

GİRİŞ

Kısmi veya tam serebral iskemi ve buna bağılı olarak gelişen strok (inme) günümüzde dünya genelinde üçüncü sıklıkta gelen mortalite sebebidir (14). Ve tüm dünyadaki ölümlerin yaklaşık %10' undan sorumludur.

Dünya sağıık organizasyonu (WHO) strok için “hızla gelişen, serebral işlevlerin fokal veya global bozukluğına bağılı klinik sonuçlar olup, 24 saat veya daha uzun sürme yada ölüm gelişmesi” tanımını kullanmıştır. Strok, hemorajik veya iskemik kökenli olabilir. iskemik stroklar ise tüm strokların %90' ından sorumludur (7).

Serebral infarkt tabiri ile ise iskemik hasara bağılı beyinde oluşan histolojik bulguları anlamaktayız (138).

Strok ile mücadele için yapabileceklerimiz maalesef halen çok kısıtlıdır ve tüm dünyada bu konuda yoğun deneysel ve klinik araştırmalar yapılmakta, tedavi yaklaşımları denenmekte, iskemi ve fizyopatolojisi derinlemesine incelenmektedir.

Bu tez çalışmasında, ratlarda deneysel fokal serebral iskemi öncesinde verilen hiperbarik oksijen (HBO)' in ve deneysel fokal serebral iskemi sonrasında verilen aminoguanidin (AG)' in serebral infarkt hacmini küçülteceğı hipotezi test edilmiştir.

Bu tez çalışması GATA Mikrocerrahi Eğitim Merkezinde yapılmıştır.

GENEL BİLGİLER

SEREBRAL İSKEMİ

Tanım

Serebral iskemi beyin kan akımında azalma ve normal beyin metabolik fonksiyonlarına yeterli gelmeyen kan dolaşımını ifade etmektedir.

Nöral dokular sürekli enerji ihtiyacı içindedir ve bu esas olarak beyne gelen kan akımından sağlanmaktadır. Enerji ihtiyaçları karşılanamadığında çok çabuk hasarlanırlar ve bu enerji açığı uzarsa hasarlanma geri dönüşsüz hale gelebilir.

18. yüzyılda Monro serebral kan akımının devamlılığının gerekli olduğunu öne sürmüş ve 1890 yılında Roy ve Sherrington beyin damar yapısının önemini vurgulamıştır.

İnsan beyninde bir damar tıkanıldığı zaman o damarın beslediği sınırlı bir bölgede enerji ihtiyacı karşılanamamakta; iskemi ve bunun sonucunda da nekroz oluşmaktadır. Bu alana “iskemik çekirdek” denmektedir. Bu çekirdeği, perfüzyonu kollateral dolaşım ile korunan ve kan akımının daha fazla olduğu bir bölge sarar. Kollateral damarların yeterliliği, iskemik bölgenin büyüklük ve şiddetini etkilemektedir. Kollateral damarlardaki akım ise serebral perfüzyon basıncına bağlıdır. Böylece, sistemik arteriyel basınçtaki düşme, iskemik bölgenin genişliği ve şiddetinde önemli artış yapar. Etkili bir diğer faktörde iskeminin süresidir. Eğer çok kısa süre içinde reperfüzyon sağlanır ise nöronların fonksiyonu geri dönebilir. Kısa sürede reperfüzyon sağlanamaz ise, 10-12 ml/100gr/dk düzeyindeki kan akımında, oksijen seviyesinin yetersizliği nedeni ile mitokondriyal mekanizma inhibe, anaerobik glukoz metabolizması aktive olur. Böylece laktik asit düzeyi yükselip pH düşer ve intrasellüler-ekstrasellüler asidoz gelişir. İyon homeostazını sağlayan enerjiye bağımlı membran fonksiyonu giderek bozulur ve iyonik akımlar artar. Potasyum ekstrasellüler alana, sodyum, kalsiyum ve bunlarla birlikte suyun intrasellüler alana girişi başlar. Böylece ekstrasellüler potasyum artar, kalsiyum düşer, hücre membranı depolarize olur ve bunu hücre ölümü izler. Reperfüzyon olsa bile nöronların geçici serebral iskemik döneme dayanabilmeleri iskeminin derecesi ve süresine bağlıdır.

Yukarda belirtildiği gibi, beyinde aynı yada komşu alanı besleyen kollateral arterler mevcuttur ve bu oluşabilecek iskemiye karşı aynı zamanda bir koruma mekanizmasıdır. Oluşan iskemik çekirdek bölgesinin etrafında da kan akımı azalmasına bağlı olarak stres oluşmakta ve iskemik durum düzeltilmez ise bu

bölgeler zamanla geri dönüşümsüz hasara gidebilmektedir. Kan akımının azaldığı ancak kalıcı hasarın oluşmadığı bu bölgeye “ kurtarılabılır doku” yada penumbra adı verilir ve bu doku tedavide günümüzde temel hedeftir (96,99,121,122).

İskemi şiddetine ve yayılımına göre derecelendirilmektedir. Eğer tüm serebral alanlar etkilenmişse “ global iskemi” , belirli bir bölge etkilenmişse “ fokal serebral iskemi” tabiri kullanılmaktadır. Kan akım derecesine göre de komplet yada inkomplet olarak ayrılabilir. Eğer serebral kan akımı tam olarak kesilmemişse hipoksi oluşur ve bu duruma inkomplet serebral iskemi denmektedir. Kan akımı tam olarak kesilmiş ise anoksi oluşur ve bu duruma komplet serebral iskemi denmektedir. Ayrıca iskeminin süreside önemlidir. Kısa süreli iskemi sadece hassas nöronları etkilerken uzun süreli iskemi daha fazla sayıda hücre ve hücre tiplerinde etkili olmaktadır.

Serebral Kan Akımı ve Enerji Metabolizması

Beyne gelen kan akımı sayesinde oksijen ve glukoz temin edilmekte ve bunlarda nöronal elektriksel aktivite için gerekli olan adenozin trifosfat (ATP) sentezinde kullanılmaktadır.

Beyin vücut ağırlığının %2’ sini oluşturduğu halde metabolik olarak vücuttaki en aktif organlardan biridir ve bu aktiviteyi sağlayabilmek için zengin bir kan akımına gereksinim duyar. Erişkinlerde kardiyak output’ un normalde %15-17 kadarı beyne gider ve bu sayede akciğerler tarafından absorbe edilen oksijenin %20’ si kullanılır. Beyin total olarak dakikada 750-800 ml kan kullanıp 46 ml kadar da oksijen tüketimi yapmaktadır. Serebral kan akımı (SKA) miktarı 100 gram beyin dokusu için ifade edilir ve normalde 50 ml/dakikadır. Bu değer fonksiyonel aktivitenin arttığı bölgede daha yüksektir. Gri cevherde SKA ortalama 70-80 ml/100gr/dk. iken beyaz cevherde 30ml/100gr/dk.’dır. (7)

İskemik dokuda SKA’ nın 10-15 ml/100gr/dk’nın altına düşmesi durumunda ise dokuda nekroz oluşur ve fonksiyon kaybı irreversibl hale gelir.

Serebral iskemi ve strok’ ta yapılan SKA ve serebral metabolizma hızı (SMH) ölçümleri, strok fizyopatolojisine değerli anlayışlar getirmiştir. Beynin beslenmesinde en önemli etken serebral kan akımıdır. Serebral kan akımı, serebral perfüzyon basıncının (SPB), serebral vasküler rezistansa (SVR) oranıyla belirlenir (Formül 2.1).

$$SKA=SPB/SVR \quad (2.1)$$

Nöronal doku ve hücrelerin beslenmesi için gerekli olan serebral perfüzyon basıncını, kanı serebral sirkulasyona yollayan arteriyel basınç ile venöz dönüş basıncı arasındaki fark belirler. Ortalama serebral perfüzyon basıncı, yatar pozisyonundaki kişinin beyin tabanındaki ortalama arter basıncına eşittir ki bu değer; diastolik kan basıncı ile (yaklaşık 80 mmHg) nabız basıncının üçte birinin toplamının ($1/3 * \text{yaklaşık } 40 \text{ mmHg}$), intrakraniyal venöz basınçtan (yaklaşık 10 mmHg) çıkarılması ile elde edilen yaklaşık (80-85 mmHg) değeridir(Formül 2.2).

$$SPB= (\text{Diastolik AKB} + 1/3 \text{ Nabız basıncı}) - (\text{intrakranial venöz basınç}) \quad (2.2)$$

Normal koşullarda serebral perfüzyon basıncı sabittir. Fakat, sistemik arteriyel kan basıncını veya serebral venöz dönüşü etkileyen durumlar perfüzyon basıncını değiştirebilir. Sistemik arteriyel kan basıncı belirli bir değer altına düştüğünde veya intrakraniyal basınç arttığında, beyinde global olarak perfüzyon basıncı azalır. Serebral perfüzyon basıncının normal olduğu durumlarda, serebral kan akımındaki değişiklikler serebral vasküler rezistanstaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. Serebral kan akımında artma veya azalmaya neden olan serebral vasküler rezistans değişiklikleri, esas olarak intrakraniyal küçük çaplı arter veya arteriol çaplarının değişmesinden kaynaklanır. Damar dilate olduğunda hem serebral kan akımı hemde serebral kan volümü (SKV) artarken, damarlar konstrikte olduğunda her ikisi de azalmaktadır. (7)

Beyin, anaerobik yeteneği iyi ve yeterli bir organ değildir. Bunun nedenlerinden biri, nöronların metabolik hızlarının yüksek olması ve bunun sonucu hücrelerin ihtiyaç duyduğu enerjinin çok fazla olmasıdır. Diğer bir nedende, nöronlardaki depolanmış glikojen miktarının yetersiz olması ve glukozun anaerobik yıkımının çok fazla enerji sağlayamamasıdır. Beyin glikolitik yolla her bir mol glukoz için 2 mol ATP üretirken, aerobik metabolizma ile buna 36 mol ATP daha eklenmektedir. Beyinde glukoz oranı normalin çok üstünde olsa bile tek başına glukoz insan beyninin enerji ihtiyacını glikolitik yoldan karşılayamamaktadır. Beyindeki oksijen stoğunun önemsiz düzeyde olması ve glikolitik yoldaki bu

yetersizlik, beynin devamlı oksijen ihtiyacını açıklamaktadır. Sonuç olarak beyne belirli miktarda ve kesintisiz oksijen desteği gerekmektedir.

Normal dinlenme halindeki erişkin bir insanda 100 gr beyin dokusu 1 dakikada 3-3.5 ml oksijen tüketmektedir. Diğer bir deyişle, serebral oksijen metabolizma hızı ($CMRO_2$) 3-3.5 ml/100gr/dk veya tüm beyin için yaklaşık 49 ml/dk' dır.

Normal şartlarda 50-55 ml/100gr /dk düzeyindeki serebral kan akımı, hassas bir regülasyonla sabit olarak tutulur ki bu düzeyde nöronların ve diğer serebral hücrelerin fonksiyonları kesintisiz olarak sürer. Serebral kan akımı 20ml/100gr/dk'nın üzerinde olduğu sürece bir sorun beklenmez. Fakat bu düzeylerde Oksijen ekstraksiyon fraksiyonu maksimal olur ve $CMRO_2$ düşmeye başlar. Kortikal nöronal fonksiyonlar etkilenir ve EEG' de yavaşlama görülür. Serebral kan akımı 20 ml/100gr/dakikanın altına düştüğünde, beynin elektriksel aktivitesi yetersiz kalır ve nörolojik semptomlar ortaya çıkmaya başlar. Oksijen yetersizliğinden enerjide yetersizleşir ve normal hücre biyokimyası bozulur. ATP ve fosfokreatinin gibi yüksek enerjili fosfatlar hızla azalır. Hücre içi depolardan ve geri kalan kan akımından sağlanan az miktardaki artık glukozun anaerobik metabolizmayla yıkılması ile enerji sağlanmaya çalışılır fakat bu durum laktik asidozla sonuçlanır. SKA, yaklaşık 15 ml/100gr/dk düzeyine indiğinde kan akımındaki azalma ile orantılı olarak somatosensoryel uyarı potansiyeli (SEP) amplitüdlere düşmeye başlar ve 12 ml/100gr/dakikada SEP kaybolur. Değişik çalışmalarda farklı oranlar verilmekle birlikte, serebral kan akımı 10-12 ml/100gr/dk düzeyine indiğinde EEG izoelektrik hale gelir ve bu düzey irreversibl hücresel hasarın başladığı kritik eşik değeri olarak kabul edilir.

Etiyoloji

1993 yılında yayınlanan Trial of org 10172 in acute stroke treatment (TOAST) çalışmasında kullanılan iskemik strok sınıflandırması, görülme sıklığı ile etyolojiye de yer verdiğinden günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (1).

1. Geniş arter sklerozu (tromboz veya emboli): Tüm iskemik strokların % 50' si geniş arter sklerozuna bağlıdır. Bu durum özellikle ekstrakraniyal ve daha nadir olarak intrakraniyal damarlarda ve bunların bifurkasyon bölgelerinde, yıllar içinde gelişen aterom plaklarının

stabilizasyonlarının bozulması ile ortaya çıkan trombozlara bağı olarak gelişir.

2. Kardiyoembolizm: Tüm iskemik strokların % 20' sini oluşturan kardiyoembolizmde, arteriyel okluzyonun sebebi kalpten kaynaklanan embolilerdir.

3. Küçük damar oklüzyonu (lakuner infarktlar) : Genellikle hipertansiyon veya diyabeti olan yaşlı hastalarda ortaya çıkan bu strok tipi, tüm iskemik strokların % 25' ini oluşturur.

4. Diğer etyolojiler : Bu grupta, santral sinir sisteminin primer ve sekonder vaskulitleri, serebral amiloid anjiopati gibi nadir küçük damar hastalıkları, konjenital damar hastalıkları, travma, diseksiyon ve kan hastalıkları yer alır. Tüm iskemik strokların %5' inden az yer tutarlar

- a. Karotid arter travması
- b. Dissekan aort travması
- c. Arteriografi komplikasyonları
- d. Arterio-Venöz malformasyon (AVM)
- e. Rüptüre veya rüptüre olmamış sakküler anevrizma
- f. Arteritisler
- g. Meningovasküler sifiliz, piyojenik ve tüberküloz sifiliden sonra gelişen arteritis, postenfeksiyöz arteritler (tifüs, şistozomiyazis, sıtma, trişinosis v.s).
- h. Konnektif doku hastalıkları (poliarteritis nodosa, lupus eritematozis), nekrozitan arterit, takayaşu hastalığı.
- i. Hematolojik hastalıklar: Polisitemi, orak hücreli anemi, trombotik trombositopenik purpura, trombositoz.
- j. Tentoriyal, foramen magnum ve subfalsiyal herniasyonlar.
- k. Moyamoya hastalığı
- l. Multipl progresif intrakraniyal arteriyel oklüzyon
- m. Fibromuskuler displazi
- n. Radyoaktiviteye maruz kalma
- o. İntraserebral hematomların lateral basıncı
- p. Kapalı kafa travmalarında orta serebral arter infarktüsü

5. Sebebi bilinmeyenler

Fizyopatoloji

İskemiden sonraki dakikalar içerisinde, beyin dokusunda glukoz ve oksijen düşer ve asidoz metabolizmasında artış olur. Bu substratların kaybı ve pH seviyesindeki artış, mitokondrilerdeki elektron transport zincir aktivitesini durdurur. Sonuç olarak ATP konsantrasyonunda hızlı bir düşme olur. ATP kaybı, Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitesinde azalmaya sebep olur ve hücre içi Na^+ konsantrasyonunda artış olur. Devam eden depolarizasyon Ca^{++} un hücre içine girişine izin verir (138).

Yüksek intrasellüler kalsiyum seviyeleri sonucunda, intrasellüler ve ekstrasellüler oluşumlarda yapısal bütünlüğü etkileyen kalpain proteaz ve hücre membranlarını küçülten fosfolipaz aktive olur. Kalsiyum artışı ayrıca uyarılabilir nitrik oksit sentetaz (uNOS) yada bilinen adıyla *inducible NOS (iNOS)* aktivasyonunu ve salınımını hızlandırarak peroksinitrat oluşumunu arttırır ki peroksinitrat yüksek aktivasyona sahip serbest radikal türevidir.

Ca^{++} istilasası sonucunda, mitokondriler hasar görür ve buda enerji kaybını ağırlaştırır. Ca^{++} mitokondride direkt toksik etki oluşturur. Bunun sonucunda mitokondrilerde depolarizasyon ve şişme olur. Ek olarak, yüksek kalsiyum seviyeleri, serbest radikaller ve kalsiyum bağımlı kalpain aktivitesi ile mitokondriyal geçiş kapıları açılır ve mitokondilerden iyon ve sitokromlar (ki en önemlisi sitokrom C' dir), sitoplazmaya geçer. Sitokrom C ise muhtemel apoptozisi başlatır. Mitokondriler ayrıca eğer reperfüzyon sırasında yeterli oksijen varsa hem hücre hemde mitokondri için toksik olan serbest radikalleri oluşturur.

Hücrel hasarın miktarı büyük oranda doku glukoz konsantrasyonuna bağlıdır. Paradoksal olarak serebral infarkt hacmi doku glukoz seviyelerinde artış ile birlikte artış gösterir. Muhtemelen bu durum, glukoz miktarında artma sonrasında, glikolizisteki oksijen ihtiyacındaki artmayla paralel olarak pH seviyesinde ki düşme ile açıklanabilir (138). Strokta infarkt alanındaki bu genişleme hiperglisemi ile ilişkilendirilir (109) ve daha kötü nörolojik sonuçlara yol açar.(21). Bu duruma reperfüzyon hasarı denir.

