

**T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ  
FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DÖRT-DAMAR OKLÜZYON İSKEMİ MODELİNİN  
UYGULANDIĞI SIÇANLARDA  
ERİTROPOİETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN  
DAVRANIŞSAL VE BİYOKİMYASAL  
OLARAK İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ**

**DR. EMEL DİKBAŞ**

**DANIŞMAN: PROF. DR. İZZETTİN HATİP**

**DENİZLİ – 2006**

İş bu çalışma jürimiz tarafından **FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda  
**TIPTA UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**BAŞKAN: Prof. Dr. İzzettin HATİP**



**ÜYE: Prof. Dr. Bünyamin KAPTANOĞLU**



**ÜYE: Doç. Dr. Atilla OĞUZHANOĞLU**



**ÜYE: Doç. Dr. Esat ADIGÜZEL**



**ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Selim KORTUNAY**



Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.



14 / 06 / 2006

**DEKAN**

**Prof. Dr. Hüseyin BAĞCI**

## TEŞEKKÜR

Tez konumu belirlememe yardım eden ve her aŐamada bana yol gÖsteren Farmakoloji A.D. başkanımız sayın hocam Prof. Dr. İzzettin HATİP'e ve Yrd. Doç. Dr. Selim KORTUNAY'a, Yrd. Doç. Dr. Funda F. BÖLÜKBAŐI HATİP'e ve asistan arkadaşım AraŐ. Gör. Dr. Ertuğrul KAYA'ya;

Tezimin biyokimyasal incelemesinde yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalından Doç. Dr. Süleyman DEMİR'e;

Histolojik kesitler alma sırasındaki yardımlarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından AraŐ. Gör. Asiye USTA'ya ve hücre sayımı evresinde, anabilim dalının tüm olanaklarını kullanmama izin veren sayın Anatomi A.D. başkanı Doç. Dr. Esat ADIGÜZEL'e, kesitlerin fotoğraflanmasındaki yardımlarından dolayı anabilim dalının tüm olanaklarını kullanmama izin veren sayın Patoloji A.D. başkanı Prof. Dr. Ender DÜZCAN'a, asistan arkadaşlara ve anabilim dalı çalışanlarına, deney aşamasında her türlü imkanı sağlayan Veteriner Hekim Sayın Barbaros ŐAHİN'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin her aşamasında ve yazılmasında desteğini esirgemeyen eşim Fatih DİKBAŞ'a teşekkür ederim. Hayatım boyunca bana sabırla destek olan, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunuyorum.

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>2</b>
<b>2.1.BELLEK</b>	<b>2</b>
2.1.1. BELLEĞİN SINIFLANDIRILMASI	2
2.1.2. BELLEĞİN ANATOMİSİ	3
2.1.3. BELLEK BOZUKLUKLARI	5
2.1.4. GLOBAL İSKEMİNİN HAYVAN MODELLERİ	8
2.1.4.1. SEREBRAL İSKEMİ PATOFİZYOLOJİSİ	9
2.1.4.2. İSKEMİYE BAĞLI NÖRONAL KAYIP	11
2.1.4.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	12
2.1.4.4. GLOBAL SEREBRAL İSKEMİYİ TAKİBEN KULLANILAN DAVRANIŞSAL TESTLER	13
<b>2.2. ERİTROPOİETİN</b>	<b>14</b>
2.2.1. FARMAKOKİNETİĞİ	15
2.2.2. FARMAKODİNAMİĞİ	15
2.2.3. KLİNİK FARMAKOLOJİSİ	16
2.2.4. YAN ETKİLER	16
2.2.5. BEYİNDE EPO VE EPO RESEPTÖR SALINIMI	17
2.2.6. EPO GEN SALINIMININ OKSİJEN-BAĞIMLI DÜZENLENMESİ	18
2.2.7. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE EPO SALINIMININ FİZYOLOJİK ROLÜ	19
2.2.8. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE EPO ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI	21
2.2.9. EPO'NUN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİ	22
2.2.10. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE EPO'NUN KLİNİK ETKİSİ	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>26</b>
<b>3.1. HAYVANLAR</b>	<b>26</b>
<b>3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI</b>	<b>26</b>
<b>3.3. DENEY USÜLÜ</b>	<b>27</b>
3.3.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT TESTİ UYGULAMASI	27
3.3.1.1. DÜZENEK	27

