) Cowie DA. The role of hypothermia in neurosurgical patients. *Curr Opin Anaesthesiol* 2005; 18(5):496-500.
- (80) Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia. *Ann Neurol* 1990; 28(1):26-33.
- (81) Inuzuka T, Tamura A, Sato S, Kirino T, Yanagisawa K, Toyoshima I et al. Changes in the concentrations of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke* 1990; 21(6):917-22.

- (82) Baker AJ, Zornow MH, Grafe MR, Scheller MS, Skilling SR, Smullin DH et al. Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits. *Stroke* 1991; 22(5):666-73.
- (83) Ikonomidou C, Mosinger JL, Olney JW. Hypothermia enhances protective effect of MK-801 against hypoxic/ischemic brain damage in infant rats. *Brain Res* 1989; 487(1):184-7.
- (84) Baker CJ, Fiore AJ, Frazzini VI, Choudhri TF, Zubay GP, Solomon RA. Intraischemic hypothermia decreases the release of glutamate in the cores of permanent focal cerebral infarcts. *Neurosurgery* 1995; 36(5):994-1001.
- (85) Illievich UM, Zornow MH, Choi KT, Scheller MS, Strnat MA. Effects of hypothermic metabolic suppression on hippocampal glutamate concentrations after transient global cerebral ischemia. *Anesth Analg* 1994; 78(5):905-11.
- (86) Winfree CJ, Baker CJ, Connolly ES, Jr., Fiore AJ, Solomon RA. Mild hypothermia reduces penumbral glutamate levels in the rat permanent focal cerebral ischemia model. *Neurosurgery* 1996; 38(6):1216-22.
- (87) Chopp M, Chen H, Dereski MO, Garcia JH. Mild hypothermic intervention after graded ischemic stress in rats. *Stroke* 1991; 22(1):37-43.
- (88) Sutton LN, Clark BJ, Norwood CR, Woodford EJ, Welsh FA. Global cerebral ischemia in piglets under conditions of mild and deep hypothermia. *Stroke* 1991; 22(12):1567-73.
- (89) Yager J, Towfighi J, Vannucci RC. Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatr Res* 1993; 34(4):525-9.
- (90) Laptook AR, Corbett RJ, Burns D, Sterett R. Neonatal ischemic neuroprotection by modest hypothermia is associated with attenuated brain acidosis. *Stroke* 1995; 26(7):1240-46.
- (91) Okada Y, Tanimoto M, Yoneda K. The protective effect of hypothermia on reversibility in the neuronal function of the hippocampal slice during long lasting anoxia. *Neurosci Lett* 1988; 84(3):277-82.
- (92) Berntman L, Welsh FA, Harp JR. Cerebral protective effect of low-grade hypothermia. *Anesthesiology* 1981; 55(5):495-8.
- (93) Chopp M, Knight R, Tidwell CD, Helpert JA, Brown E, Welch KM. The metabolic effects of mild hypothermia on global cerebral ischemia and recirculation in the cat: comparison to normothermia and hyperthermia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9(2):141-8.

- (94) Van Hemelrijck A, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Ebinger G, Michotte Y. Post-ischaemic mild hypothermia inhibits apoptosis in the penumbral region by reducing neuronal nitric oxide synthase activity and thereby preventing endothelin-1-induced hydroxyl radical formation. *Eur J Neurosci* 2005; 22(6):1327-37.
- (95) Prakasa BP, Yoshida Y, Su M, Segura M, Kawamura S, Yasui N. Immunohistochemical expression of Bcl-2, Bax and cytochrome c following focal cerebral ischemia and effect of hypothermia in rat. *Neurosci Lett* 2000; 291(3):196-200.
- (96) Zhang S, Wang W. Altered expression of bcl-2 mRNA and Bax in hippocampus with focal cerebral ischemia model in rats. *Chin Med J (Engl )* 1999; 112(7):608-11.
- (97) Chen J, Zhu RL, Nakayama M, Kawaguchi K, Jin K, Stetler RA et al. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J Neurochem* 1996; 67(1):64-71.
- (98) Schabitz WR, Weber J, Takano K, Sandage BW, Locke KW, Fisher M. The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia. *J Neurol Sci* 1996; 138(1-2):21-5.
- (99) Bruhwiler J, Van dorpe J, Geczy J. Multicentric open-label study of the efficacy and tolerability of citicoline in the treatment of acute cerebral infarction. *current therapeutic research* 1997; 58(5):309-16.
- (100) Andersen M, Overgaard K, Meden P, Boysen G, Choi SC. Effects of citicoline combined with thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Stroke* 1999; 30(7):1464-71.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her türlü desteği veren Prof. Dr. E. Korfalı'ya, deneysel modeli öğrenmeye yardımcı olan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. K. Türeyen'e, çalışmalarımıdaki katkılarından ötürü Prof. Dr. İ.H. Ulus'a nöropatolojik değerlendirmeler sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ş. Tolunay'a, immunohistokimyasal süreçteki yardımlarından ötürü Uzm. Dr. Ş. Temel'e, istatistiksel çalışmalarda yardımını aldığım Gökhan Ocakođlu'na, kesitlerin fotoğraflanmasında değerli vaktini ayıran Veterinerlik Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. N. Özfiliz'e, deneysel aşamalarımın gerçekleşmesinde zamanımın büyük kısmını geçirdiğim Fizyoloji bölümünü evim gibi hissetmeme olanak sağlayan Prof. Dr. K. Özlük ve tüm Fizyoloji Anabilim dalı çalışanlarına ve en önemlisi kendisine çalışmamın her aşamasındaki içten ve sonsuz desteğinden ötürü minnet borçlu olduğum Doç Dr. T. Alkan'a teşekkür ederim.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1975 Bursa doğumluyum. Bursa Atatürk İlkokulu'nu bitirdikten sonra ortaokul ve lise öğrenimimi 1992 yılında Bursa Erkek Lisesi'nde tamamladım. 1998 yılında Eskişehir Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 2000 Nisan TUS Sınavı sonucu ile Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimine başladım. EANS Derneği'ne üyeyim. Evliyim. İngilizce biliyorum.