İskeminin derecesi ve süresine bağlı olarak, kısa süreli ve minimal şiddetteki süreçler sadece geçici hücrel disfonksiyon oluşturabilir. Buda geçici iskemik atağın sebebidir. İskeminin daha ağır seviyelerinde, hücrel homeostaz bozulur ve hücre ölümü gerçekleşir.

Penumbradaki hasar çeşitli mekanizmalar aracılığı ile olur. Glutamat reseptörlerinin bloke edilmesinin penumbral hasarı azalttığı ve iskemik alanı küçülttüğünün gösterilmesi, penumbral infarkt alanı hakkında yeni yaklaşımlara ilham vermiştir (123). İskemik çekirdek ve penumbradaki glutamat reseptörleri muhtemelen iskemik çekirdekteki depolarizasyona bağlı yada direkt hücre hasarına bağlı olarak, iskemide hızla artar. Glutamat, N-Metil-d-aspartat (NMDA) reseptörlerini etkiler ve hücre içine kalsiyum akışı gerçekleşir. Glutamat ayrıca AMPA/ kainat reseptörleri ile etkileşir ve burada hücre içine Na^+ ve Ca^{++} girişi izler. Yine metabotropik reseptör (kuiskualat) ile etkileşerek, hücre içi cAMP' yi artırır ve protein kinaz aktivitesini, protelizisi ve lipolizisi etkiler. Sonuç olarak yeterli glutamat seviyeleri hücre için toksik olabilir (81).

İskemik çekirdekteki nöronların depolarizasyonu sonucunda glutamat penumbraya salınır ki buda penumbral nöronlara direkt toksik etkilidir. Bu durumda hücre içi yeterli miktarda kalsiyum artışı ile direkt nöronal hasar olabilir yada eğer bu artış yetersiz ise zaman içinde fonksiyonlar yeniden kazanılabilir.

Önemli bir noktada reperfüzyon evresinde, serbest radikallerdeki artışa bağlı olarak penumbradaki hasarda artış olmasıdır. (64). Serbest radikallerdeki bu artış kısmi hasarlanmış mitokondrilerde oksijen artışına bağlı olarak yüksek oranda açığa çıkmaktadır (127). Ayrıca hücre içi kalsiyumdaki orta derecedeki artış, uNOS sentezine öncülük eder ve tabi bunun sonucunda peroksinitrit yapımında artışla beraber gecikmiş vede uzamış ikincil hücre hasarı saatler yada günler içinde ortaya çıkar. Serbest radikaller, doymamış yağları radikal türlere dönüştürür ve bu şekilde membran lipitlerine hasar verdirerek serbest radikal oluşumunu artırır. Fosfolipaz A_2 lipit peroksidasyonu ile aktive olur ve membran lipitlerine zarar vererek geçirgenliği bozar. Serbest radikaller ayrıca direkt olarak özellikle membran kanallarında proteinleri etkileyerek, hücre içi kalsiyumun artışına ve mitokondriyal solunumun bozulmasına neden olurlar. Peroksinitrit ve diğer serbest radikaller, reperfüzyon sırasında penumbral bölgedeki nöronlarda tek sarmal DNA kırılması oluştururlar. Bu kırılma ile nükleer bir enzim olan ve DNA tamirinde rol alan poli adenozin difosfat riboz polimeraz (PARP) oluşur. PARP aktivitesi, nikotinamid-adenin dinükleotid (NAD^+) azalması ile artış gösterir ve hipoteze göre PARP arttığı zaman indirgenmiş NAD^+ seviyeleri baskılanarak hücrel enerji kaybına katkıda bulunur (64). PARP inhibisyonunda , infarkt volümünde azalma gözlenir fakat kalıcı

iskemide etkisi yoktur ki buda serbest radikallerin reperfüzyon injurisindeki rolünü destekler.

Nöronlardaki subletal injuri apoptozis oluşumunu belirler. Apoptozisin nasıl başladığı kesin olarak açıklanamamıştır fakat iki ana mekanizma etkilidir. Sitozolik sitokrom C artışı ve hücre içi artmış kalsiyum konsantrasyonu sonucu kalpain aktivasyonu. Sitokrom C, kaspaz aktivitesi oluşturur ki buda majör apoptotik enzimdir ve muhtemelen irreversibl şekle dönüşümü ilerletir.

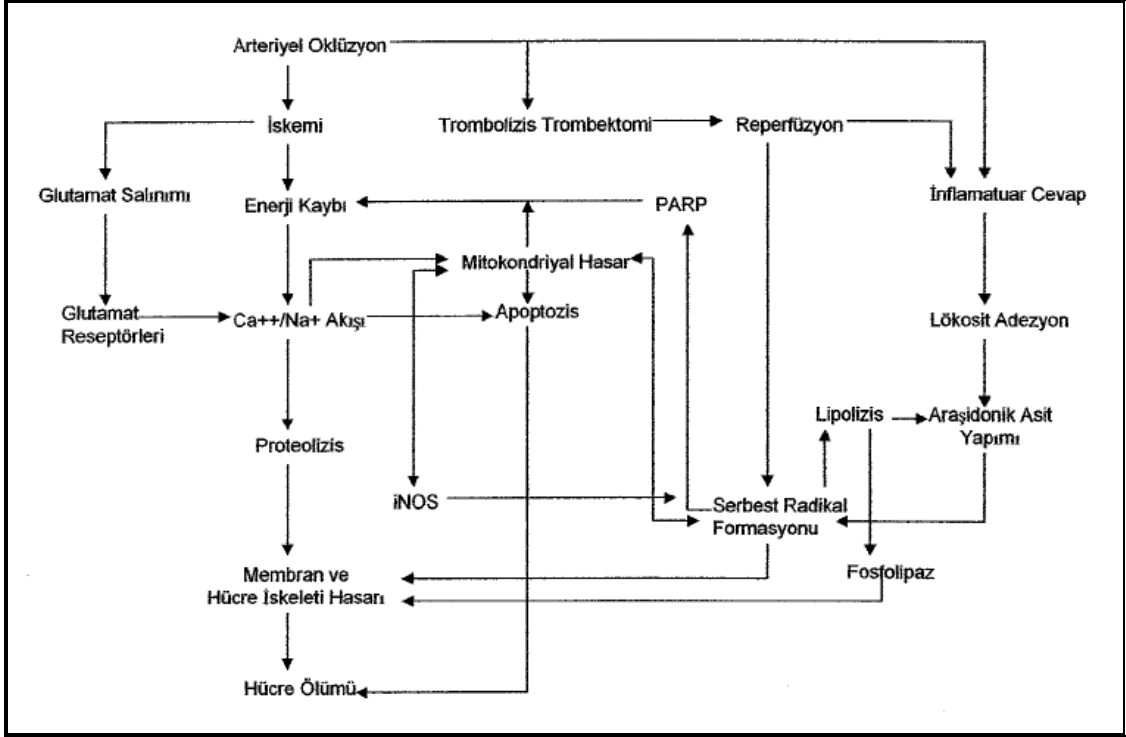
Hücrelerin apoptotik ölü hücreler haline geldiğini nükleer kromatin kümelerinden anlayabiliriz ve sonuçta DNA çift sarmalında kırılma oluşur. Buna karşın serbest radikallerin indüklediği tek sarmal DNA kırılması sonucunda oluşan PARP nekrotik hücre ölümüne öncülük eder. Zıt olarak nekrotik ölümden, hücrenin sitoplazma eosinofilik değildir, hücreler büzülmüştür ve etrafta ödem olmaz.

Nekrotik hücre ölümü ile apoptozis arasındaki en önemli fark apoptoziste enerji ve protein sentezinin gerekliliğidir (46). Çünkü apoptozis daha ileride gen transkripsiyonu ve protein sentezi gerektirir. Bu durum iskemik çekirdek yada penumbradaki yerleşimine göre hücre ölümünde önemli olabilir. Apoptozis, iskemik oluşum ile hücre ölümü arasında olduğundan iskeminin şiddeti ve süreside süreçte önemlidir. Apoptotik hücre ölümü 3. günden önce başlamaz ve 2 haftaya kadar sürebilir. İlginç olan ise bir kez başladığında durdurulamamasıdır. Fakat iskeminin erken safhalarında orta derecede hipotermi ile koruma sağlanabilir (48). Tabi ki hipertermi ile bu süreç hızlandırılır.

İskemi ayrıca beyin kapiller endotelyumuna hasar verir ve infarkt alanına nötrofil infiltrasyonu ile inflamatuvar süreci kışkırtır. Oluşan bu süreç tartışmalıdır (50). Fakat nötrofiller 24 saat içinde ortaya çıkar. Özellikle reperfüzyon modelinde lökosit artışının inhibe edilmesi ile infarkt alanında küçülme gözlenmiştir. Nötrofiller birçok mekanizma ile nörotoksik etkinlik gösterirler. NADP⁺ oksidaz tarafından serbest radikallerin oluşumu, uNOS tarafından NO oluşumu bunlar arasında sayılabilir. Ayrıca araşidonik asit oluşumuda daha çok serbest radikal yapımına etki eder (81).

Daha önce belirtildiği gibi beyin kan akımındaki azalma sonucunda enerji kaynakları tükenmekte ve nöronal hasarlanma oluşmaktadır. Kısıtlı enerji metabolizması nedeni ile iskemide en duyarlı bölge santral sinir sistemidir. En çok etkilenen bölgeler ise hipokampus, korpus striatum, motor korteks, pramidal nöronlar ve serebellum purkinje hücreleridir (21,47,81,138).

Fokal serebral iskemide oluşan majör olaylar ve mediatörler Şekil 2.1’ de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Fokal serebral iskemide majör olaylar ve mediatörler.

Wade ve diğ. (138)' den alınmıştır.

NİTRİK OKSİT

Nitrik Oksit Özellikleri

Nitrik oksit (NO) ilk olarak sigara dumanı ve inorganik kirli havada tespit edildi. Bilim adamları için makrofajların bakterisidal aktivasyonunda mediatör olarak rol alan bir molekül olduğunun keşfi sürpriz oldu.(87). NO ayrıca vazodilatör bir ajan ve sitotoksitede sinyal molekülü olarak görev almaktadır (108). Günümüzde NO yada diğer adı ile *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF), damar tonusu ve kan basıncı kontrolünde majör moleküllerden birisi olarak kabul edilmektedir (91). NO etkinliğini guanilat siklaz aktivasyonu ile siklik guanosin monofosfat (cGMP) üzerinden gerçekleştirmektedir.

Kalsiyum bağımlı yapısal nitrikoksit sentetaz (yNOS) yada diğer adıyla constitutive NOS (cNOS) tarafından oluşturulan NO, hücreler arasında kolayca geçerek etki eder. Demir ve tiyol grubuna yüksek afinitesinden dolayı, NO birçok hedef molekülü bağlar ve sellüler işlemleri modifiye eder (76). Yüksek miktarda sentezlendiğinde NO sitotoksik olabilir (41, 61). NO üretimi devam ettiğinde, kalsiyumdan bağımsız NOS' ın uyarılabilir izoformu (uNOS) makrofaj ve diğer inflamatuvar hücrelerde aktive olur (87). Ek olarak NO' ın bakterisidal ve tümörosidal etkisi de vardır (65). uNOS tarafından oluşturulan NO, multiple skleroz gibi hastalıklarda sitotoksik rol oynayabilir (16). Ayrıca uygun enerji koşullarında, nöronal NOS (nNOS), NO sentezini devam ettirir ve bu da nöronal ölümün bir parçasıdır (41,42). Bu hipoteze uygun olarak, hücre içi kalsiyumun kontrolsüz yükselmesi, yNOS öncülüğünde nNOS'ta artışa ve bu da NO konsantrasyonunun toksik seviyelere çıkmasına neden olur. İntrasellüler kalsiyum seviyeleri hızlı artış gösterdiğinde, uzamış NO üretiminin, iskemik nöronal hücre ölümünün bir parçası olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden bir çok iskemik modelde, iskemik hasarı azaltması umudu ile NOS inhibitörleri denenmiştir. Fakat yinede zıt sonuçlar rapor edilmiştir. Sonuç olarak NO mekanizmasının nöronal hücre ölümünde kompleks bir rol oynadığı gerçektir. Zira iskemik serebral kan damarlarını dilate ederek iskemik doku için hayati önemi olan kan akımını artırırken, aynı zamanda sitotoksik etkisi vardır. Bu ilginç ve zıt yönlü bir etkidir (39). Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, nNOS ve eNOS' u kodlayan genlerde oluşan delesyon sonucunda NO mekanizması incelenmiştir. Bu çalışmaların sonucunda, nöronlardan üretilen NO' ın iskemik hasarı arttırdığı, endotelden salınan NO' ın ise tersine iskemik hasarda faydalı olduğu düşünülmektedir

Bu sebeple non selektif NOS inhibitörleri, NO' ın bu zıt etkileri yüzünden iskemik durumlarda sağlıklı bir değerlendirme yapmamızı engellemektedir. . Bu tez çalışmasında kullanılan AG ise relatif selektif bir uNOS inhibitörüdür ve uzamış dönemde hücreler için toksik olan NO seviyelerini ve dolayısı ile iskemik hasarı azalttığı düşünülebilir.

Nitrik Oksit Sentezi ve Metabolizması

NO L-arginine ve moleküler oksijenden NO sentaz (NOS) tarafından sentezlenir. NOS' ın 3 izoformu tespit edilmiştir. Nöronal (tip 1) ve endotelial (tip3)

ki bunlar yapısal NOS (yNOS) olarak adlandırılır. Uyarılabilir izoform (uNOS) (tip2) ise ilk olarak makrofajlarda gösterilmiştir (19). uNOS karakteristik olarak insan hepatositleri ve artikuler kondrositlerde belirgindir (57). Bütün izoformların, kalmudulin bağlayıcı bölge tarafından ayrılan redüktaz ve oksijenaz etkisi vardır. Reaksiyon NADPH' a ihtiyaç duyar. Redüktazın aminoasit dizilimi, sitokrom p450 redüktaz' ınkine çok yakın homologdur (18). Her üç izoenzimde NADPH-diaforaz aktivitesini etkiler ve bunun varlığı NOS' ın lokalizasyonunu anlamada kullanılır (17).

Yapısal izoformlar (eNOS ve nNOS), kalsiyum/kalmudulin bağımlıdır ve intrasellüler kalsiyum geçişi ile aktive edilir. İntrasellüler kalsiyumdaki 100 nMol' den 500 nMol' e bir artış NO sentezini %5' in altından %95' in üzerine çıkarır (75). Bu Ca^{++} duyarlılığı kalmudilin aktif enzim içinde tipiktir. Diğer taraftan, kalmudulin uNOS formuna sıkıca bağlıdır ve buda enzimi stoplazmik kalsiyum dalgalanmalarına karşı duyarsızlaştırır (32). Normalde makrofajlarda NOS aktivitesi gösterilemez ve endotoksin ve sitokinler tarafından uNOS gen transkripsiyonunun stimülasyonunu gerektirir. Bir kez salındığında uNOS sürekli aktiftir ve NO saatlerden güne kadar değişen sürede kalıcı olarak salınır. Kalsiyum bağımlı NO sentezinde ise kalıcılık birkaç dakikadır (86). Bu konuda yapılan çalışmalarda birbirine yakın sonuçlar bulunmuştur. Fakat iskemi tedavisindeki etkinlik açısından bu zamanlamanın iyi tespit edilmesi gereklidir. Bazı yayınlarda uNOS aktivitesinin iskemik beyin dokusunda 24-96 saatleri arasında olduğu belirtilmiş (9,70), yapılan bir başka çalışmada ise uNOS aktivitesinin 6 saatte başlayıp 12 saatte pik yaptığı ve 3. gün sonunda azalarak kaybolduğu bildirilmiştir.(67).

Nitrik Oksit' in Moleküler Mekanizması

Hem grubu ile ilişkisi

NO Hem ile birleştikten sonra, Hem içeren enzim guanilat siklaz aracılığı ile cGMP üzerinden etkinliğini gösterir.(92).

Asetilkolin ve bradikinin gibi vazodilatör mediatörler, intrasellüler kalsiyumu arttırır ve eNOS aktivitesini sitümüle ederler. NO ise cGMP' yi çoğaltarak vasküler düz kaslarda gevşemeyi başlatır (75).

Tiyol grubu ile ilişkisi

NO tiyol grubu ile reversibl olarak tepkimeye girer ve bazı proteinlerin aktivasyonuna aracılık eder (124). Ayrıca NO' in antimikrobiyal etkileride mevcuttur. NMDA reseptör aktivitesinin inhibisyonu, ADP-ribozilasyonunun regülasyonu, ve gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz' ın inhibisyonu bunlara örnektir (20). Fizyolojik koşullarda nitrik oksit 3 redoks formundan birisine çevrilebilir. Bunlar nitrozonyum (NO^+), nitrik oksit (NO) ve nitroksil anyon (NO^-)' dur. Bu redoks formlar farklı reaksiyonları destekler. Örneğin; NO guanilat siklaz aktivasyonu için gereklidir ve nörotoksik etkilidir ama NO^+ , NMDA reseptör aktivitesini azaltır ki buda nöroprotektif etki sağlar. Ayrıca NO, salınan izoformuna bağlı olarak zıt etkide gösterebilir. Örneğin; sodyum nitropurisiat NO^+ oluşturarak nöronları koruyucu etki gösterebilir ya da sistein ile indirgenerek NO' e dönüşmesi sonucunda toksik etkili olabilir. Sonuç olarak değişik patolojik koşullarda, farklı etkilere sahip bir molekül olduğu açıktır (125).