3.3.1.2. USÜL	28
3.3.1.3. SEKİZ KOLLU LABİRENT TESTİNİN BAŞARI DEĞERLENDİRMESİ	28
3.3.2. DÖRT-DAMAR OKLÜZYON (4-VO) MODELİ	29
3.3.3. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME	33
3.4. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	33
3.5. BİYOKİMYASAL İNCELEME	33
3.5.1. HİPOKAMPAL MALONDİALDEHİD (MDA) DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ	33
3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME	34
3.6.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN İLE BOYAMA YÖNTEMİ	34
3.6.2. HÜCRE SAYIMI	35
3.7. KULLANILAN İLAÇLAR VE KİMYASAL MADDELER	35
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	36
<b>4. BULGULAR</b>	<b>40</b>
4.1. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN 8 KOLLU LABİRENT TESTİ BAŞARISI ÜZERİNE ETKİLERİ	40
4.1.1. DOĞRU SEÇİM SAYILARI	40
4.1.2. YANLIŞ SEÇİM SAYILARI	42
4.2. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN HİPOKAMPAL MDA DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİLERİ	44
4.3. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN HİPOKAMPUSUN CA1 ve CA3 BÖLGELERİNDEKİ HÜCRE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİ	45
4.3.1. CA1 BÖLGESİNDEKİ HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI	45
4.3.2. CA3 BÖLGESİNDEKİ HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI	45
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>47</b>
<b>6. SONUÇLAR</b>	<b>50</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>52</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>54</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>56</b>

## TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo-1:</b> Bellek bozukluklarıyla bağlantılı bazı etyolojiler	7
<b>Tablo-2:</b> Global iskemi modelleri	9
<b>Tablo-3:</b> Santral sinir sisteminde Epo ve Epo reseptör salınım bölgeleri	18
<b>Tablo-4:</b> Sekiz kollu labirent testinde dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu doğru seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri	41
<b>Tablo-5:</b> Sekiz kollu labirent testinde, dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu yanlış seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri	43
<b>Tablo-6:</b> Dört-damar oklüzyon iskemisiyle oluşan hipokampal MDA artışı üzerinde Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri	45
<b>Tablo-7:</b> Dört-damar oklüzyon iskemisi uygulanan sıçanlarda hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerindeki hücre sayılarının ortalaması	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Şekil-1:</b> Sıçan beyinde hipokampal formasyonun ana organizasyonu	4
<b>Şekil-2:</b> Hipokampusun laminer kesiti	5
<b>Şekil-3:</b> İskemik nöronal hasarın patofizyolojik işlev serisi	10
<b>Şekil-4:</b> İskemi-reperfüzyon hasarı, reverzibl-irreverzibl zedelenme	12
<b>Şekil-5:</b> Merkezi sinir sistemindeki hipoksinin uyardığı nöronal koruma mekanizmaları	20
<b>Şekil-6:</b> Epo reseptörüyle aktive edilen hücre içi sinyal transdüksiyon yolları	22
<b>Şekil-7:</b> Deneyde kullanılan 8 kollu radyal labirent test düzeneğinin test anında üstten görünümü	27
<b>Şekil-8:</b> Sıçanın stereotaksiye yerleştirilmiş hali	30
<b>Şekil-9:</b> Sıçan kafatasının ve birinci ve ikinci servikal vertebranın dorsal görünümü	30
<b>Şekil-10:</b> Alar foramina ve transvers kanal altından vertebral arterin koterlenişi	32
<b>Şekil-11:</b> Ana karotis arterin askıya alınmış hali	32
<b>Şekil-12:</b> Hipokampus görünümü	34
<b>Şekil-13a:</b> Şekil-13a: Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA1, CA3 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham)	37
<b>Şekil-13b:</b> Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA1 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham)	38
<b>Şekil-13c:</b> Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA3 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham)	39
<b>Şekil-14:</b> Sekiz kollu labirent testinde dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu doğru seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri	41

**Şekil-15:** Sekiz kollu labirent testinde, dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu yanlış seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri **43**

**Şekil-16:** Dört-damar oklüzyon iskemisiyle oluşan hipokampal MDA artışı üzerinde Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri **44**

**Şekil-17:** Dört-damar oklüzyon iskemisi sonrasında hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerindeki hücre sayısı üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri **46**



## KISALTMALAR ÇİZELGESİ

<b>4-VO:</b>	4-damar oklüzyon
<b>BDNF:</b>	Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
<b>BOS:</b>	Beyin omurilik sıvısı
<b>CA:</b>	Cornu ammonis
<b>DG:</b>	Dentat girus
<b>DS:</b>	Doğru seçim
<b>Epo:</b>	Eritropoietin
<b>HIF:</b>	Hipoksi-indüklenebilir faktör
<b>iNOS:</b>	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
<b>i.c.v.:</b>	İntraserebroventriküler
<b>i.p.:</b>	İntraperitoneal
<b>i.v.:</b>	İntravenöz
<b>JAK-2:</b>	Janus-tirosinkinaz-2
<b>KBB:</b>	Kan- beyin bariyeri
<b>MAPK:</b>	Ras-mitogen tarafından aktive edilen protein kinaz
<b>MDA:</b>	Malondialdehid
<b>NO:</b>	Nitrik oksit
<b>rHuEpo:</b>	Rekombinant insan Eritropoietini
<b>s.c.:</b>	Subkutan
<b>SSS:</b>	Santral sinir sistemi
<b>STAT-5:</b>	Sinyal transdüsörleri ve transkripsiyon 5 aktivatörleri
<b>TNF:</b>	Tümör nekroz faktör
<b>VEGF:</b>	Vasküler endotelial büyüme faktörü
<b>YS:</b>	Yanlış seçim

## 1.GİRİŞ

Serebrovasküler hastalıkların neden olduğu demans ve bellek bozuklukları, halen etkili tedavisi olmayan, gün geçtikçe önem kazanan klinik durumlardır. Terapötik özelliğe sahip, toksisitesi az olan, iskemi tedavisinde kullanılan ve klinik olarak etkili ilaçlar geliştirilmektedir ve gün geçtikçe değer kazanmaktadır (1).

İnsanlarda görölen iskemik inme; belirtilerinde, nedenlerinde ve anatomik konumlarında çok biçimlilik gösterir ve inme için iskemik beyin hasarını çalışmada farklı yöntemler bulmak için çeşitli hayvan modelleri geliştirilmiştir. Kemirgenlerde fokal ve global serebral iskemiye takiben görölen fonksiyonel kayıplar inme hastalarında tipik olarak görölenlerle benzerlik gösterir (2).

Eritropoietin (Epo), kemik iliğinde öncöl hücrelerin fonksiyonel eritroblastlara farklılaşmasını stimüle eder. Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen Epo'nun ilaç olarak jenerik adı epoetin'dir (3). Epo ve reseptörü hem merkezi hem de periferik sinir sisteminde bulunmakta ve hipoksi gibi uyaranlarla salınımları artmaktadır. Epo'nun *in vivo* inme, nöroinflamasyon, beyin travması, subaraknoid kanama deneysel epilepsi ve Parkinsonizm gibi deneysel modellerde nöronları koruyucu etkisi belirlenmiştir (4).

Çalışmamızda, deneysel tekrarlayan beyin iskemisi modeli uygulanmış sıçanlarda, Epo'nun nöroprotektif etkilerinin ve bellek fonksiyonları üzerindeki tedavi edici etkilerinin 4-damar oklüzyon (4-VO) modelinde davranış testleri ile gösterilmesi ve lipid peroksidasyonu üzerine koruyucu etkilerinin olup olmadığının biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1.BELLEK**

#### **Tarihçesi:**

Tarih boyunca sağlıklı ve hastalıklı bellek, tıbbi çalışmaların odağında olmuştur. Belleğin bilimsel ölçümü 1800'lerde Ebbinghaus'un monografıyla başladı. Demans, beyin atrofisi, bellek kaybı ve amnezi bağlantılı travma çalışmaları, Samuel Wilks, Jean Esquirol ve Alois Alzheimer gibi nörolojinin önde gelen isimleri tarafından yürütüldü. Belleğin duygusal bileşenlerle bağlantısı, anatomik çalışmaları modern bellek çevrimi bilgisinin temellerinin çoğunu oluşturan James Papez tarafından sunuldu (5).

#### **Tanımı:**

Bellek, bilinen deneyim, gerçekler, hatırlanan olaylar ve kazanılan ve uygulanan becerilerden elde edilen bilginin kaydedilmesi, tutulması ve geri çağırılmasıdır. Bellek, üniter bir duyu olmaktan çok, kullanımları, işlev karakteristikleri ve işlevlerini düzenleyen sinir ağları açısından farklılık gösteren çeşitli öğrenme formlarının bir bütünüdür. Bir bellek sistemi, hatırlamaya yönelik işlevin özgün bir formunu düzenleyen özel bir sinir ağı olarak tanımlanabilir (5).

### **2.1.1.BELLEĞİN SINIFLANDIRILMASI**

#### **Açık ve Örtülü Bellek**

Açık bellek, olaylarla ilgili gerçeklerin, deneyimlerin ve bilgilerin elde edilmesine karşı gelir. Bilinçli farkında olma durumunda doğrudan erişilebilen bellektir ve bu yüzden "deklare" edilebilir (6). Medial temporal lob bellek sistemi, açık belleği destekler. Bu sistemi hasarlı olan amnezik hastalar açık bellek bozuklukları yaşar (7).