Nitrik Oksit İnhibisyonu

Birçok araştırmacı NOS inhibitörlerini NO' in patolojik koşullardaki rolünü algılayabilmek için kullanmıştır. Ençok tercih edilenler L-arjinin substrat analoglarıdır. Örneğin nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), nitro-L-arjinin (L-NA) ve monometil-L-arjinin (L-NMMA). L-arjinin ve moleküler oksijenin sitrulin' e dönüşümü ile NO kompetitif olarak inhibe olur ise de tedavi dozu ve zamanlamasına bağlı olarak non-kompetitif inhibisyon oluşabilir (93, 112). NOS aktivasyonu gibi inhibisyonuda enantiomeriktir.

L-NAME, L-NA ve L-NMMA yapısal ve uyarılabilir enzimlere etki eder ve endotelial ve nöronal izoformlar arasında ayırım göstermez (104).

Aminoguanidin ise relatif spesifik uNOS inhibitörüdür ve birçok patolojide rolü olduğu düşünülen uNOS' un inhibisyonu için denenmektedir (90). Fakat bu selektivitesinin moleküler esasları halen açık değildir ve birçok farklı enzimle etkileşebilmektedir.

Nitrik Oksitin Beyindeki Fonksiyonu

Nöronal aktivitenin kontrolü

NO ve cGMP artışı nöronal aktivite sırasında beyindeki serebellum, hipokampus, serebral korteks gibi birçok bölgede mevcuttur (55). Glutamat bağımlı intrasellüler kalsiyum artışında, NMDA reseptörleri aracılığı ile NO ve cGMP seviyesinde artış gözlenmektedir (56). Son çalışmalar, cGMP' nin direkt olarak hücre kanallarına etki ettiğini ve ayrıca cGMP bağımlı protein kinaz ve fosfodiesteraz modülasyonu ile bir çok farklı hücresel işlevde rol aldığını göstermiştir (55). Sinaptik aralıkta NO bağımlı cGMP artışını gösteren başka kanıtlarda mevcuttur.

Kan akımının kontrolü

NOS inhibitörlerinin topikal yada sistemik uygulanması serebral arterleri daraltır ve serebral kan akımını azaltır (51). Buna paralel olarak L-arjinin' in intravenöz uygulanması rat serebral arterlerinde vazodilatasyona yol açmıştır (94). NO' in ayrıca orta derecede hiperkapnide kan akımı artışına aracılık ettiği ileri sürülmektedir (110). Hem nöronal NO' in hemde endotelial NO' in vazodilatör etkisi olduğu gösterilmiştir (83)

Nitrik oksit aracılıklı nörotoksisite

Genelde eğer artmış miktarlarda NO yapılırsa komşu hücreleri öldürmektedir (17). NO, akonitaz ve mitokondriyal elektron transport kompleks I ve II' yi inhibe ederek mitokondriyal solunumu bozmakta ve hücre sel sitotoksisiteye sebep olmaktadır. NO' in bu enzimler üzerindeki etkisi, demir-NO kompleksi üzerinden olmaktadır. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz' ın NO tarafından inhibisyonu, hücre içi glutatyon seviyelerini azaltarak ve glikolizisi baskılayarak zararlı sonuçlara yol açmaktadır.(20)

Ek olarak hücre sel metabolizmanın bozulmasıyla NO, ribonükleotid redüktaz aktivitesini baskılayarak DNA sentezini inhibe etmektedir (79). NO ayrıca DNA nitrasyon, deaminasyon ve oksidasyonu yolu ile DNA yapılarına birçok farklı

yoldan hasar vermektedir (82).Diğer taraftan programlanmış hücre ölümünde, NO mediatörlerden birisi olabilir. NO' in kondrositlerde ve makrofajlarda apoptozise yol açtığı gösterilmiştir. Apoptotik hücre ölümü global ve geçici fokal iskemide gösterilmiştir (84).

Mevcut kanıtlar NO' in süperoksit anyonu ile ilişkiye girerek peroksinitrit oluşturduğunu ve NO aracılıklı hücre ölümünde asıl yolun bu olduğunu göstermektedir (78). Peroksinitrit ayrıca diğer reaktif oksijen türevlerini, hidroksil radikallerini açığa çıkarır ki bunlar lipid peroksidasyonunda etkilidirler. Peroksinitrit ayrıca özellikle süperoksitten zengin ortamlarda, proteinlerin S-nitrolizasyonunu kolaylaştırır. NO intrasellüler demiri serbestleştirmek sureti ile *Haber-Weiss* reaksiyonunu tetikler ve reaktif oksijen türevlerini oluşturur (61).

Özet olarak NO' in hayati hücresel fonksiyonları idame ettiren enzimleri inhibe etmek sureti ile yada DNA sentezi inhibisyonuyla ayrıca tiyol gruplarına ve demire olan afinitesi vasıtasıyla direkt olarak sitotoksik etki gösterdiğini veya indirekt olarak peroksinitrit aracılığı ile yada demir salınımı ile sitotoksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. Farklı patolojik koşullarda farklı sitotoksik mekanizmalar baskın çıkabilir. Örneğin; oksijenin ve süperoksit üretiminin mevcudiyetine bağlı olarak, NO toksisitesi kalıcı ve geçici fokal iskemi arasında farklılık gösterir ve ayrıca iskeminin erken ve geç fazı arasında NO üretimi, yNOS yada uNOS tarafından değişkenlik gösterir.

Nitrik Oksit ve Serebral İskemi

İskemi sırasında intrasellüler kalsiyum artışına bağlı olarak yNOS aktivitesinin arttığına inanılmaktadır. NOS aktivitesi hücre içi kalsiyum tarafından istirahat seviyesinin hafifçe üzerinde aktive edilir ve 0.5 mikromol' de maksimal sitümüle edilir. Özellikle fokal iskemi sırasında, nöronlarda tamamı ile aktif olduğu düşünülmektedir(10-100mikromol) (75). Porfrinik mikrosensör kullanılarak yapılan ölçümlerde orta serebral arter oklüzyonu (OSAO)' dan 3-24 dakika sonra NO seviyelerinde 10 nanomol' den 2.2 mikromol' e artış gösterilmiştir (85). Beyin nitrit (stabil NO metabolit) ve cGMP seviyeleri ayrıca iskemiden sonraki ilk yarım saatte yükselmiştir. Elektron paramanyetik rezonans çalışmaları da iskemi sırasında artmış NO seviyelerini göstermiştir (118).

nNOS' taki artış 4 saatte maksimuma ulaşmakta ve OSAO' dan sonra 7gün devam etmektedir (151). Bununla birlikte eNOS aktivitesi iskeminin başlangıcından kısa süre sonra azalmaktadır (73).

NOS aktivitesi iskemik çekirdek ve penumbra da farklı olabilir. Özellikle depresyon dalgaları sırasında penumbradaki residüel oksijen varlığı, NO sentezinde patlama yapabilir (58). Bununla birlikte iskeminin başlangıç evresinde açığa çıkan NO bile, zaten tehlikeli durumda olan hücre metabolizması ve DNA sentezine zarar vermektedir (40).

Nöronlar, perivasküler sinirler ve serebrovasküler endotelyum serebral iskemi sırasında NO oluşturabilir. Geç fakat güçlenmiş NO seviyelerindeki artış uNOS salınımına bağlı olarak mikroglia ve inflamatuvar hücrelerden, iskeminin oluşumundan 6-72 saat sonrasında oluşmaktadır (66,68). Burada önemli nokta iskemiye izleyen erken dönemde vasküler endotelyum ve perivasküler sinirlerde ani artış gösteren NO üretiminin, kan akımını geliştirebilmesi ve nöroprotektif etkili olabilmesidir. Gerçektende L-arjinin infüzyonunun, NO bağımlı mekanizma ile pial damarları genişleterek serebral kan akımını arttırdığı ve iskemi alanında küçülmeyi sağladığı bildirilmiştir (94). L-arjinin' in doku koruyucu ve kan akımına olan etkileri iskemiden sonra NO üretimi ve NOS aktivitesindeki düşüşle paralel olarak azalmaktadır (73,85). NO bağlayıcı protein guanilat siklaz' ın iskeminin etkilerine NOS' dan daha güçlü ve dirençli olduğu gözükmemektedir. Bundan dolayı, intrakarotid NO türevi uygulamalarında, en azından arteriyel oklüzyondan 1 saat sonraya kadar iskemik dokuda kan akımını arttırmakta ve fokal iskemi alanını azaltmaktadır(149). Kan akımındaki artışa ek olarak, endotelyal NO' in üretimi mikrosirkülasyonda platelet agregasyonunu ve lökosit adezyonunu azaltmaktadır. Fokal serebral iskemideki NOS inhibisyonunun nöroprotektif etkisinden dolayı durum oldukça karışık ve komplekstir. Ancak yapılan çalışmalarda selektif nNOS inhibitörü 7-nitroindazol(145) yada ARL-17477' nin (152) nöroprotektif etkisi bildirilmektedir.

Sonuç olarak denebilir ki, iskeminin erken döneminde üretilen aşırı miktarda nNOS ve nispeten daha geç dönemde oluşan uNOS hücre için toksik olurken, eNOS dokuları koruyucu etki gösterebilmektedir.

AMİNOGUANİDİN

AG (CH_6N_4), bir çok farmakolojik olayda rol oynayan hidrazinkarboksiimidamid grubundan bir moleküldür. Oral yada intraperitoneal uygulaması sonrasında yüksek biyoyararlanımı vardır.

Genellikle böbreklerden değişmeden atılır ve tahmini yarılanma ömrü 4.4 saattir (53). Glikolizasyon son ürünler ile etkileşerek kronik doku hasarını geciktirme yeteneği diabet hastalığında klinik olarak denenmektedir. Son zamanlarda bir çok hayvan deneyi sonucunda kortikal injuri ve iskemide nöroprotektif etkisi keşfedilmiştir (37,141,147). AG' in normalde kan beyin bariyerini geçmesi kolay değildir fakat iskemi sırasında kan beyin bariyerindeki permeabilite artışına bağlı olarak küçük hidrofilik moleküllerin geçişinin kolaylaştığı düşünülmektedir (9). Halen AG' nin nöroprotektif etkisi kesin olarak açıklanamamıştır. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalar sonucunda öncelikle relatif selektif uNOS inhibisyonu ile faydalı etkilerinin olduğu düşünülmektedir (60,68,69,139). Ayrıca toksik etki oluşturan bir enzim olan doku poliamin oksidaz (PAO) inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (22). İskemiden sonraki erken dönemde verildiğinde PAO inhibisyonuna bağlı olarak, 24 saatten sonra verildiğinde ise uNOS inhibisyonu ile etki ettiği belirtilmektedir (148). AG' in uygulanma süresi ve başlangıç zamanı hakkında tam bir fikir birliğine varılamamıştır. Daha önce bahsedildiği gibi NO beyinde önemli bir nörotransmitterdir fakat patolojik durumlarda toksik rol oynadığı kesindir. NO mekanizmasında bahsedildiği gibi uNOS iskemiden sonraki geç dönemde aktive olmakta ve uzun süre etki göstererek NO sentezi artışı sebebi ile hücreler için toksik etki göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda uNOS' ın enzimatik aktivitesinin 48 saat' te maksimuma ulaştığı ve 7 gün içinde azalarak kaybolduğu düşünülmektedir (68). Iadocola ve diğ. ise uNOS' ın iskemiden sonra 12 saat' te pik yaptığını ve 4 gün içinde azalarak kaybolduğunu bildirmiştir (67).

Sonuç olarak bu tez çalışmasında ratlarda oluşturulan fokal iskemiden sonra , selektif bir uNOS inhibitörü olan AG uygulamasının, NO sentezindeki azalmaya bağlı iskemik hacmi küçülteceği düşünülmektedir.

HİPERBARİK OKSİJEN

Hasta veya deneğe tamamen kapalı olan bir basınç odasında, 1 atmosfer basınçtan (ATA) daha yüksek basınçta, %100 oksijen solutulmasına HBO uygulaması denir.

1 ATA 760mmHg'ya eşittir. Bir manometre tarafından kapalı bir ortamda ölçülen basıncın gerçek değerini bulabilmek için kapalı ortamda ölçülen basınca dışarıda bulunan atmosferik basıncın da eklenmesi gereklidir (106).

Gazlar vücut sıvılarında çözündüklerinde, gaz halinde iken uyguladıkları basınçlardan farklı değerlerde basınç uygularlar. Her sıvının farklı çözünübilirlik katsayısı vardır ve bu katsayı ısı ile ters orantılı olarak değişmektedir. Buna göre vücut ısısı sabit kabul edilirse; vücut sıvısı içinde çözülmüş halde bulunan bir gazın basıncı, o gazın konsantrasyonu ve çözünübilirlik katsayısı arasındaki oran ile ilgilidir.

Normal atmosferik basınç altında kanda sadece sınırlı miktarda oksijen çözünürken hiperbarik bir ortamda daha fazla oksijen çözünebilir. Örneğin; 1 ATA' da normal hava solunduğunda kanın 100 ml' sinde 0.32 ml olan çözülmüş oksijen miktarı, 3 ATA' da %100 oksijen solunduğunda 6.8 ml' ye kadar yükselir (71).

Dokularda hiperbarik oksijenin terapötik etkileri saf mekanik etki ve yüksek pO₂ etkisi ile meydana gelmektedir.

2.8 ATA' da %100 O₂ ile doku oksijenlenmesi 10-15 kat artar. Bu yüksek doku oksijen seviyeleri HBO tedavisi kesildikten sonra da 0.5 - 4 saat kadar devam eder (106).

İskemik saldırının ortaya çıktığı ilk dönemde (kanlanmanın kesildiği dönem) hücrel metabolizmanın devamı için gerekli olan oksijenin hemoglobinden bağımsız bir yol ile temin edilmesi ve enerji krizinden dolayı ortaya çıkan hücrel ödemin (Na⁺-K⁺ ATPaz inaktivasyonu) önlenmesi son derece önemlidir.

1965' ten günümüze HBO' in serebral iskemide kullanımı konusunda klinik ve hayvan modellerinde çeşitli araştırmalar yapılmıştır (4).

İnfarakt alanının küçültülmesi yönünden önemli kriterlerden biri olan neovaskülarizasyon için en önemli uyarının doku hipoksisi olduğu kabul edilir. HBO' in ilk bakışta doku hipoksisini ortadan kaldırdığı için neovaskülarizasyonu engelleyeceği akla gelebilir. Ancak yapılan çalışmalar HBO' in anjiogenezis ile

ilgili en önemli genlerden biri olan angiogenin 1 ve 2' nin ekspresyonunu arttırdığı yönündedir (34,80).

Neovaskülarizasyon için doku düzeyleri son derece önemli olan ve en spesifik faktör olarak kabul edilen Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) düzeyleri de HBO uygulamaları ile artmaktadır (119). Hiperoksiden beklenenin aksine HBO' in bu vaskülarize edici özellikleri doku iyileşmesine olan etkileri ile infarkt alanının küçültülmesi ve/veya sınırlandırılmasına katkıda bulunabilir. Benzer bir sorunun olduğu cerrahi alan deri fleplerinin yaşayabilir bölümünün artırılması ve flep sörvisinin uzatılmasında HBO' in olumlu etkileri görülmüştür (116).

HBO' in bilinen doku düzeyindeki bu yararlı etkilerinin yanında moleküler düzeyde, özellikle NO' e bağlı yollar üzerinden bir takım mekanizmaları harekete geçirdiği kabul edilmektedir. HBO' in gerek beyinde gerek diğer dokularda NO seviyelerini arttırdığı iyi bilinen bir gerçektir. Hatta 4 ATA basınçtan itibaren görülmeye başlayan motor anormalliklerden bu NO sentez artışı sorumlu tutulmaktadır (44,49). Ancak 3 ATA üzeri basınçlar zaten tedavi amaçlı kullanılmamaktadır. Hem AG hemde HBO' in NO üzerinde önemli etkileşimleri olduğu için NO ayrı bir başlık altında incelenmiştir.

Hücresel düzeyde inceleyecek olursak HBO uygulamasının terapötik etkinliği konusunda çeşitli varsayımlar öne sürülmüştür. Marjinal bölgedeki perfüze olan hücrelere oksijen desteğini arttırdığı (135), lipid peroksidasyonunu agrave etmeden iskemik perifere oksijen desteğini arttırarak infarkt volümünü azalttığı (126), iskemik nöronal hasara karşı iskemiye toleransı arttırdığı (111,137), post iskemik injuride nötrofil sekestrasyonunu inhibe ederek faydalı olduğu (3), iskemik dokudaki oksijenasyonu arttırmasına bağlı olarak ve arteriyel oksijen içeriğindeki artışa bağlı sitümüle olan aerobik mekanizma ile faydalı olabileceği (140) yada dopamin (DA) salınımının inhibisyonu ile faydalı etkileri olduğu bildirilmiştir (142). Yine ilginç olarak HBO uygulamasından sonra, azalmış glutamat konsantrasyonu striatal mikrodializ yöntemi ile ölçülmüştür (4).

HBO' in potansiyel terapötik kullanımı konusunda gerek hayvanlarda (3,4,28,111,126) ve gerekse insanlarda (2,62,101,102) çalışmalar yapılmasına rağmen halen daha HBO' in iskemi tedavisindeki kullanımı konusunda bir fikir birliğine varılamamıştır (102).

Kawamura ve diğ. (74) ile Veltkamp ve diğ. (135), iskemi periyodu sırasında uygulanan HBO' in iskemik alanı küçülttüğünü ve nörolojik defisiti azalttığını bildirmişlerdir.

Ağır beyin hasarlı hastalarda yapılan son çalışmalarda HBO' in mortalitede %50 gibi bir azalma sağladığı gösterilmiştir (113).