Diğer yandan örtülü bellek, klasik şartlanma, beceri ve alışkanlıkları içerir ve çoğunlukla tamamen bilinç dışıdır (8). Örtülü bellek, açık olarak veya isteyerek değil refleksive veya olaylara bağlı olarak elde edilen bellek formlarına karşı gelir. Nasıl yüzüleceğini veya bisiklet kullanılacağını

hatırlamak bu bellek tipine girer. Bu bellek formları, davranışı, geçmiş deneyimler ışığında bu deneyimlerin bilinçli şekilde farkında olmadan yönlendirir ve bu yüzden örtülü bellek olarak adlandırılır (5).

### **Kısa ve Uzun Süreli Bellek**

Bazı belleklerin sadece birkaç saniye ve bazılarının da saatler, günler, aylar veya yıllar boyunca sürdüğü bilinmektedir. Bellekleri üç sınıfta inceleyen genel bir sınıflandırma şöyledir:

- a) Kısa süreli bellek: Uzun süreli belleğe dönüştürülmediklerinde saniyeler veya en çok dakikalar boyunca süren bellekleri içerir.
- b) Orta derecede uzun süreli bellek: Günler veya haftalar boyunca sürer fakat ardından kaybolur.
- c) Uzun süreli bellek: Bir defa kaydedildikten sonra yıllar boyunca ve hatta ömür boyu geri çağrılabilen belleklerdir (9).

### **2.1.2. BELLEĞİN ANATOMİSİ**

Hipokampus, neokorteksin birçok bölgesinden, özellikle de temporal kısımdan bilgi alır. Kortikal bilgi, perforan ve alvear yollar üzerinden öncelikle parahipokampal girustaki entorinal kortekse, oradan da dentat girusa yayılır, buradan da hipokampusa ulaşır (10).

İnsan hipokampusu serebral hemisferlerde bilateral olarak yer alır ve her bir lateral ventrikülün temporal boynuzu boyunca uzanan bir sırt oluşturur. Bu yapılar şekil olarak kıvrımlıdır ve hücresel yapı ve düzendeki farklılıklarla tanımlanan birkaç ayrı bölgeden oluşur. Aksonlar, hipokampus bölgesini oluşturan nöronlardan yükselir, fimbriadan uzanarak hipokampal yapının dışındaki ana beyaz madde bölgesi olan fornikse devam eder (6).

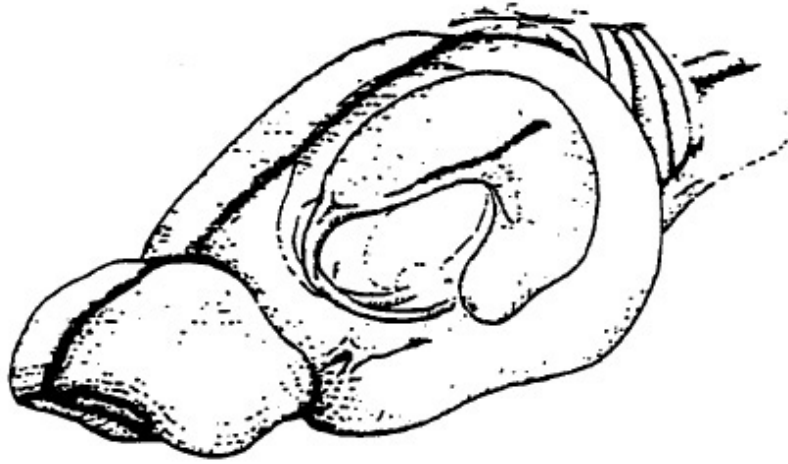
Hipokampal formasyon, dentat girus (DG), daha sonra CA1, CA2, CA3 ve CA4'e ayrılan hipokampus proper veya cornu ammonis (CA), subikulum, presubikulum ve entorhinal korteksi içerir. Hipokampus, limbik sistemin bir parçası olarak ele alınır ve çift yönlü olarak diğer beyin bölgelerine forniks ve perforant yolla bağlıdır. İki taraflı yapı, serebral korteksin ventroposterior ve

ventrolateral yüzeylerin çoğunu kaplar. Dentat girus ve CA'nın tabakaları, gelişim sırasında bir C şekli oluşturarak invajine olurlar. CA bölgesi üç ana tabaka içerir: polimorfik tabaka (stratum oriens), piramidal tabaka (stratum pyramidale) ve moleküler tabaka (stratum radiatum). CA bölgesi 3-5 hücreli bir piramidal nöron tabakası ve dört ayrı bölge içerir. CA1 subiculuma bağlıdır ve yakın şekilde yığılmış piramidal hücreler içerir. CA3, CA1'e benzer olmasına rağmen daha az sayıda ama daha büyük piramidal hücreler içerir (11).

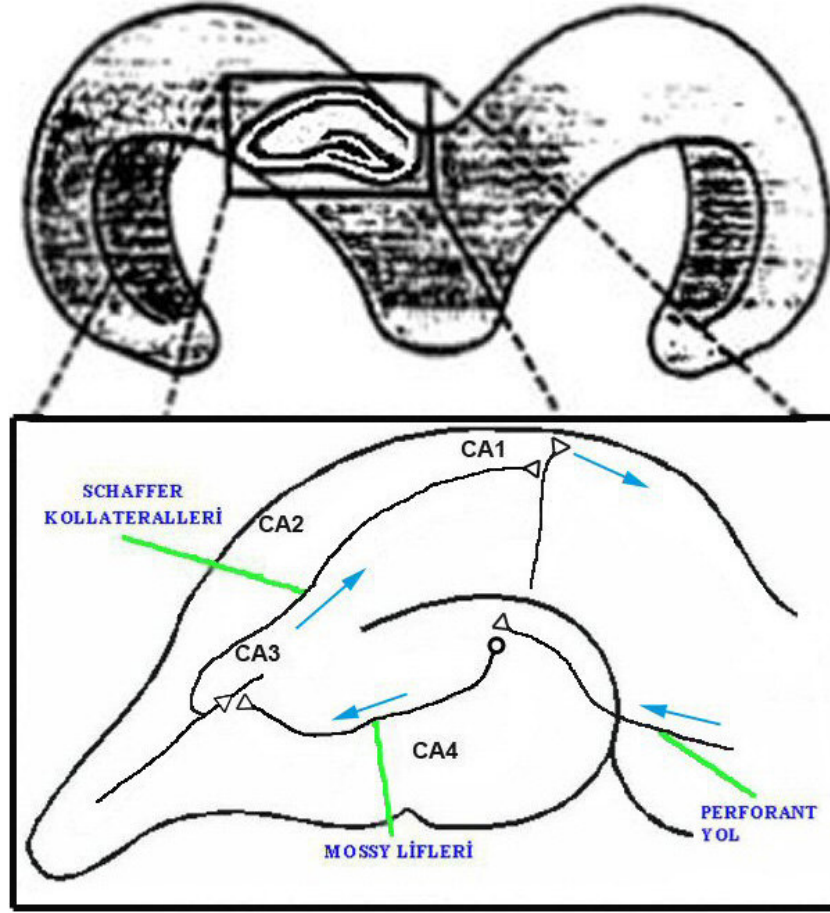
Hipokampal yapı, bellekteki rolü açısından iyi bilinir. Açık belleğin oluşmasından sorumludur. Hipokampus, belleği, korteksin başka bir yerinde pekiştirilmeden önce haftalar boyunca tutar (12).

### **Sıçan Hipokampusu**

Sıçanda, hipokampal formasyon, uzun ekseni yaklaşık 45 derecelik bir açıyla diensefalonun üzerinden ve arkasından temporal loba kaudoventral olarak (Şekil-1, Şekil-2), C'ye benzer şekilde bazal ön beyinin septal çekirdeklerinden rostradorsal şekilde ilerleyen uzunlamasına bir yapı olarak ortaya çıkar. Bu nedenle hipokampal formasyonun uzunlamasına yapısı, septotemporal eksen ve her iki ucu sırasıyla septal kutup ve temporal kutup olarak tanımlanır (Şekil-1, Şekil-2) (13).



Şekil-1: Sıçan beyinde hipokampal formasyonun ana organizasyonu (13). C şeklindeki hipokampus, sıçan beyinin saydam bir kabuğu olarak gösterilmiştir.



Şekil-2: Hipokampusun laminar kesiti: Yukarı kısımda, hipokampal formasyonun üç boyutlu yapısı görülmektedir. Alt tarafta, hipokampusun boyuna eksenine dik en kesitinin, gösterilen seviyedeki laminar yapısı verilmiştir (13).