Ama Roos ve diğ. (114), iskemiden sonraki reperfüzyon aşamasında uygulanan HBO' in yararlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Yine daha önceden normal basınç altında verilen %100 oksijenin iskemik alanı küçültücü etkisi olduğunu bildiren yayınlar var iken (52,101,126) son yapılan çalışmalarda ise HBO' in buna göre daha üstün olduğu bildirilmektedir (133).

Undersea and Hyperbarric Medikal Society adlı toplulukta HBO uygulamasının 2,4 ile 3.0 ATA arasında uygulanmasının optimal olduğunu bildirmiştir (30). Badr ve diğ. (4), ratlarda 3.0 ATA ile 1 saatlik HBO uygulamasının optimal olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmada da 2.8 ATA ile 45 dakikalık bir uygulama yapılmıştır.

Bu bulgular ışığında HBO tedavisinin eğer zamanlama ve dozu doğru seçilirse faydalı olabileceği söylenebilir. Daha önce belirtildiği gibi iskemide, çekirdek ve kurtarılabılır bölge olarak 2 bölge mevcuttur. Çekirdek bölgede kan akımı tamamen durmuştur. Bu bölgede HBO tedavisi etkili olmayacaktır fakat kurtarılabılır bölge dediğimiz kan akımının kısmende olsa sağlanabildiği bölgede HBO tedavisinin iskemi ilerlemeden yani erken dönemde verilmesinin etkisi olabilir. Böylece HBO, hücresel kontrol mekanizmasının düzeltilmesi ve vasküler yenilenmeyi, doku oksijenlenmesinin bu dönemde sağlanması ile tetikleyebilir (4).

GEREÇ ve YÖNTEM

Gereçler

Bu çalışmada yetişkin, 28 adet 200-320 gram ağırlığında *Sprague-Dawley* türü rat kullanılmıştır. Ratlar Gülhane Askeri Tıp Akademisi Komutanlığı Hayvan Deneyleri Etik Kurulu' nun 17 mart 2006 tarih ve 06/39 sayılı izni ile Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Merkezi' nden, tedavide kullanılan HBO kabini Fizyoloji AD tarafından ve yine tedavide kullanılan AG piyasadan alımla sağlanmıştır.

Çalışmada kullanılan cihaz ve maddeler:

1. Mikroşirurji aletler (Şekil 3.1)
2. Ameliyat mikroskopu (*Zeiss OPMI-I, Made in Poland*) (Şekil 3.2)
3. Dişçi drili
4. Dijital fotoğraf makinesi (*Nikon Corporation Coolpix 4300 Tokyo- Japan*)
5. HBO kabini: Fizyoloji AD' dan sağlanmıştır. Optimal etkinin oluşması için iskemi oluşturulmadan 2 saat önce 2.8 ATA basınçta 45 dakika süre ile uygulanmıştır. (Şekil 3.3).
6. Bakteriyolojik etüv (inkübatör): Elektro-Mag 420 BP
7. Aminoguanidine (AG) hemisulfat tuzu (SIGMA A 7009-25G): 100 mg/kg (1 ml salin içinde çözölmüş) AG dozu günde 2 kez verilmiştir. Daha önceki çalışmalarda bu dozun Ca^{++} bağımlı nNOS' u etkilemeden uNOS' u selektif inhibe ettiğı, serebral kan akımını etkilemediğı gösterilmiştir (69, 148)
8. 2,3,5 triphenyltetrazolium choloride (TTC): Toz halindedir. Işıktan ve sıcaklıktan zarar görmektedir ve bu sebeple buzdolabında saklanmalıdır. Herbir boyama çalışmasından önce %2' lik oranda tekrar hazırlanmalıdır. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra kesitler %10' luk formol içinde saklanabilir. Kesitler formale konduktan 10 dakika sonra fotoğraf çekilmeye hazır hale gelirler. Kesitler boyama işlemi sırasında karanlıkta bekletilmelidir. Buna rağmen yaklaşık 1 ay sonra pembe renk

solmaya başlar ve 2 ay sonra boya tamamen kaybolur. Bu sebeple fotoğraflar iyi bir görüntü için en kısa sürede çekilmelidir.

9. 2 mm' lik rat beyin kesme aparatı (Harvard Apparatus 407837 Catalog No 62-0048) (Şekil 3.4)



Şekil 3.1. Mikroşirurji Aletler.



Şekil 3.2. Ameliyat Mikroskobu



Şekil 3.3. Hiperbarik oksijen kabini.



Şekil 3.4. Rat beyin kesme aparatı.

Çalışmada kullanılan 28 adet *Sprague-Dawley* (200-320 gram) rat 4 gruba ayrılmıştır.

1. Kontrol grubu: 7 adet sadece OSAO yapılan grup
 2. HBO grubu: 7 adet OSAO yapılan ve oklüzyondan 2 saat önce 2.8 ATA basınçta 45 dakika HBO uygulanan grup
 3. HBO+AG grubu: 7 adet OSA oklüzyonu yapılan ve oklüzyondan 2 saat önce 2.8 ATA basınçta 45 dakika HBO uygulanan ve oklüzyondan 6 saat sonra başlanan ve günde iki kez olmak üzere 72 saat süre ile intraperitoneal AG hemisulfat (Sigma 100 mg/kg 1 ml salin ile sulandırılmış) uygulanan grup
 4. AG grubu: 7 adet OSAO yapılan ve oklüzyondan 6 saat sonra başlamak üzere 72 saat süre ile günde iki kez intraperitoneal AG hemisulfat (Sigma 100 mg/kg 1 ml salin ile sulandırılmış) uygulanan grup
- Çalışmanın başlangıcından önce su ve yiyecek kısıtlaması yapılmamıştır.

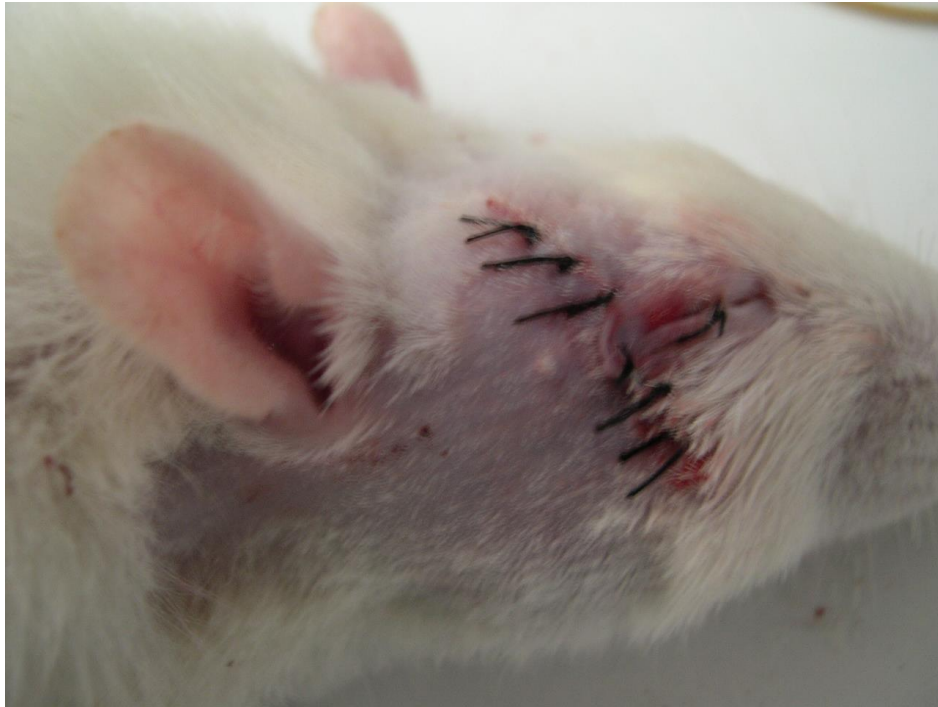
Operasyon

Anestezi intramüsküler olarak uygulanan 10 mg/kg *xylazine* ve 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar, Parke-Davis, England) kullanılarak sağlandı.

OSAO modeli için Tamura ve diğ. (129) metodu kullanıldı. Ratlar sol lateral dekübit pozisyonunda yatırıldı (Şekil 3.5). Sağ orbit ve tragus arasındaki bölge traş edildikten sonra ratların sağ gözünde mikroskop ışığının injürisine bağlı keratit oluşumunu önlemek maksadı ile geçici tarsorafı yapıldı (Şekil 3.6). Daha sonra sağ orbit ve tragus arasında orbitanın arka sınırından 1 mm geriden 2 cm' lik vertikal insizyon yapıldı ve temporal kas kraniyumdan diseke edilerek ayrıldı ve zigomatik arka doğru ekarte edilerek infratemporal fossa ortaya kondu.



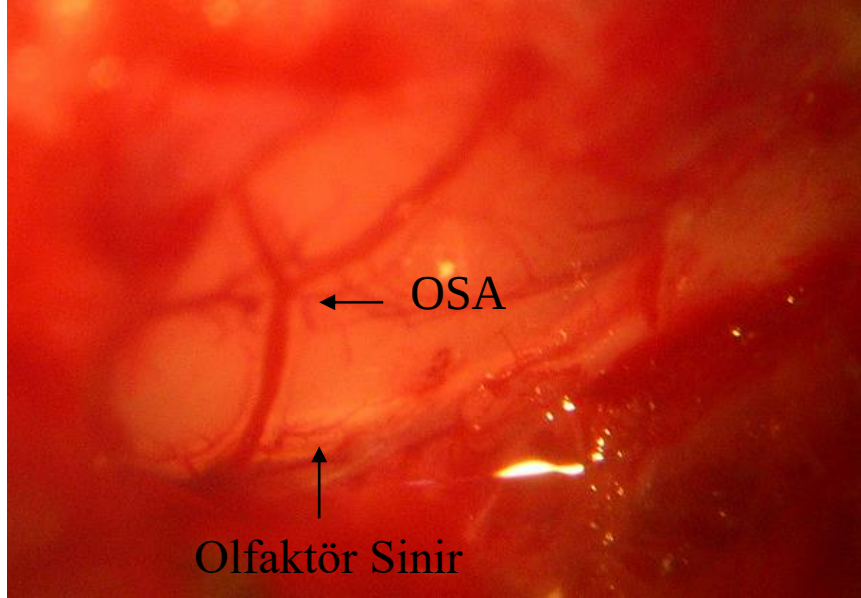
Şekil 3.5. Ratın operasyon pozisyonunda, cerrahi aletler ile birlikte resmi.



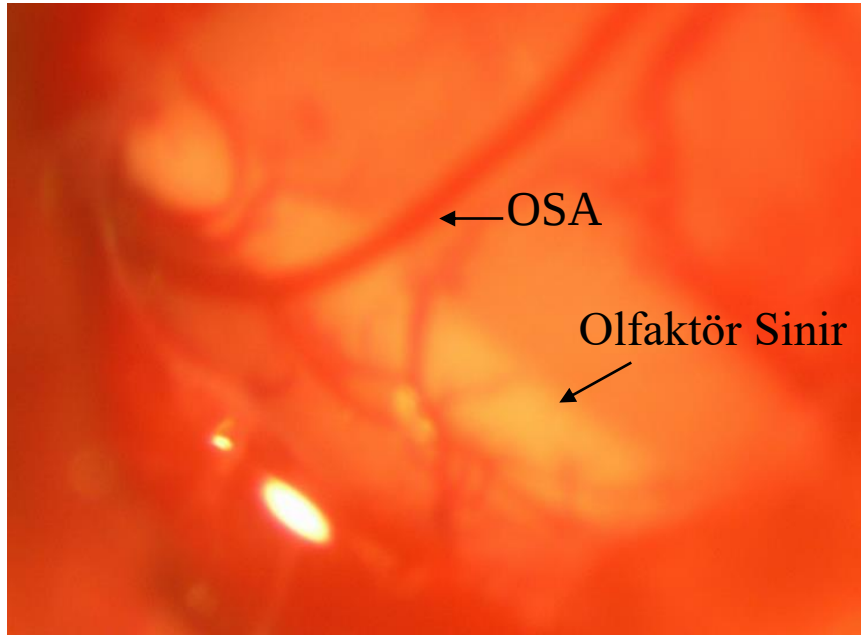
Şekil 3.6. İnsizyon hattı ve tarsorafi işlemi görülmektedir.

Operasyon mikroskopu altında zigomanın hemen sınırından başlanarak infratemporal fossa drillenerek kraniektomi yapıldı. Drilleme esnasında kortikal hasar oluşmaması için % 0.9' luk serum fizyolojik ile irrigasyon yapıldı. Duramater

ortaya kondu ve 30-gauge iğne ucu ile insizyon yapılarak açıldı. Korteks ortaya konulduktan sonra rinal fissürde orta serebral arterin (OSA) inferior serebral veni çaprazladığı yer ve OSA bifurkasyonu görüldü (Şekil 3.7). Daha sonra serebral korteks mikrodisektör ile hafifçe ekarte edildi ve OSA' in olfaktor siniri çaprazladığı yer gözlendi. (Şekil 3.8).

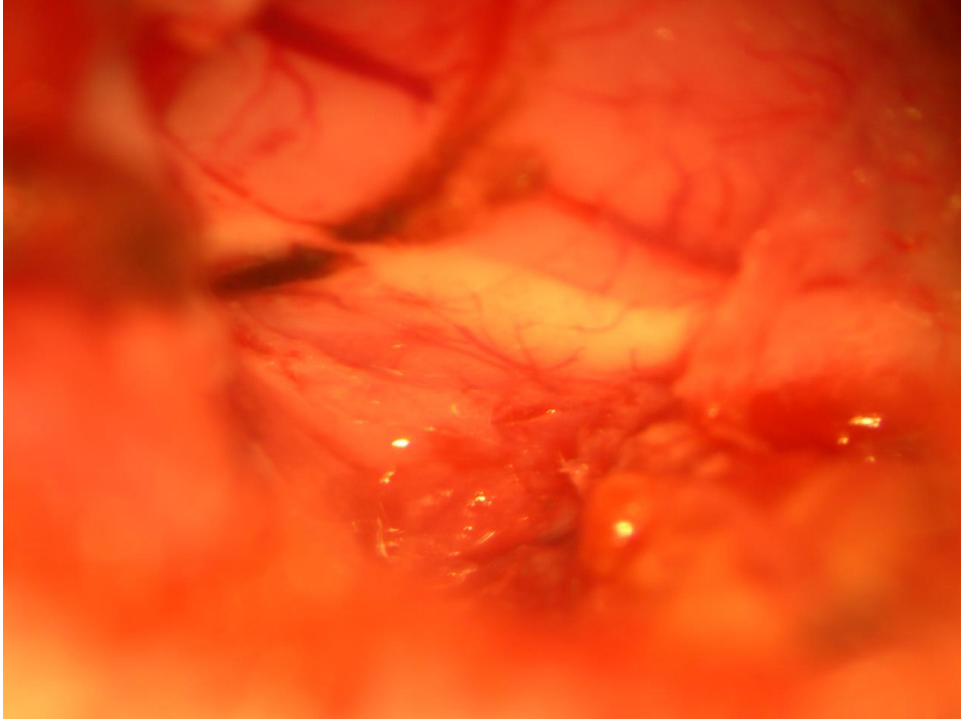


Şekil 3.7. Orta serebral arter bifurkasyonu ve olfaktor sinir görülmektedir.



Şekil 3.8. Orta serebral arterin olfaktor siniri çaprazladığı yer görülmektedir.

Mikrouçlu bipolar koter yardımı ile OSA, olfaktör siniri çaprazlamadan hemen öncesi olfaktör sinir üzerinde ve çaprazladıktan hemen sonrasında koagüle edildi ve rekanalizasyonu önlemek için mikromakas yardımı ile kesildi (Şekil 3.9). Daha sonra temporal kas ve cilt sütüre edilerek kapatıldı ve rat kafesine geri yerleştirilerek operasyona son verildi.



Şekil 3.9. Orta serebral arter koagüle edilip kesildikten sonra görülmektedir.

HBO ve HBO+AG grubunda ratlar hiperbarik oksijen kabininde 2.8 ATA basınçta 45 dakika tutulduktan sonra operasyona başlandı ve HBO uygulamasından 2 saat sonra OSA koterize edildi. AG ve HBO+AG grubunda operasyondan 6 saat sonra ratlara ilk doz AG hemisulfat (SIGMA 100 mg/kg) intraperitoneal olarak başlandı ve 12 saat ara ile toplam 72 saat AG hemisulfat (SIGMA 100 mg/kg) uygulamasına devam edildi.

Nörolojik muayene

Normal sağlıklı ratlar eğer kuyruklarından tutularak havaya kaldırılırlarsa her iki ön ekstremitelerini öne doğru uzatırlar (Şekil 3.10). OSA oklüzyonu yapılan rat ise kontralateral üst ekstremitisini öne uzatamaz. (Şekil 3.11). Kontralateral rezistans kaybı ratlar kuyruğundan tutulup havaya kaldırılarak kafesin tellerine

tutunma kuvveti ilede değerlendirilebilir. Deneydeki OSAO yapılan bütün ratlarda kuvvet kaybı gözlendi.