### 2.1.3. BELLEK BOZUKLUKLARI

#### Amnezi:

Açık bellekteki bir düzensizlik amnezi olarak tanımlanır. Gerçek bir amnezi, açık belleğin, dikkat, algı, dil veya motivasyon gibi hatırlatıcı olmayan eksikliklerle açıklanamayan nispeten sınırlanmış bir bozukluğudur. Anterograd amnezi, yeni açık bellekler oluşturamama durumuna karşı gelir. Retrograd amnezi, amnezi başlangıcından önce kazanılmış belleğin kaybını ifade eder. Kısa süreli bellek kapasitesi yaşam boyunca sürekli şekilde azalır. Bellek bozukluklarıyla bağlantılı bazı etyolojiler Tablo-1'de gösterilmiştir (5).

Teşhise odaklanmada, bellek bozukluğunun zamansal başlangıcı ve ilerlemesiyle ilgili bilgi faydalıdır. Bellek bozukluğunun akut başlangıcı, bir inme veya anoksik periyoda işaret eder. İlerleyici bir durum oluşturan ani bir başlangıç, vasküler demans gibi bir bellek problemi şüphesi uyandırır. Gizli, yavaş yavaş ilerleyen, kronik bir gerileme dikkati alkol bağlantılı demansa veya Alzheimer hastalığına yöneltir. Bellek bozukluğunun haftalar veya aylar içinde daha hızlı ilerlemesi depresyon bağlantılı bir bellek kaybına veya eğer nöbetler de varsa primer veya metastatik tümörlere veya ensefalitlere işaret eder.

Tıbbi geçmiş tam olarak belirlenmelidir, çünkü bellek bozukluklarının birincil ve ikincil nedenleri çok çeşitlidir. Alkol, ilaç ve diyetle ilgili alışkanlıklar hakkında bilgiler elde edilmelidir. İleri derecede alkol tüketimi, Wernicke-Korsakoff psikozu veya hepatorenal ensefalopati yoluyla bellek bozukluğuna neden olabilir. Detaylı bir ilaç kullanım geçmişi elde edilmelidir çünkü birçok ilaç tedavisi doğrudan veya dolaylı olarak bellek başarısını düşürür. Cerrahi müdahale, travma veya kafa yaralanması hikayesi, beyin yapılarının serebral anoksi veya direkt travma olasılığı araştırılmalıdır. Nöbetlerin veya baş ağrılarının başlangıcı ve ilerleyişi, tümörler, anevrizmalar, ensefalitler veya epilepsi şüphelerini yönlendirmek için netleştirilmelidir. Geçmişteki bir kanser vakası, beyine bir metastaz veya paraneoplastik düzensizlik şüphesi ortaya çıkarabilir. Bilinen hipertansiyon, inme veya geçici iskemik ataklar bellek bozukluğunun vasküler bir sebebine işaret eder. Geçmişteki bir depresyon, özellikle dikkat çekicidir, çünkü bellek kaybı genellikle sinirlilik, suçluluk ve delüzyonların da bulunduğu depresif dönemlerde görülür. (5).

Tablo-1 : Bellek bozukluklarıyla bağlantılı bazı etyolojiler (5)

Etyolojik Kategori	Özel Etiyolojiler
<p><b>YAPISAL BOZUKLUKLAR</b> Gelişimsel bozukluklar</p> <p><b>KALITSAL VE DEJENERATİF BOZUKLUKLAR</b> Kromozomal anormallikler ve nörokütanöz bozukluklar Dejeneratif demans Hareket bozuklukları</p> <p><b>KAZANILMIŞ METABOLİK VE BESİNSEL BOZUKLUKLAR</b> Endojen metabolik bozukluklar Eksojen kazanılmış metabolik bozukluklar Toksinler ve illisit ilaçlar Alkolizme bağlı besinsel yetersizlikler ve sendromlar</p> <p><b>BULAŞICI HASTALIKLAR</b> Viral enfeksiyonlar Viral olmayan enfeksiyonlar</p> <p>Bulaşabilen spongiform ensefalopatiler HIV ve AIDS</p> <p><b>NÖROVASKÜLER BOZUKLUKLAR</b></p> <p><b>NEOPLASTİK BOZUKLUKLAR</b> Primer nörolojik tümörler Metastatik neoplazmalar ve paraneoplastik sendromlar</p> <p><b>DEMİYELİNİZAN BOZUKLUKLAR</b> Santral sinir sisteminin demiyelinizan bozuklukları</p> <p><b>TRAVMATİK BOZUKLUKLAR</b></p> <p><b>EPİLEPSİ</b></p> <p><b>UYKU BOZUKLUKLARI</b></p> <p><b>İLAÇ KAYNAKLI VE İATROJENİK NÖROLOJİK BOZUKLUKLAR</b></p>	<p>Kompanse hidrosefali</p> <p>Kan bağı</p> <p>Alzheimer hastalığı, Pick hastalığı Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı</p> <p>Hepatik ensefalopati, hipotiroidizm, anoksi Antikolinergik intoksikasyonu Kurşun intoksikasyonu Korsakof psikozu Alkol yoksunluğu</p> <p>Herpes simpleks ensefaliti Bakteriyel ensefalit Serebral apse, bakteriyel menenjit Creutzfeld-Jakob hastalığı AIDS demans kompleksi Multi-infakt demans Posterior serebral arter oklüzyonu Subkortikal arteriosklerotik ensefalopati (Binswanger hastalığı) Primer tümör (özellikle medial temporal lob, forniks veya talamustakiler) Metastatik melanoma, paraneoplastik sendrom</p> <p>Multiple skleroz</p> <p>Travmatik kafa hasarı Medial temporal lob epilepsisi Medial temporal lob epilepsisini tedavi etmek için cerrahi lobektomi Uykusuzluk, uyku apnesi Elektrokonvülsif tedavi İlaçla tedavi: analjezik, antihipertansif, antikolinergik, psikotropik, sedatif etkili ilaç tedavisi</p>