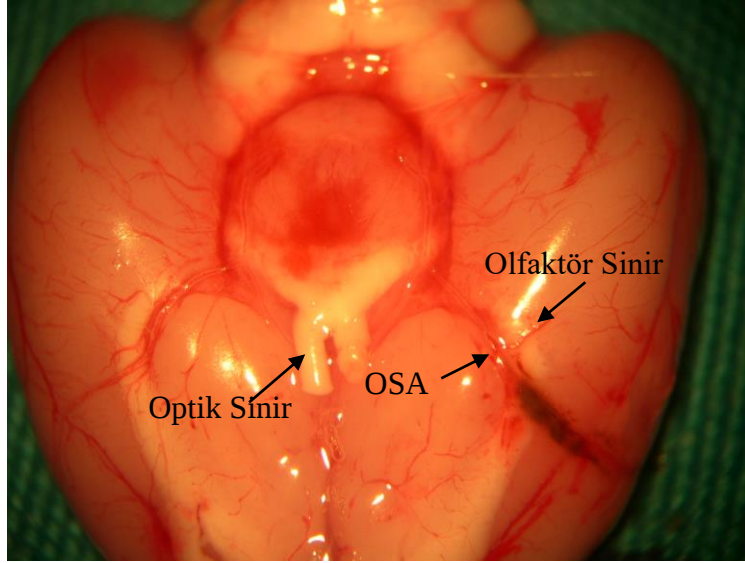
Şekil 3.10. Operasyon ncesi nörolojik muayene.



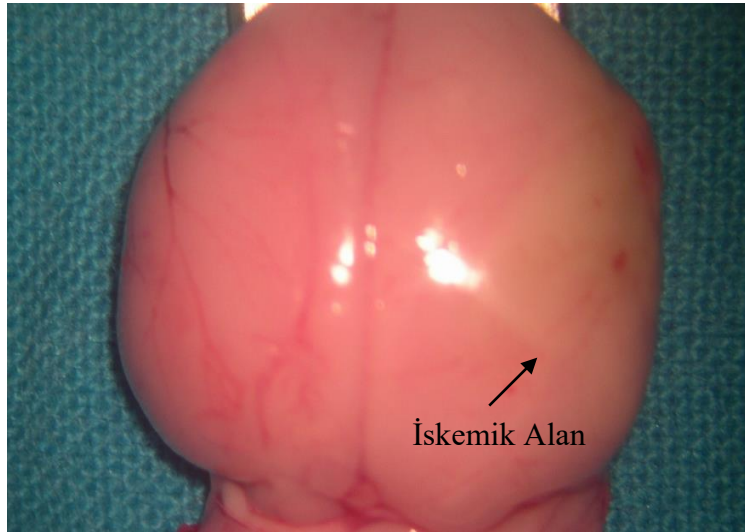
Şekil 3.11. Operasyon sonrası nörolojik muayene.

İnfarkt oranının hesaplanması

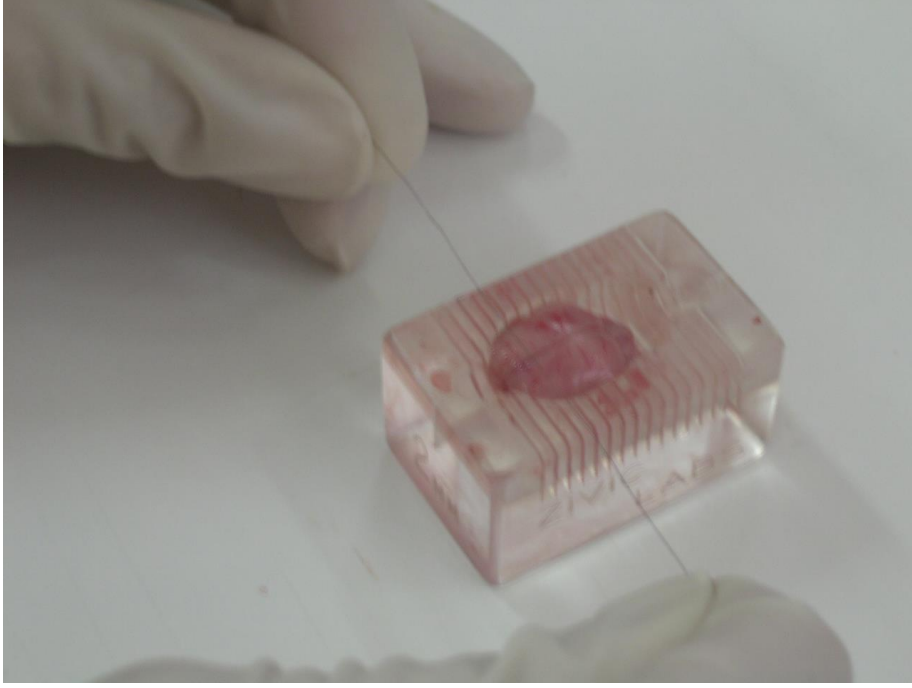
Tüm gruptaki ratlar 4. günde yüksek doz *xylazine* ve *ketamine* hidroklorid ile sakrifiye edildikten sonra hızla dekapite edildi ve beyinleri çıkartıldı (Şekil 3.12, 3.13). Çıkarılan beyin dokusu buzlukta soğutulmuş serum fizyolojik içinde 10 dakika bekletildikten sonra 2 mm' lik rat beyin kesme aparatına yerleştirilerek mikrotel ile 6 koronal parçaya ayrıldı(Şekil 3.14, 3.15).



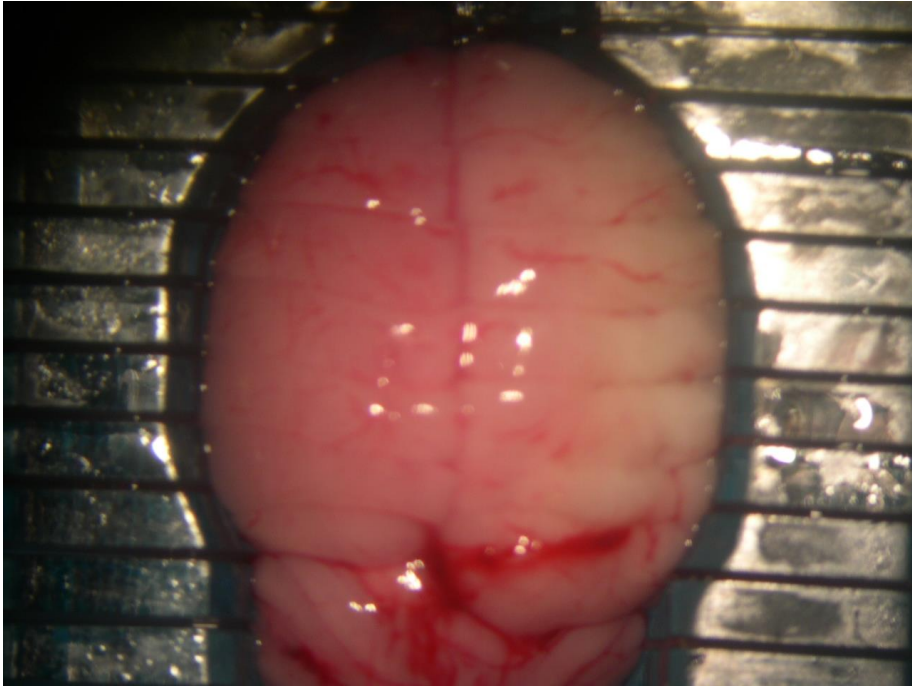
Şekil 3.12. Rat beyninin alttan görünümü. Koterize edilen orta serebral arter, olfaktör sinirler ve optik sinirler görülmekte.



Şekil 3.13. Dekapite edilen rat beyninin üstten görünüşü. Sağ lobda iskemik alan görülmekte.



Şekil 3.14. Rat beyni mikrotel ile kesilirken.



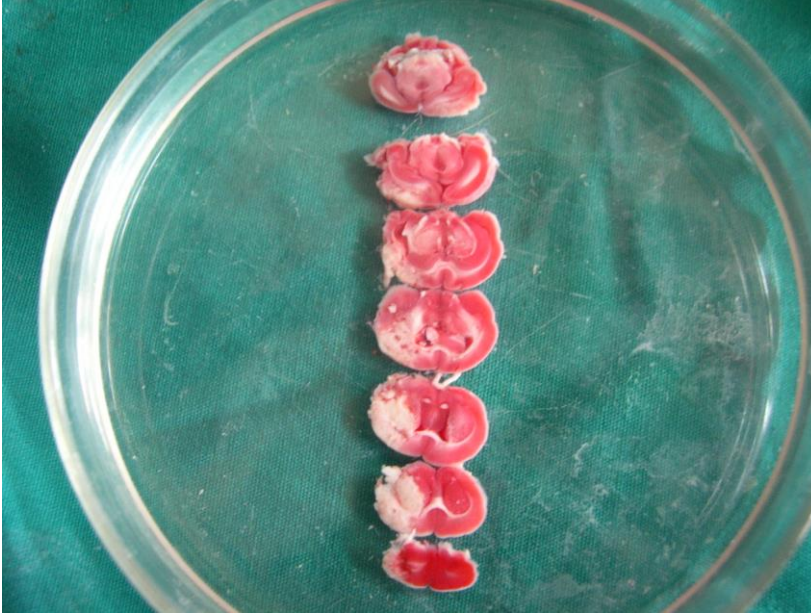
Şekil 3.15. Mikrotel ile 2 mm' lik aralıkla kesildikten sonra. Sağ hemisferde boyama öncesi iskemik alan görülmekte.

Herbir parça % 0.9' luk serum fizyolojik içinde hazırlanan % 2' lik TTC ile immerse edildi ve 37 C⁰ e ayarlı etüv içinde karanlık ortamda 30 dakika inkübe edildi

İnkübasyondan sonra dokular %10' luk formalin içerisinde tamponlandı. Bu işlemler sonucunda iskemik alanlar beyaz renkli ve boya tutmamış iskemi olmayan alanlar ise pembe-kırmızı renkli olarak görüldü (Şekil 3.16, 3.17).



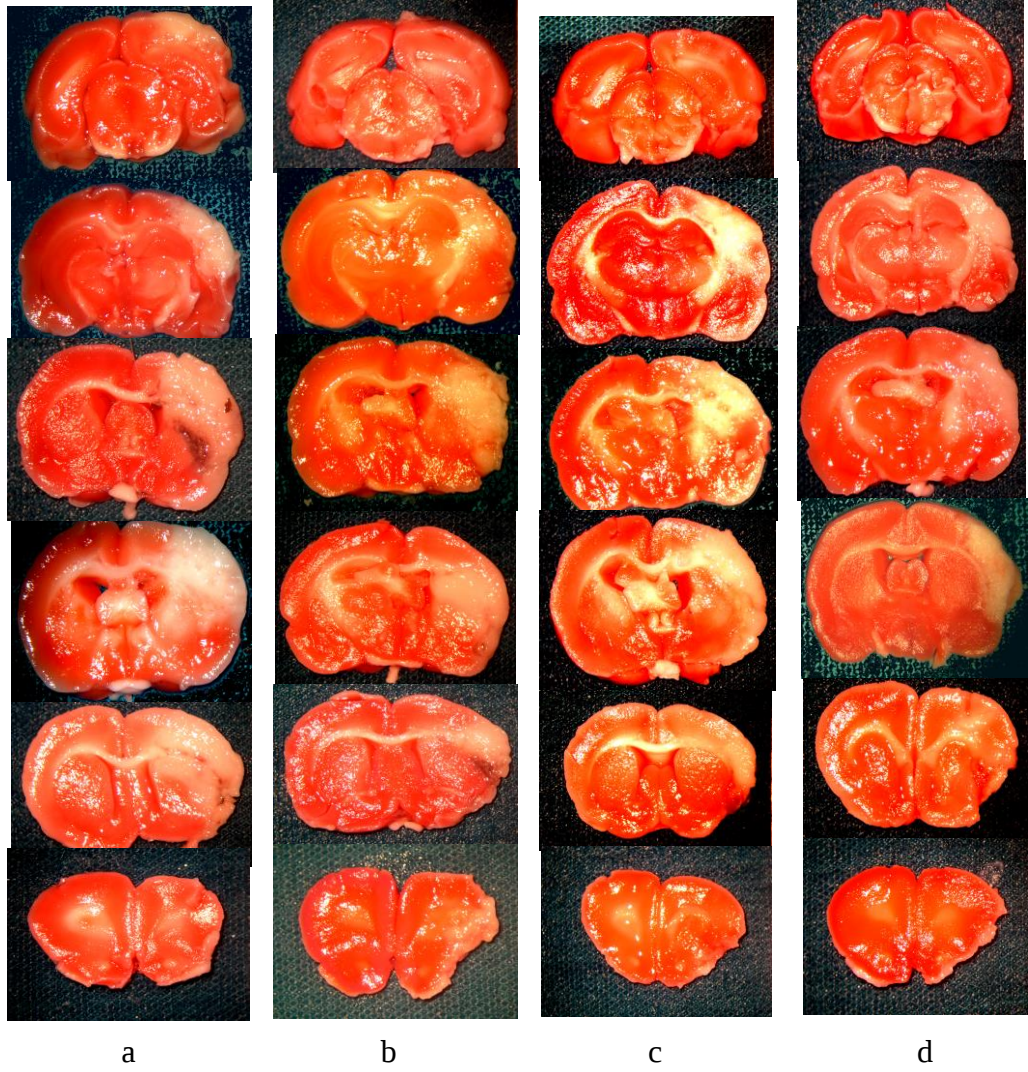
Şekil 3.16. Alınan kesitler TTC ile boyanmadan önce.



Şekil 3.17. Kesitler TTC ile boyandıktan sonra.

Elde edilen tüm kesitler Nikon E4300 dijital kamera ile fotoğraflandıktan sonra bilgisayara aktarıldı ve *UTHSCSA Image Tool for Windows Version 3.0* kullanılarak iskemik alan ölçümü tek tek yapıldı.

Dört gruba ait örnek kesitler Şekil 3.18’ de sunulmuştur.



Şekil 3.18. Dört gruba ait örnek kesitler. a. Kontrol grubu b. HBO grubu c.HBO+AG grubu d.AG grubu.

Her bir kesitteki iskemik alanın hesaplanmasında ödem etkisi ile oluşan yanılmayı ortadan kaldırmak için öncelikle karşı taraf hemisfer alanı hesaplandı ve bu sonuçtan aynı taraftaki iskemi olmayan alan çıkarılarak gerçek iskemik alan bulundu (Formül 3.1).

$$\text{İskemik Alan (} \dot{A} \text{) (mm}^2\text{)= Karşı taraf iskemik alan (mm}^2\text{)- Aynı taraf iskemi olmayan alan (mm}^2\text{)} \quad (3.1)$$

Bir rata ait her bir kesitteki iskemik alan tek tek hesaplandıktan sonra bunlar birbiri ile toplandı ve çıkan sonuç kesit kalınlığı olan 2 mm ile çarpılıp mm³ cinsinden o beyne ait iskemik volüm hesaplandı (formül 3.2).

$$\text{Total iskemik hacim (TİH) (mm}^3\text{)= } \dot{A} \text{' lar toplamı (mm}^2\text{)* 2 mm} \quad (3.2)$$

Daha sonra karşı hemisfer alanlar toplamı 2 mm ile çarpılıp beynin bir yarısına ait toplam hacim hesaplandı (formül 3.3).

$$\text{Toplam hemisfer hacmi (THH) (mm}^3\text{)= Karşı hemisfer alanlar toplamı (mm}^2\text{) * 2 mm} \quad (3.3)$$

Çalışmada kullanılan ratların ağırlıkları birbirinden farklı olduğu için standardizasyonu sağlamak amacı ile toplam iskemik hacim (TİH) , toplam hemisfer hacmine bölünerek infarkt oranı yüzde cinsinden elde edildi (Formül 3.4) (52, 88).

$$\text{İnfarkt oranı= TİH*100/THH} \quad (3.4)$$

İstatiksel analiz

İstatiksel analiz için *SPSS Windows Version 10.01* kullanıldı. *Kolmogorov-Smirnov* testi ile grupların normal dağılımına, *Levene* testi ile varyansların homojenliğine bakıldı ve parametrik istatistik değerlendirmeye uygun olduğu görüldü.

Gruplar arası ortalamalar *one-way ANOVA* varyans analizi ve *post-hoc Tukey HSD* testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Peroperatif dönemde hiçbir rat ölmedi ve OSA okluzyonu yapılmasına rağmen infarkt olmayan rat gözlenmedi.

Her grubun ortalama infarkt oranları incelendiğinde kontrol grubunda ortalama infarkt oranının en yüksek ($22,22 \pm 3,1$), sadece aminoguanidin verilen gruptaki ortalama infarkt oranının ise en düşük ($14,42 \pm 3,3$) olduğu bulunmuştur. Hiperbarik oksijen grubunda ortalama infarkt oranı ($16,05 \pm 2,7$), hiperbarik oksijen ve aminoguanidin' in kombine uygulandığı grupta ortalama infarkt oranı ($15,16 \pm 1,9$) olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Her bir grubun değerleri, % aritmetik ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir.* One-way ANOVA testi ile gruplar arası istatistiki anlamlı farklılık saptandı. ($p=0,001$) K: OSAO yapılan grup, HBO: OSAO ile HBO uygulanan grup, HBO+AG: OSAO ile HBO+AG uygulanan grup, AG: OSAO ile AG uygulanan grup.