#### **2.1.4. GLOBAL İSKEMİNİN HAYVAN MODELLERİ**

Global serebral iskemide, beynin tamamında ya da ön beyinde kan akımında azalma olur. Global iskeminin deneysel modelleri, kardiyak arrest, aşırı hipotansiyon veya boğulma esnasında meydana gelen hipoksik/iskemik durumu temsil eder (14).

Kediler, tavşanlar, köpekler ve insanlar dışındaki primatlar serebral iskemideki hayvan modelleri için kullanılmış olmalarına rağmen bu deneylerin birçoğu kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Serebral damarlanma anatomisinin kemirgenler ve insanların da dahil olduğu daha yüksek türdeki canlılar arasında çok büyük farklılık göstermemesi gerçeği bu seçimi destekler. Sosyal ve etik açıdan daha fazla kabul edilirlilik, daha düşük maliyet ve genetik türdeşliğin yüksek olması nedeniyle kemirgenler tercih edilmektedir (2).

1980'lerin başında kemirgenlerde global iskeminin günümüzde de çoğunlukla kullanılan üç modeli tanımlanmıştır (2):

1. sıçanlardaki vertebral arterlerin kalıcı olarak kapatıldığı ve karotislerin geçici olarak 10-30 dakika klemplendiği 4-VO.

2. sıçanlardaki her iki ana karotis arterin geçici oklüzyonu ve kanın geri çekilmesine bağlı olarak aynı anda arterial hipotansiyon tarafından oluşturulan iki-damar oklüzyonu artı hipotansiyon modeli.

3. gelinciklerdeki her iki ana karotis arterin geçici oklüzyonu. Bu hayvanlar tam olmayan Willis poligonu gösterdiklerinden global serebral iskemi oluşturma açısından yeterlidir (2).

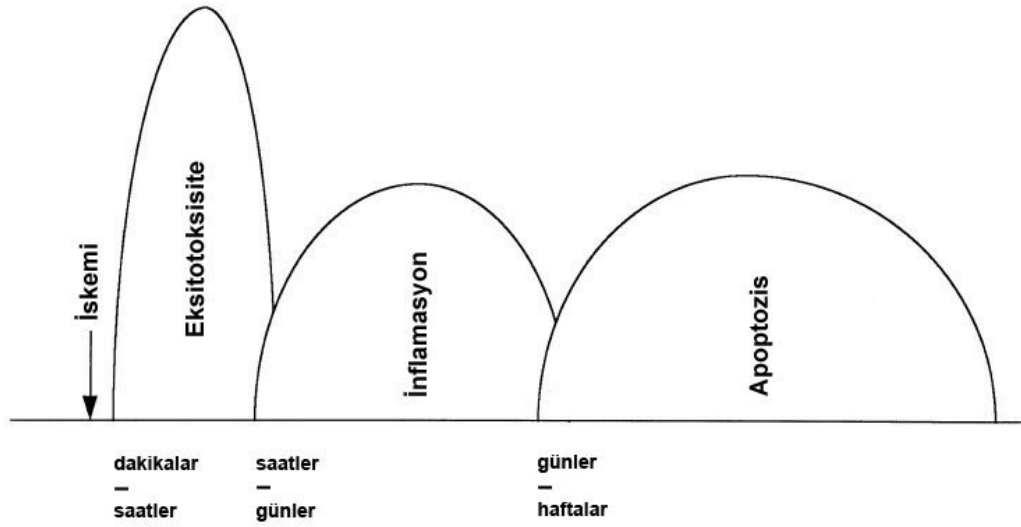
Tablo-2'de en yaygın kullanılan hayvan modellerinin avantaj ve dezavantajları listelenmiştir (14).