	K	HBO	HBO+A G	AG
İnfark Oranı (%)	$22,22 \pm 3,1^*$	$16,05 \pm 2,7^*$	$15,16 \pm 1,9^*$	$14,42 \pm 3,3^*$

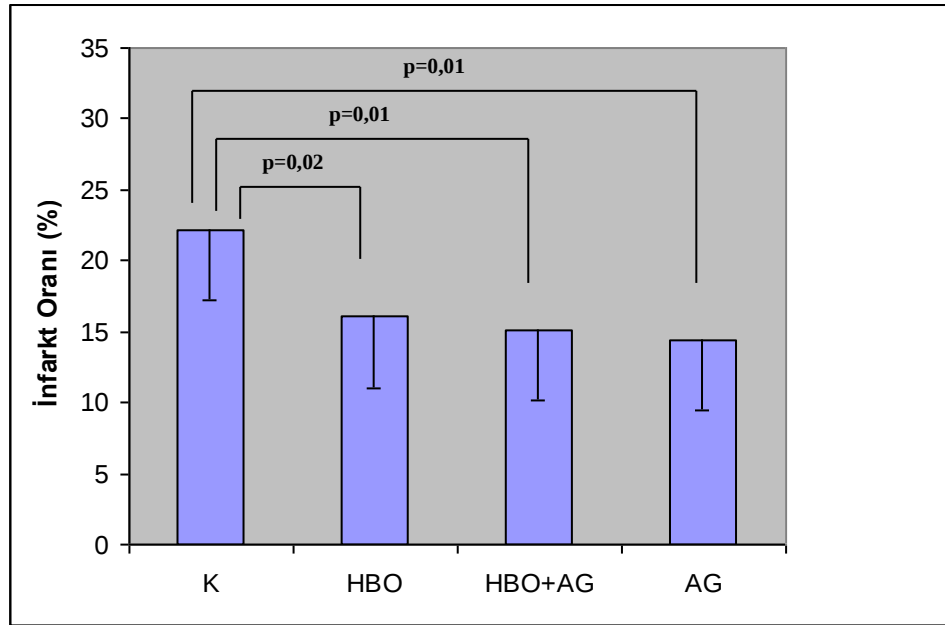
Tüm ratlar içinde en yüksek infarkt oranı %25,38 ile kontrol grubunda en düşük infarkt oranı %9,74 ile aminoguanidin grubunda bulundu. Ratların her birinin iskemi hacimleri, total hemisfer hacimleri ve infarkt oranları Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2.Tüm ratların total hemisfer hacmi, iskemik hacmi ve infarkt oranları

Gruplar	Total Hemisfer Hacmi (mm ³)	İskemik Hacim (mm ³)	infarkt oranı (%)
K1	750,75	172,92	23,03
K2	749,71	120,37	16,06
K3	726,19	173,22	23,85
K4	743,16	178,54	24,02
K5	728,33	150,37	20,65
K6	653,78	165,94	25,38
K7	737,91	166,75	22,6
HBO1	735,12	141,76	19,28
HBO 2	691,77	120,2	17,38
HBO 3	779,07	107,46	13,79
HBO4	730,08	118,88	16,28
HBO5	769,26	99,02	12,87
HBO6	748,16	143,99	19,25
HBO7	737,25	99,86	13,55
HBOAG1	639,57	112,52	17,59
HBOAG2	690,82	97,4	14,1
HBOAG3	792,05	100,8	12,73
HBOAG4	695,78	117,51	16,89
HBOAG5	689,84	115,82	16,79
HBOAG6	738,2	97,73	13,24
HBOAG7	668,66	98,88	14,79
AG1	671,22	86,66	12,91
AG2	739,92	72,04	9,74
AG3	743,39	129,43	17,41
AG4	714,41	114,72	16,06
AG5	719,33	116,92	16,25
AG6	738,27	131,23	17,78

AG7	633,69	68,56	10,82
-----	--------	-------	-------

Kontrol grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında infarkt oranındaki azalma, HBO grubunda ($p<0,05$), HBO+AG grubunda ($p<0,05$) ve AG grubunda ($p<0,05$) olarak bulunmuştur ve sonuçlar istatistiksel olarak anlamlıdır. HBO, HBO+AG ve AG gruplarının kendi aralarındaki karşılaştırmalarında infarkt oranlarındaki azalma birbirine eşdeğer bulunmuştur. ($p>0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Grupların *one-way ANOVA* yöntemi ile hesaplanan bir hemisferdeki infarkt volüm oranları. Tedavi gruplarının infarkt volüm azalma oranı, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$), ancak kendi aralarında istatistiksel anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$). K: kontrol grubu, HBO: hiperbarik oksijen grubu, AG: aminoguanidin grubu, HBO+AG: kombinasyon grubu.

Bu veriler ışığında HBO ve AG uygulamasının iskemik hacmi azaltmada anlamlı bir etkiye sahip olduğunu fakat kombine uygulanmaları halinde iskemik hacimde anlamlı azalma sağladıkları halde additif bir etkinliklerinin olmadığı söylenebilir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, ratlarda OSAO' dan iki saat önce verilen HBO' in ve oklüzyondan 6 saat sonra başlanıp, 3 gün (günde 2 kez) uygulanan AG' in iskemi hacmini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Fakat bu iki uygulamanın iskemik hacmi küçültmede additif bir etkinliği olmamıştır.

Fokal serebral iskemide etkilenen bölgenin merkezinde (iskemik çekirdek) kan akımı kesilmekte, penumbra ise azalmaktadır. Buna bağlı olarak oksijen ve glukoz seviyeleri kritik değerin altına düşmekte, bozulan aerobik metabolizma sonucu nöronal hücre ölümü ve iskemi oluşmaktadır. Akut evredeki bu değişikliklerin ardından inflamatuvar reaksiyonlar başlamakta ve bu reaksiyonlarda sitotoksik rolü olan hücresel sinyal molekülü NO, 6. saatten itibaren uNOS enzimatik aktivitesi ile özellikle mikroglia ile inflamatuvar hücrelerden salgılanmaya başlamakta ve 3 ila 4. güne kadar aktif olmaktadır (66,68). Bu dönemdeki NO varlığı, iskemik hasarı ve dolayısı ile infarkt hacmini dahada arttırmaktadır (69). Ortamdaki oksijen mevcudiyeti ise NO üretimini tetikleyebilir (58).

İskemik dokuda HBO' in kanlanmayı ve doku oksijenasyonunu arttırdığı (5,89), fakat bunun iskeminin hemen öncesi yada iskemi sırasında verilmesi halinde faydalı olacağı düşünülebilir. Çünkü 6. saatten itibaren verilecek olan HBO, NO sentezini ve dolayısı ile serbest radikalleri artırarak zararlı etki gösterebilir. Bu sebeple HBO tek sefer ve akut evrede verilmelidir.

İskeminin hemen sonrasında HBO uygulaması ratlarda mümkündür, fakat insanlarda böyle bir uygulama çok az HBO merkezi olduğu için pratikte oldukça güçtür. Bu nedenle bu tez çalışmasında HBO, iskemi öncesi profilaktik olarak denenmiştir.

uNOS inhibitörü olan AG ise iskemiden sonraki 6 ila 72 saatleri arasında verildiğinde postiskemik uNOS aktivitesini azaltıp sekonder hasarı sınırlandırarak infarkt hacmini azaltabilir (69).

Bu tez çalışmasının sonuçlarına benzer şekilde Iadecola ve diğ. (67,69) iskemiden sonra 6. saatte başlanan ve günde 2 kez 4 gün boyunca uygulanan AG' in uNOS' u inhibe ederek iskemik alanı küçülttüğünü ve bunu inflamatuvar hasarı engelleyerek yaptığını bildirmiştir.

HBO ise bu çalışmadaki gibi iskeminin hemen öncesinde yada iskemi sırasında uygulanmış ve iskemi hacmini azaltmada olumlu neticeler alınmıştır.

Kawamura ve diğ. (74) ile Veltkamp ve diğ. (135) iskemi periyodu esnasında uygulanan HBO' in infarkt hacminde küçülmeye sebep olduğunu ve ayrıca oluşacak iskemik nöronal hasara karşı tolerans geliştiğini bildirmiştir.

Bir başka çalışmada ratlarda iskemi oluşturulmadan hemen önce ve hemen sonrasında HBO uygulanmış; ilk grupta infarkt oranında daha anlamlı küçülme olduğu ve myeloperoksidaz aktivitesinde artışında daha az olduğu gösterilmiştir (88).

Yine bu çalışmaya benzer şekilde yapılan bir çalışmada (3), intraluminal ip metodu ile ratlarda oluşturulan OSAO iskemi/reperfüzyon modelinde iskemi öncesi HBO tedavisi verilmiş ve iskemi sonrasında infarkt volümü ve myeloperoksidaz aktivitesi ile nötrofil birikimine bakılmış sonuçta infarkt hacminde anlamlı küçülme ile birlikte nötrofil birikiminde azalma gözlenmiştir.

Son yapılan hayvan çalışmalarında HBO' in 6 saat' ten öncesinde verildiğinde faydalı etkileri olurken 6 saat' ten sonra verildiğinde ise zararlı etkileri olduğu konusunda görüşler mevcuttur (4,114).

Esas olarak fokal iskemide oluşan serebral hasar, fokal hasar ve penumbral hasar olarak 2 bölgeye ayrılmaktadır. Kan akımının durması sonucu özellikle iskemik çekirdekdeki hasar ağırdır. İskemik çekirdeği çevreleyen penumbral doku daha az hasar görür çünkü bu bölgeye kollateral kan akımının desteği vardır. Kan akımının en kritik fonksiyonu oksijenasyondur ve bundaki ani azalma sonucu iskemi oluşur. Eğer uygun zamanda müdahale edilmezse, penumbral bölgedeki hücreler iyonik homeostazı koruyamaz ve ölürler. Böylece iskemik hacimde artma meydana gelir. Birçok araştırmacının hedefi de bu dönüşümü engellemektir. HBO tedavisi ile iskemik alanı çevreleyen viabl ve non-fonksiyone dokular kurtarılabilir (4,96,99,102,135). Mink ve Dutka (89) HBO tedavisinin doku oksijen dağılımını

arttırdığını (özellikle azalmış kan akımı bölgelerinde), nöronal viabiliteyi güçlendirdiğini ve beyin ödemi azalttığını bildirmiştir. Doku PO₂ artışı vasıtası ile, HBO hücrel ve vasküler yenilenmeyi tetikleyebilir. Radyasyon injürisinden sonra verilen HBO tedavisi doku oksijen konsantrasyonunu arttırmak sureti ile anjiyonezis ve yeni kapiller kan desteğini göstermiştir (34).

HBO' in iskeminin erken safhasındaki faydalı etkisine karşın geç dönemde verilmesi halinde zararlı olması sebep olduğu serbest radikal artışı ile açıklanmaktadır (4,114).

Bilindiği gibi normal serebral damarlarda HBO vazokonstriksiyon oluşturmaktadır (6,10,12,13). Ratlarda yapılan bir çalışmada (44) HBO' e karşı NO ve serebral kan akımı oranı incelenmiş ve serebral kan akımı oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada NO seviyelerinde HBO' e bağlı artış olduğu gözlenmiştir. Fakat NO' in aynı zamanda kuvvetli bir vazodilatör olduğu bilindiğinden serebral kan akım oranında artışa sebep olması gerekir. Ancak bu çalışmanın sağlıklı ratlarda yapıldığı görülmektedir. İskemik ortamda bu durumun tersine döndüğü ve HBO' in bu bölgedeki kan akımını arttırdığı düşünülmektedir (5).

Klinik çalışmalarda seri *single photon emission computed tomography* (SPECT) ve diğer görüntüleme teknikleri ile HBO' in hasarlı beyin bölgesinde kan akımını arttırdığı gösterilmiştir (8,97,98,100).

HBO uygulamasının iskemi tedavisindeki yeri halen tartışmalıdır ve faydalı olduğu kadar (74,88,89,120,128,135,142) , etkisiz yada zararlı olduğunu bildiren görüşler mevcuttur (63,107,114).

Tahahashi ve diğ. (128) köpeklerde oluşturulan komplet serebral iskemi modelinde, postiskemik ilk 1 saat içinde ve iskemiden 3 saat sonra verilen 15 dakikalık 3 ATA' lık HBO tedavisinin sürviyi olumlu etkilediğini bulmuşlardır .

Shiokawa ve diğ.(120) spontan hipertansif ratlarda oluşturulan kalıcı inkomplet serebral iskemi sonrasında tedavi edilmeyen gruba göre sürvide artış tespit etmiştir.

Yine HBO uygulaması esnasında akut iskemi cevabında oluşan fokal serebral nörotransmitter cevabı incelenmiş; OSAO ile oluşturulan iskemi sonrasında striatal dopamin salınımında artış olduğu ve iskemi esnasında uygulanan HBO' in

striatumdan dopamin salınımını azaltarak iskemik hasarı azalttığı belirtilmiştir (142).

Karşıt olarak, Roos ve diğ. (114) 2ATA ve 30 dakikalık HBO tedavisinin OSAO oluşturulan rat modelinde faydalı etkisi olmadığını iddia etmiştir.

HBO' in nötrofil sekestrasyonunu azaltarak iskemik hasarda faydalı rol oynadığı da düşünülmektedir (3).

HBO beta2 integrin bağımlı nötrofil adezyonunu inhibe ederek injüriyi azaltıcı etki gösterebilir (130,146). Beta 2 integrin ve endotel hücrelerindeki karşılığı olan intrasellüler adhezyon molekülü (ICAM)' ın inhibisyonu monoklonal antikor ölçümü sayesinde gösterilebilmektedir (136). İnsanlarda 3 ATA altında 45 dakikalık HBO uygulaması sonrasında beta-2 integrin inhibisyonunun 12 saat süreyle devam ettiği gösterilmiştir (131). Yine invitro çalışmalarda HBO' in endotel hücrelerinde ICAM-1 salınımını azalttığı gösterilmiştir (23).

Fakat bunun tam aksini söyleyen ve HBO uygulaması sonrasında iskemik alanda herhangi bir değişikliğin olmadığını ve nötrofil akımında ve myeloperoksidaz aktivitesinde normal beyin dokusuna göre fark olmadığını belirten bir çalışma da vardır (63). Bu çalışmada ratlara verilen HBO, iskemiden 10 dakika sonra başlanmakta ve 230 dakika boyunca devam etmektedir. HBO tedavisinde optimal uygulamanın bir saat olduğu düşünüldüğünde (4), uzun süre verilmesinin sonuçları değiştirebileceği düşünülebilir.

HBO ile serbest radikaller arasındaki ilişki incelendiğinde de farklı yorumların mevcut olduğu görülmektedir.

HBO' in oksijen toksisitesine bağlı yan etkileri olduğu, lipid peroksidasyonunu indüklediği, serbest radikal türevlerini arttırdığı ve epilepsiye yol açtığı çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (6,12,30,35,102,105).

4 ATA ile 90 dakika yapılan bir HBO uygulamasından sonra beyinde, artmış lipid peroksidasyon oluşumu ve glutatyon peroksidaz seviyesindeki değişimler bildirilmiştir (107).

Aksine HBO' in serbest oksijen türevleri üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı, iskemik periferde lipid agrevasyonu yapmadan oksijen desteği sağladığı konusunda görüşlerde vardır (49,126). Buna karşın HBO' in COX-2 salınımında azalma yaptığı (144), apoptotik hücre sayısını azaltıcı (24), yada inhibe edici etki yaparak (143) iskemik hasarı azalttığıda öne sürülmüştür. Sonuçların birbirinden farklı çıkmasının nedeni oluşturulan iskemi modeli ile yada HBO basınç ve uygulama sürelerinin

değişkenlik göstermesi ile bağlantılı olabilir. Özellikle reperfüzyon modeli uygulanan ratlarda HBO serbest radikalleri arttırıcı ve zararlı etki gösterirken, kalıcı iskemi modellerinde erken dönemde uygulandığında faydalı olmaktadır. Yüksek basınç (3 ATA üzeri) ve uzamış uygulamalarda da serbest radikal artışı gözlemlenebilir.

Yine bilindiği gibi iskemi sonrasında oluşan hasar sonucu kan beyin bariyeri geçirgenliğinde artış olmakta ve sonuçta beyin ödemi ve sekonder hemoraji gibi komplikasyonlar görülebilmektedir (43). Rat ve farelerde yapılan bir çalışmada iskemi sonrası erken dönemde uygulanan HBO' in kan beyin bariyeri hasarını azaltarak erken ve geç dönemde beyin ödemi ve iskemik hacmi azalttığı gösterilmiştir (134).

HBO' in klinik kullanımı konusunda da bir çok çalışma yapılmıştır (2,101,115,117). Carson ve Marian ile diğ. (26) bu çalışmalarla ilgili geniş bir tarama yapmışlar ve HBO' in etkisinin sınırlı ve yapılan çalışmaların yetersiz olduğunu bildirmişlerdir. Fakat HBO' in klinikte profilaktik uygulamasına rastlanılmamıştır

İskemi sonrasında inflamatuvar yanıtlarda hasar oluşumunda önemli rol oynamaktadır. İlk olarak iskemiden sonraki 12-24 saat arasında kan beyin bariyerini geçen lökositler iskemik alanı işgal etmektedir. 2 ila 3. günlerde makrofajlar infarkt alanında birikmeye başlamakta ve 5 ila 7. günlerde baskın hücreler olmaktadır (54). Bu dönemde uNOS' in özellikle mikrogliyalardan üretildiği ve oluşan NO' in mikrogliyal aktivasyonu sitüme ettiği bildirilmektedir (45,95) ve uNOS immünoreaktivitesi infiltre lökositlerde tespit edilmiştir (66,68). İntrinsik beyin hücreleri olan mikrogliya ve astrositler aynı zamanda postiskemik doku reaksiyonlarını aktive etmektedir (72). Bu akut inflamatuvar reaksiyonlar iskemik hasarı ilerletmektedir. Dolaşımdaki lökositlerin sayısı azaltıldığında yada antikorlar aracılığı ile lökositler bloke edildiğinde infarkt alanında küçülme gözlenmiş, aksine IL-1 enjeksiyonunun hasarı arttırdığı gösterilmiştir (15,31,33,36,150). Fakat postiskemik inflamasyonun zararlı etkilerini nasıl ortaya çıkardığı tam olarak anlaşılamamıştır (77).

Aminoguanidin ise bilindiği gibi relatif selektif uNOS inhibitörüdür (60,139).

NO nöronal hücre ölümünden sorumlu tutulan bir mediatördür ve akut strokta infarkt alanının oluşumunda öncü olduğu ve NOS inhibitörleri ile bunun engellendiği bildirilmektedir. (11,25,42,69,103). Bu tez çalışmasında da uNOS

inhibisyonu ile inflamatuvar hasarın azaltılacağı ve iskemik hacmin küçültüleceği düşünülmüştür.

Fakat ilginç olarak Cash ve diğ. (27), OSAO oluşturulan ratlarda iskemiden sonra NO ve NOS aktivitesini ölçmüşler ve AG ile tedavi edilen ratlar ile kontrol grubu arasında belirgin farklılık bulamamışlar, yinede AG' in iskemik alanı küçülttüğünü belirtmişler ve bu etkinin başka mekanizmalar üzerinden olabileceğini bildirmişlerdir.

uNOS' un iskemi sonrası salınma zamanı, pik ve salınımının sona erme zamanı konusunda görüş ayrılıkları mevcuttur. Bu yüzden iskemi sonrasında AG uygulamasına başlama zamanı ve uygulama süresi tartışmalıdır.

Iadecola ve diğ. (69), AG' i bu tez çalışmasındaki gibi iskemiden sonraki 6. saatte başlanmış, ve 3 gün devam ettirilmesi sonucunda uNOS inhibisyonu ile faydalı olacağını belirtmiştir.

AG' in iskemiden sonraki ilk 2 saat içerisinde verildiğinde iskemik hasarı azaltmada etkili olduğu ama bunun iskemik hasardaki faydasının uNOS inhibisyonu üzerinden değil beyindeki PAO inhibisyonu ile gösterdiği konusunda görüşlerde mevcuttur (37). NMDA reseptörü üzerinde bir poliamin bağlanma yeri olduğu ve reseptör ligand aktivasyonu ile glutamat seviyesini arttırarak nörotoksisiteden sorumlu olduğu öne sürülmüştür(59,132). Ayrıca poliamin oksidasyonu sonucunda oluşan reaktif aldehitlerinde beyinde sitotoksik etkiye aracılık ettiği sanılmaktadır (38).

Bir başka yayında ratlarda kalıcı OSAO' dan sonra başlanan ve 1 veya 2 gün verilen AG' in iskemik alanı küçültmede etkili olmadığı ama 3 yada 4 gün devam ettirilirse etkinliğinin ortaya çıktığı bildirilmiştir (148).

Bu çalışmanın sonuçlarına karşıt olarak Dingman ve diğ.(45), neonatal ratlarda OSAO oluşturmuş ve AG' in apoptotik hücre ölümünü azaltmakla birlikte mikrogial proliferasyonun aktivasyonunu ve iskemik hacmi etkilemediğini bildirmişlerdir.

Deneyisel fokal serebral iskemide AG ve HBO ile birçok çalışma yapılmasına rağmen bu ikisinin kombine etkinliği incelenmemiştir. Her ikisinin kombine kullanımının etkisini incelemek bu çalışmada amaçlanmıştır. Fakat AG ve HBO tek tek kullanıldığında iskemik hasarı azaltıcı etkileri olmalarına rağmen kombine kullanımlarında additif bir etki göstermemişlerdir.

Muhtemelen HBO, penumbradaki viabl hücrelere etki etmekte ve iskemik hacimde belli bir küçülme sağlamaktadır, AG ise uNOS inhibisyonu ile antiinflamatuvar ve antioksidan etki gösterip, iskemi hacminin daha da ilerlemesini engellemekte fakat mevcut iskemik hacimde daha fazla küçülme sağlayamamaktadır. Sonuçta her ikisinin de terapötik etkisi anlamlı fakat sınırlıdır. Bu durum, her ikisi birlikte kullanıldığında iskemik hacimde additif bir azalma olmayışını açıklayabilir.

Tüm bu verilere rağmen günümüzde AG ve HBO' in etki mekanizması tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır ve bu konuda daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gereklidir.

SONUÇ

Bu deneysel çalışmada iskemi öncesi verilen HBO' in ve iskemi sonrasında verilen AG' in infarkt oranında dolayısı ile iskemik hacimde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma yaptığı gösterilmiştir. Fakat bu ikisi kombine olarak verildiğinde additif bir etkinlik göstermemişlerdir. Buda iskemi konusunda tedavi imkanlarının halen ne kadar kısıtlı olduğunu göstermektedir. Şu gerçek unutulmamalıdır ki ölmüş olan hücreleri geri kazanmak mümkün değildir. Günümüzde yapılan deneysel tedaviler sadece iskemik hasarı mümkün olduğunca sınırlamaya yöneliktir ve bunların kesin kür sağlayamayacağı açıktır.

İskemiden korunmanın iskemi oluştuktan sonra yapılacak tedaviden çok daha önemli olduğu açıktır. Ama yinede klinikte geçici serebral damar kliplemesinin gerektiği majör nöroşirurjikal operasyonlardan önce profilaktik olarak HBO uygulamasının denenebileceğini yada AG ve benzeri yeni nesil ilaçların iskemi sonrasında kullanabilecek yeni tedavi seçenekleri olarak düşünülebileceği umut edilebilir.

KAYNAKLAR

1. Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappale, J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., Marsh, E. E., Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definition for use in multicenter clinical trial, *Stroke*, 24, s35-41, 1993.
2. Anderson, D. C., Bottini, A. G., Jagiella, W. M., Westphal, B., Ford, S., Rockswold, G. L., Loewenson, R. W., A pilot study of hyperbaric oxygen in the treatment of human stroke, *Stroke*, 22, s1137-1142, 1991.
3. Atochin, DN., Fisher, D., Demchenko, IT., Thom, SR., Neutrophil sequestration and the effect of hyperbaric oxygen in a rat model of temporary middle cerebral artery occlusion, *Undersea Hyperb Med* 27, s185-190, 2000.
4. Badr, A. E., Yin, W., Mychaskiw, G., Zhang, J. H., Dual effect of HBO on cerebral infarction in middle cerebral artery occlusion rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280, s766-770, 2001.
5. Badr, A. E., Yin, W., Mychaskiw, G., Zhang, J. H., Effect of hyperbaric oxygen on striatal metabolites: a microdialysis study in awake freely moving rats after MCA occlusion, *Brain Res.*, 916, s85-90, 2001.
6. Balentine, J. D., *Pathology of Oxygen Toxicity*, New York, Academic, 1982.
7. Balkan S.: Serebrovasküler hastalıklar. Ankara. Güneş Kitabevi, s. 28- 72, 2002.
8. Barrett, K., Harch, P., Masel, B., Cognitive and cerebral blood flow improvements in chronic stable traumatic brain injury induced by 1.5 ATA hyperbaric oxygen, *Undersea Hyperbaric Med.*, 25, s241-256, 1998.
9. Baylin, S., Harakova, Z., Beaven. Increase in food consumption and growth after treatment with aminoguanidine, *Experientia*, 31, s562-564, 1975.

10. Bean, J. W., Lignell, J., Coulson, J., Regional cerebral blood flow, O₂, and EEG in exposures to O₂ at high pressure, *J. Appl., Physiol.*, 31, s235-242, 1971.
11. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A., Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, s1620-1624, 1990.
12. Beckman, J. S., Koppenol, W. H., Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly, *Am. J. Physiol.*, 271, sc1434-c1437, 1996.
13. Bergo, G. W., Tysebotn, I., Cerebral blood flow distribution during exposure to 5 bar oxygen in awake rats, *Undersea Biomed. Res.*, 19, s339-354, 1992.
14. Bonita, R., Stroke prevention: a global perspective, New York, Oxford University Press, s259-273, 2001.
15. Bowes, M. P., Rothlein, R., Fagan, S. C., Zivin, J. A., Monoclonal antibodies preventing leukocyte activation reduce experimental neurologic injury and enhance efficacy of thrombolytic therapy, *Neurology*, 45, s815-819, 1995.
16. Bö, L., Dawson, T. M., Wesselingh, S., Mörk, S., Choi, S., Kong, A. P., Hanley, D., Trapp, B. D., Induction of NOS in demyelinating regions of MS brain, *Ann. Neurol.*, 36, s778-786, 1994.
17. Bredt, D. S., Glatt, E. C., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., Snyder, S. H., Nitric oxide synthase protein mRNA discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase, *Neuron.*, 7, s615-624, 1991.
18. Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H., Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles P-450 reductase, *Nature.*, 351, s714-718, 1991.
19. Bredt, D. S., Snyder, S. H., Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87, s682-685, 1990.
20. Brune, B., Dimmeler, S., Molina-y-Vedia, L., Lapetina, E. G., Nitric oxide: A signal for ADP-ribosylation of proteins, *Life. Sci.*, 54, s61-70, 1994.

21. Bruno, A., Levine, S. R., Frankel, M. R., Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA , Stroke Trial. *Neurology*, 59, s669-674, 2002.
22. Brunton, VG., Grant, MH., Wallace, HM., Spermine toxicity in BHK-21/C13 cells in the presence of bovine serum: the effect of aminoguanidine, *Toxic in vitro.*, 8, s337-341, 1994.
23. Buras, J. A., Stahl, G. L., Svoboda, K. K. H., Reenstra, W. R., Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia: the role of NOS, *Am. J. Physiol.* 278, sc292-c302, 2000.
24. Calvert, J., Yin, W., Patel, M., Badr, A., Mychaskiw, G., Parent, A. D., Zhang, J. H., Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model, *Brain Res.*, 951, s1-8, 2002.
25. Camarata, P. J., Heros, R. C., Latchaw, R. E., Brain attack: the rationale for treating stroke as a medical emergency, *Neurosurgery.*, 34, s144-158, 1994.
26. Carson, S., McDonagh, M., Russman, B., Helfand, M., Hyperbaric oxygen therapy for stroke: a systematic review of the evidence, *Clinic. Reh.*, 19, s819-833, 2005.
27. Cash, D., Beech, J. S., Rayne, R. C., Bath, P. M. W., Meldrum, B. S., Williams, S. C. R., Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain, *Brain Res.*, 905, s91-103, 2001.
28. Chang, C. F., Niu, K. C., Hoffer, B. J., Wang, Y., Borlongan, C. V., Hyperbaric oxygen therapy for treatment of postischemic stroke in adult rats, *Exp. Neurol.*, 166, s298-306, 2000.
29. Chavko, M., Braisted, J. C., Harabin, A. L., Effect of MK-801 on seizures induced by expojure to hyperbaric oxygen: Comparison with AP-7, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 151, s222-228, 1998.
30. Chavko, M., Braisted, J. C., Outsa, N. J., Harabin, A. L., Role of cerebral blood flow in seizures from hyperbaric oxygen expojure, *Brain Res.*, 791, s75-82, 1998.
31. Chen, M., Chopp, M., Bodzin, G., Neutropenia reduces the volume of cerebral infarct after transient middle cerebral artery occlusion in the rat, *Neurosci. Res. Commun.*, 11, s93- 99, 1992.

32. Cho, H. J., Xie, Q. W., Calaycay, J., Mumford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Nathan, C., Calmodulin as a tightly bound subunit of calcium-calmodulin independent nitric oxide synthase, *J. Exp. Med.*, 176, s599-604, 1992.
33. Chopp, M., Zhang, R. L., Chen, H., Li, Y., Jiang, N., Rusche, J. R., Postischemic administration of an anti-Mac-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *Stroke*, 25, s869-875, 1994.
34. Chuba, P. J., Aronin, P., Bhambhani, K., Eichenhom, M., Zamarano, L., Cianci, P., Muhlbauer, M., Porter, A. T., Fontanesi, J., Hyperbaric oxygen therapy for radiation-induced brain injury in children, *Cancer.*, 80, s2005- 2012, 1997.
35. Clark, J. M., Bennett, P. B., Elliott, E. H., Oxygen toxicity, *The Physiology and Medicine of Diving*, London, Saunders., s324-325, 1993.
36. Clark, W. M., Madden, K. P., Rothlein, R., Zivin, J. A., Reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment, *Stroke*, s877- 883, 1991.
37. Cockroft, K. M., Meistrel, M., Zimmerman, G. A., Risucci, D., Bloom, O., Cerami, A., Tracey, K. J., Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent model of stroke, *Stroke.*, 8, s1393-1398, 1996.
38. Cockroft, K. M., Meistrell, M., Cerami, A., Tracey, K. J., Neurotoxicity of polyamines and neuroprotective effects of aminoguanidine, *Surg. Forum.* 46, s578-580, 1995.
39. Dalkara T., Moskowitz, M. A., Complex role of nitric oxide in cerebral ischemia, *Brain Pathol.*, 4, s49-57, 1994.
40. Dalkara, D., Ayata, C., Demirci, M., Erdemli, G., Onur, R., Effects of cerebral ischemia on NMDA and dihydropyridine-sensitive calcium currents, *Stroke.*, 27, s127-133, 1996.
41. Dawson, T. M., Dawson, V. L., Snyder, S. H., A novel neuronal messenger in brain: The free radical, nitric oxide, *Ann. Neurol.*, 32, s297-311, 1992.
42. Dawson, W. L., Dawson, T. M., Bartley, D. A., Uhl, G. R., Snyder, S. H., Mechanism of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures, *J. Neurosci.*, 13, s2651-2661, 1993.

43. Del Zoppo, G. J., Mabuchi, T., Cerebral microvessel responses to focal ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23, s879-894, 2003.
44. Demchenko, I. T., Boso, A. E., O' Neill, T. J., Bennett, P. B., Piantadosi, C. A., Nitric oxide and cerebral blood flow responses to hyperbaric oxygen, *J. Appl. Physiol.*, 88, s1381-1389, 2000.
45. Dingman, A., Lee, S. Y., Derugin, N., Wendland, M. F., Vexler, Z. S., Aminoguanidine inhibits caspase-3 and calpain activation without affecting microglial activation following neonatal transient cerebral ischemia, *J. Neurochem.*, 96, s1467-1479, 2006.
46. Du, C., Hu, R., Csernansky, C. A., Hsu, C. Y., Choi, D. W., Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis?, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, s195-201, 1996.
47. Düz, B., Deneyse Fokal Serebral İskemide Orta Dereceli Hipoterminin Etkisi, *Beyin ve Sinir Cerrahi Uzmanlık Tezi*, GATA Beyin ve Sinir Cerr. AD, Ankara, 2002
48. Edwards, A. D., Yue, X., Squier, M. V., Specific inhibition of apoptosis after cerebral hypoxia-ischaemia by moderate post-insult hypothermia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, s1193-1199, 1995.
49. Elayan, I. M., Milton, J. A., Paruchuri, V. P., Stephan, T. A., Charles, R. A., Effect of hyperbaric oxygen treatment on nitric oxide and oxygen free radicals in rat brain, *J. Neurophysiol.*, 83, s2022-2029, 2000.
50. Emerich, D. F., Dean, R. L. III., Bartus, R. T., The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct?, *Exp. Neurol.*, 173, s168-181, 2002.
51. Faracai, F. M., Role of nitric oxide in regulation of basilar artery tone, *Am. J. Physiol.*, 259, s1216-1221, 1990.
52. Flynn, E. P., Auer, R. N., Eubarc hyperoxemia and experimental cerebral infarction, *Ann. Neurol.*, 52, s566-572, 2002.
53. Foote, EF., Look, ZM., Giles, P., Keane, WF., Halstenon, CE., The pharmacokinetics of aminoguanidine in end-stage renal disease patients on hemodialysis, *Am. J. Kidney Dis.*, 25, s420-425, 1995.

54. Garcia, J. H., Liu, K. F., Yoshida, Y., Lian, J., Chen, S., del Zoppo, G., Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct, *Am. J. Pathol.* 144, s188-199, 1994.
55. Garthwaite, J., Boulton, C. L., Nitric oxide signaling in the central nervous system, *Annu. Rev. Physiol.*, 57, s683-706, 1995.
56. Garthwaite, J., Charles, S. L., Chess-Williams, R., Endothelium-dependent relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role for intercellular messenger in the brain, *Nature.*, 336, s385-388, 1988.
57. Geller, D. A., Lowenstein, C. J., Shapiro, R. A., Nussler, A. K., DiSilvio, M., Wang, S. C., Nakayama, D. K., Simmons, R. L., Snyder, S. H., Billar, T. R., Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90, s3491-3493, 1993.
58. Gill, R., Andine, P., Hillered, L., Persson, L., Hagberg, H., The effect of MK-801 on cortical spreading depression in the penumbral zone following focal ischemia in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 12, s371-379, 1992.
59. Gotti, B., Duverger, D., Bertin, J., Carter, C., Dupont, R., Frost, J., Gaudilliere, B., MacKenzie, E. T., Rousseau, J., Scatton, B., Wick, A., Ifenprodil and SL 820715 as cerebral anti-ischemic agents, I: evidence for efficacy in models of focal cerebral ischemia, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 247, s1211-1221, 1988.
60. Griffiths, M. J. D., Messent, M., MacAllister, R. J., Evans, T. W., Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase, *Br. J. Pharmacol.*, 110, s963-968, 1993.
61. Gross, S. S., Wolin, M. S., Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms, *Annu. Rev. Physiol.*, 57, s737-769, 1995.
62. Hart, G. B., Thompson, R. E., The treatment of cerebral ischemia with hyperbaric oxygen, *Stroke.*, 2, s247-250, 1971.
63. Hjelde, A., Hjelstuen, M., Haraldseth, O., Martin, J. D., Thom, S. R., Brubakk, A. O., Hyperbaric oxygen and neutrophil accumulation/ tissue damage during permanent cerebral ischemia in rats, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 86, s401-405, 2002.
64. Hossman, K. A., Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia, *Ann. Neurol.*, 36, s557-565, 1994.

65. Hsu, C. Y., Ischemic Stroke: From basic mechanism to new drug development, Monogr. Clin. Neurosci., Basel, Karger, 16, s28-45, 1998.
66. Iadecola, C., Xu, X., Zhang, F., el- Fakahany E. E., Ross, M. E., Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia, J. Cereb. Blood Flow Metab., 15, s52-59, 1995
67. Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Clark, HB., Ross, ME., Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia, Stroke. 27(8), s1373-80, 1996.
68. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X., Casey, R., Ross, M. E., Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia, J. Cereb. Blood Flow Metab., 15, s378- 384, 1995.
69. Iadecola, C., Zhang, F., Xu, X., Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage, Am. J. Physiol., 268, R286- R292, 1995.
70. J.-C. Baron, R. Von Kummer, G.J. del Zoppo., Treatment of acute ischemic stroke. Challenging the concept of a rigid and universal time window. Stroke., 26, s2219-2221, 1995.
71. Jain, K. K., Neubauer, R., Correa, J. G., Physical, Physiological and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation, The Textbook of Hyperbaric Medicine, Hogrefe and Huber publishers, Toronto, 335-365, 1990.
72. Jorgenden, M. B., Finsen, B. R., Jensen, M. B., Castellano, B., Diemer, N. H., Zimmer, N. H., Zimmer, J., Microglial and astroglial reactions to ischemic and kainic acid-induced lesions of the adult rat hippocampus, Exp. Neurol., 120, s70-88, 1993.
73. Kader, A., Solomon, R. A., Trifiletti, R. R., Nitric oxide production during focal cerebral ischemia, Stroke., 24, s1709-1716, 1993.
74. Kawamura, S., Yasui, N., Shirasawa, M., Fukasawa, H., Therapeutic effects of hyperbaric oxygenation on acute focal cerebral ischemia in rats, Surg. Neurol., 34, s101-106, 1990.
75. Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M. J., Moncada, S., Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism

- for stimulation of the soluble guanylate cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86, s5119-5162, 1989.
76. Knowles, R. S., Moncada, S., Nitric oxide as a signal blood vessels, *Trends Biochem. Sci.*, 17, s399-402, 1992.
 77. Kochanek, P. M., Hallenbeck, J. M., Polymorphonuclear leukocytes and monocyte/ macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke, *Stroke*, 23, s1367-1379, 1992.
 78. Korpenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos H., Beckman, J. S., Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide, *Chem. Res. Toxicol.*, 5, s834-842, 1992.
 79. Kwon, N. S., Stuehr, D. J., Nathan, C. F., Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide, *J. Exp. Med.*, 174, s761-767.
 80. Lin, S., Shyu, K., Lee, C., Wang, B., Chang, C., Liu, Y., Huang, F., Chang, H., Hyperbaric oxygen selectively induces angiopoietin-2 in human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296, s710-715, 2002.
 81. Lipton, P., Ischemic cell death in brain neurons, *Physiol. Rev.*, 79, s1431-1568, 1999.
 82. Liu, R. H., Hotchkiss, J. H., Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: A review, *Mutat Res.*, 339, s73-79, 1995.
 83. Ma, J., Ayata, C., Huang, P., Fishman, M. C., Moskowitz, M. A., Regional cerebral blood flow response to vibrissal stimulation in mice lacking type I NOS gene expression, *Am. J. Physiol.*, 270, s1085-1090, 1996.
 84. MacManus, J., Hill, I., Huang, Z., Rasquinha, I., Xue, D., Buchan, A., DNA damage consistent with apoptosis in transient focal ischemic neocortex, *Neuroreport.*, 5, s493-496, 1994.
 85. Malinski, T., Bailey, F., Zhang, Z. G., Chopp, M., Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, s355-358, 1993.
 86. Marletta, M. A., Nitric oxide: Biosynthesis and biological significance, *Trends Biochem. Sci.*, 14, 488-492, 1991.

87. Marletta, M.A., Yoon, P. S., Ivensgar, R., Leaf, C. D., Whisnok, JS., Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate, *Biochemistry.*, 27, s8706-8711, 1988.
88. Mijkovic-Lolic, M., Silbert, R., Fiskum, G., Rosenthal, R.E., Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity, *Brain Res.* 971(1), s90-94, 2003
89. Mink, R. B., Dutka, A. J., Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow, *Stroke.*, 26, s2307-2312, 1995.
90. Misko T. P., Moore, W. M., Kasten, T. P., Nickols, G. A., Corbet, J. A, Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine, *Eur. J. Pharmacol.*, 233, s119-125, 1993.
91. Moncada S., Higgs, A., The L-arginine-nitric oxide pathway, *N. Engl. J. Med.*, 329, s2002-2012, 1993.
92. Moncada, S., Palmer, R. M. J., Higgs, E. A., Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, 43, s109-142, 1991.
93. Moore, P. K., Al-Swayeh, O. A., Chong, N. W. S., Evans, R., Mirzazadeh, S., Gibson, A., L-N⁰-nitroarginine, a novel, L-arginine-reversible inhibitor of endothelium-dependent vasodilation in vivo, *Br. J. Pharmacol.*, 99, s408-412, 1990.
94. Morikawa, E., Rosenblatt, S., Moskowitz, M. A., L-arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia, *Br. J. Pharmacol.*, 107, s905-907, 1992.
95. Murphy, S., Production of nitric oxide by glial cells; regulation and potential roles in the CNS, *Glia.*, 29, s1-13, 2000.
96. Neubauer, R. A., Gottlieb, S. F., Kagan, R. L., Enhancing idling neurons, *Lancet*, 335, s542, 1990
97. Neubauer, R. A., Gottlieb, S. F., Miale, A. Jr., Idendification of hypometabolic areas in the brain using brain imaging and hyperbaric oxygen, *Clin. Nucl. Med.*, 17, s477-481, 1992.

98. Neubauer, R. A., Gottlieb, S. F., Pevsner, N. H., Hyperbaric oxygen for treatment of closed head injury, *South Med. J.*, 87, s933-936, 1994.
99. Neubauer, R. A., Idling Neurons, *Lancet*, 335, s1217, 1990.
100. Neubauer, R. A., James, P., Cerebral oxygenation and the recoverable brain, *Neurol. Res.*, 20, s33-36, 1998.
101. Nighoghossian, N., Trouillas, P., Adeleine, P., Salord, F., Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischaemic stroke: a double-blind pilot study, *Stroke*, 26, s1369-1372, 1995
102. Nighoghossian, N., Trouillas, P., Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke: an unsettled issue, *J. Neurol. Sci.*, 150, s27-31, 1997.
103. O' Dell, T. J., Huang, P. L., Dawson, T. M., Dinerman, J. L., Snyder, S. H., Kandel, E. R., Fishman, M. C., Endothelial NOS and the blockade of LTP by NOS inhibitors in mice lacking neuronal NOS, *Science.*, 265, s542-545, 1994.
104. Ogden, J. E., Moore, P. K., Inhibition of nitric oxide synthase: potential for a novel class of therapeutic agent, *Trend Biol. Tech.*, 13, s70-78, 1995.
105. Oury, T. D., Ho, Y. S., Piantadosi, C. A., Crapo, J. D., Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide and central nervous system O₂ toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, s9715-9719, 1992.
106. Öter, Ş., Hiperbarik Oksijen Uygulamalarının Sıçan Akciğerinde Oluşturduğu Oksidatif Stresin Belirlenmesi, GATA Tıp Fakültesi, Fizyoloji A.D., Uzmanlık Tezi, Ankara, 1998.
107. Pablos, M. I., Reiter, R. J., Chuang, J. I., Ortiz, G. G., Guerrero, J. M., Sewerynek, E., Agapito, M. T., Melchiorri, D., Lawrance, R., Denekse, S. M., Acutely administered melatonin reduces oxidative damage in lung and brain induced by hyperbaric oxygen, *J. Appl. Physiol.*, 83, s354-358, 1997.
108. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G., Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature.*, 327, s524-526, 1987.

109. Parsons, M. W., Barber, P. A., Desmond, P. M., Acute hyperglycemia adversely affects stroke outcome: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study, *Ann. Neurol.*, 52, s20-28, 2002.
110. Pelligrino, D. A., Koenig, H. M., Albrecht, R. F., Nitric oxide synthesis and regional cerebral blood flow responses to hypercapnia and hypoxia in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 13, s80-87, 1993.
111. Prass, K., Wiegand, F., Schumann, P., Ahrens, M., Kapinya, K., Harms, C., Liao, W., Trendelenburg, G., Gertz, K., Moskowitz, M. A., Knapp, F., Victorov, I. V., Megow, D., Dirnagl, U., Hyperbaric oxygenation induced tolerance against focal cerebral ischemia in mice is strain dependent, *Brain. Res.*, 871, s146-150, 2000.
112. Rees, D. D., Palmer, R. M. J., Schulz, R., Hodson, F., Moncada, S., Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo, *Br. J. Pharmacol.*, 101, s746-752, 1990.
113. Rockswold, S. B., Rockswold, G. L., Vargo, J. M., Erickson, C. A., Sutton, R. L., Bergman, T. A., Biros, M. H., Effect of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients, *J. Neurosurg.*, 94, s403-411, 2001.
114. Roos, J. A., Jackson-Friedman, C., Lyden, P., Effects of hyperbaric oxygen on neurologic outcome for cerebral ischemia in rats, *Acad. Emerg. Med.*, 5, s18-24, 1998.
115. Rusyniak, D. E., Kirk, M. A., May, J. D., Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke: results of the hyperbaric oxygen in acute ischemic stroke trial pilot study, *Stroke*, 34, 571-574, 2003.
116. Sadır, S., Rat Epigastrik Ada Flebinde Oluşturulan İskemi-Reperfüzyon Hasarında Hiperbarik Oksijen ve Nitrik Oksitin Rolü, *Fizyoloji A. D, Uzmanlık Tezi*, Ankara, 2003.
117. Sarno, M. T., Sarno, J. E., Diller, L., The effect of hyperbaric oxygen on communication function in adults with aphasia secondary to stroke, *J. Speech. Hearing. Res.*, 15, s42-48, 1972.

118. Sato, S., Tominaga, T., Ohnishi, T., Ohnishi, S. T., EPR spin-trapping study of nitric oxide formation during bilateral carotid artery occlusion in the rat, *Biochim. Biophys Acta.*, 1181, s195-197, 1993.
119. Sheikh, A. Y., Gibson, J. J., Rollins, M. D., Hopf, H. W., Hussain, Z., Hunt, T. K., Effect of hyperoxia on Vascular Endothelial Growth Factor levels in a wound model, *Arch. Surg.* 135, s1293-1297, 2000..
120. Shiokawa, O., Fujishima, M., Yanai, T., Ibayahai, S., Ueda, K., Yagi, H., Hyperbaric oxygen therapy in experimentally induced acute cerebral ischemia, *Undersea Biomed. Res.*, 13, s337-344, 1986.
121. Siesjo, B. K., Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia, I: pathophysiology, *J. Neurosurg.*, 77, s169- 184, 1992.
122. Siesjo, B. K., Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia II: mechanisms of damage and treatment, *J. Neurosurg.*, 77, s337- 354, 1992.
123. Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T., Meldrum, B. S., Blockade of N-Methyl-d-aspartate receptors may protect against ischaemic damage in the brain, *Science.*, 226, s850-852, 1984.
124. Stamler, J. S., Simon, D. I., Osborne, J. A., Mullins, M. E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D. J., Loscalzo, J., S-nitrosylation of proteins by nitric oxide: Synthesis and characterization of novel biologically active compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89, s444-448, 1992.
125. Stamler, J. S., Singel, D. J., Loscalzo, J., Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science.*, 258, s1898-1902, 1992.
126. Sunami, K., Takeda, Y., Hashimoto, M., Hirakawa, M., Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery, *Crit. Care Med.*, 28, s2831-2836, 2000.
127. Sydsærf, S. G., Borelli, A. G., Green, A. R., Cross, A. J., Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat: studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window, *Br. J. Pharmacol.*, 135, s103-112, 2002.

128. Takahashi, M., Iwatsuki, N., Ono, K., Tajima, T., Akama, M., Koga, Y., Hyperbaric oxygen therapy accelerates neurologic recovery after 15-minute complete global cerebral ischemia in dogs, *Crit. Care Med.*, 20, s1588-1594, 1992.
129. Tamura, A., Graham, D. I., McCulloch, J., Teasdale, G. M., Focal cerebral ischemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 1, s53-60, 1981.
130. Thom, S. R., Functional inhibition of neutrophil β_2 integrins by hyperbaric oxygen in carbon monoxide mediated brain injury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 123, s248-256, 1993.
131. Thom, S. R., Mendiguren, I., Hardy, K., Inhibition of human β_2 integrin-dependent adherence by hyperbaric oxygen, *Am. J. Physiol*, 272, sc770-c777, 1997.
132. Traynelis, S. F., Hartley, M., Heinemann, S. F., Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines, *Science.*, 268, 873-876, 1995.
133. Veltkamp, R., Siebing, D. A., Heiland, S., Schoenffeldt-Varas, P., Veltkamp, C., Schwaninger, M., Schwab, S., Hyperbaric oxygen induces rapid protection against focal cerebral ischemia, *Brain Res.*, 1037, s134-138, 2005.
134. Veltkamp, R., Siebing, D. A., Sun, L., Heiland, S., Bieber, K., Marti, H. H., Nagel, S., Schwab, S., Schwaninger, M., Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia, *Stroke.*, 36, s1679-1683, 2005.
135. Veltkamp, R., Warner, D. S., Domoki, F., Brinkhous, A. D., Toole, J. F., Busija, D. W., Hyperbaric oxygen decreases infarct size and behavioral deficit after transient focal cerebral ischemia in rats, *Brain Res.*, 853, s68-73, 2000.
136. Virkhaus, R. B., Lucchesi, R., Simpson, P. J., Shebuski, R. J., The role of adhesion molecules in cardiovascular pharmacology: meeting review, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 273, s569-575, 1995.

137. Wada, K., Ito, M., Miyazawa, T., Katoh, H., Nawashiro, H., Shima, K., Chigasaki, H., Repeated hyperbaric oxygen induces ,ischaemic tolerance in gerbil hippocampus, *Brain Res.*, 740, s15-20, 1996.
138. Wade, S., Smith., Pathophysiology of Focal Cerebral Ischemia: a therapeutic perspective., *J. Vasc. Radiol.*, 15, sS3-S12, 2004.
139. Wolff, D. J.,Lubeskie, A., Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase, *Arc. Biochem. Biophys.*, 316, s290-301, 1995.
140. Yamada, T., Taguchi, T., Hirata, Y., Toyohara, T., Hirose, R., Suita, S., Yagi, H., The effect of hyperbaric oxygenation on ischemia- reperfusion injury of the small intestine, *Transplan proc* 26, s1506-1507, 1994.
141. Yamanaka, K., Kumura, E., Iwatsuki, K., Yoshimine, T., Masana, Y., Hayakawa, T., Shiga, T., Kosaka, H., Increase in plasma nitric oxide end-products following rat cortical injury, *Neurosci. Lett.*, 194, s124-126, 1995.
142. Yang, Z. J., Camporesi, C., Yang, X., Wang, J., Bosco, G., Lok, J., Gorji, R., Schelper, R. L., Camporesi, E. M., Hyperbaric oxygenation mitigates focal cerebral injury and reduces striatal dopamine release in a rat model of transient middle cerebral artery occlusion, *Eur. J. Appl. Physiol.*, 87, s101-107, 2002.
143. Yin, D., Zhou, C., Kusaka, I., Calvert, J. W., Parent, A. D., Nanda, A., Zhang, J. H., Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23, s855-864, 2003.
144. Yin, W., Badr, A. E., Mychaskiw, G., Zhang, J. H., Down regulation of COX-2 involved in hyperbaric oxygen treatment in a rat transient focal cerebral ischemia model, *Brain Res.*, 926, s165-171, 2002.
145. Yoshida, T., Limmroth, V., Irikura, K., Moskowitz, M., The NOS inhibitor 7-nitroindazole decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels, *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.*, 14, s924-929, 1994.
146. Zamboni, W. A., Roth, A. C., Russell, R. C., Grahnan, B., Suchy, H., Kucan, J. O., Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen, *Plast. Reconstr. Surg.*, 91, s1110-1123, 1993.

147. Zhang, F., Casey, R., Ross, M. E., Iadecola, C., Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion, *Stroke*, 27, s317-323, 1996.
148. Zhang, F., Iadecola, C., Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischaemic damage, *Brain Res.*, 802, s104-110, 1998.
149. Zhang, F., White J. G., Iadecola, C., Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal cerebral ischemia: Evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 14, s217-226, 1994.
150. Zhang, R. L., Chopp, M., Li, Y., Zaloga, C., Jiang, N., Jones, M. L., Miyasaka, M., Ward, P. A., Anti- ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat, *Neurology*, 44, s1747-1751, 1994.
151. Zhang, Z. G., Chopp, M., Gautam, S., Zaloga, C., Chang, R. L., Schmidt H. W., Pollock, J. S., Forstermann, U., Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat, *Brain Res.*, 654, s85-95, 1994.
152. Zhang, Z. G., Reif, D., Macdonald, J., Tang, W. X., Kamp, D. K., Gentile, R. J., Shakespeare, W. C., Murray, R. J., Chopp, M., ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, s599-604, 1996.