Tablo-2: Global iskemi modelleri

<b>Model</b>	<b>Avantajları(+) / dezavantajları (-)</b>
Gelincik-modeli:	+ operasyon kolaydır: sadece ana karotis arterlerin kısa oklüzyonu gereklidir - davranışsal testler için daha az olasılık vardır - serebral dolaşımdaki varyasyonlar nedeniyle sonuçlar değişkendir
Sıçanlar: iki-damar oklüzyonu	+ operasyon tek basamaktır: sadece ana karotis arterlerde oklüzyon yapılır + oklüzyon geri dönüşümlüdür + solunumun ventilasyonla kontrolü mümkündür - hipotansiyonun indüksiyonuna ihtiyaç vardır - oklüzyon sırasında anesteziye ihtiyaç vardır, bu sonuçların yorumlanmasını karmaşıktırabilir
Sıçanlar: dört-damar oklüzyonu	+ iskemik oklüzyon sırasında anesteziye gereksinim duyulmaz + en sık kullanılan global iskemi modelidir + net olarak geçerliliği onaylanmıştır - operasyon iki basamaklıdır, vertebral arterlerin kapatılması için oldukça invaziv operasyon yapılır - usül kısmen geri dönüşümlüdür: vertebral arterler kalıcı olarak kapatılır

#### **2.1.4.1. SEREBRAL İSKEMİ PATOFİZYOLOJİSİ**

Global serebral iskemi, iskemik hücre hasarına katkıda bulunan patofizyolojik işlevler serisine yol açar (Şekil-3) (2).



Şekil-3: İskemik nöronal hasarın patofizyolojik işlev serisi

İskemi ve erken reperfüzyon sırasında eksitatör aminoasitlerin aşırı miktarda salınımı, hücre içi kalsiyumla aşırı yüklenme ve serbest radikallerde artış, eksitotoksisite olarak isimlendirilen evrenin önemli göstergeleridir. Presinaptik terminallerden aşırı glutamat salınımı ve glutamat geri alım mekanizmalarının inhibisyonu, hücre dışı glutamat artışına yol açar. Hassas yapılarda saptanabilen bu artmış hücre dışı glutamat konsantrasyonu çoğunlukla iskemik periyoda bağlıdır. Reperfüzyon sonrası süratle iskemi öncesi değerlere döner. Glutamat reseptörlerinin yoğun uyarılması, enerji yoksunluğuna bağlı olarak kalsiyum -ATPaz tarafından ortadan kaldırılamayan voltaj bağımlı kalsiyum kanalları ve reseptör aracılığıyla kalsiyum girişine yol açar. Ek olarak, kalsiyum hücre içi depolardan sitozole salınır. Proteazlar, fosfolipazlar, endonükleazlar ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS), sonradan membran, nükleus ve diğer organelleri hasara uğratan kalsiyum ile aktive olur (2).

İnflamasyonun, dokuya nötrofil lökositlerin migrasyonu, glial hücrelerin aktivasyonu ve bu inflamatuvar hücreler tarafından potansiyel sitotoksik maddelerin salınımıyla karakterize olan bir evresi, global iskemiye takiben hücre ölümü patofizyolojisine dahildir. Global iskemiye yanıt olarak nötrofil lökositler selektif nöronal hasar bölgelerine akın eder. Mikroglia ve

astrositlerin aktivasyonu nöronal hasardan önce gelir ve 4 haftaya kadar sürer. Bu inflamatuvar hücreler proinflamatuvar sitokinlerden interlökin- $\beta$  ve tümör nekroz faktör (TNF)- $\alpha$  sentezler ve salgılar ve tümü nörotoksik olabilen iNOS izoformunu aktive eder. Global iskemiden sonra çok erken dönemde interlökin- $\beta$  ve TNF- $\alpha$  mRNA ve proteinleri hipokampus içinde artar. Azalmayı takiben 5. güne kadar devam eden proinflamatuvar sitokinlerin ikinci artışı gözlenir. Global iske mi, hipokampal CA1 bölgesi içindeki reaktif astrositlerde iNOS salınımı ile sonuçlanır (2).

Global iskemiden 3-4 gün sonra CA1 nöronlarında apoptotik değişiklikler gösterilmiştir. Apoptozisi antagonize eden protein sentez inhibitörleriyle veya büyüme faktörleriyle tedavinin iskemik hasarı iyileştirdiği gösterilmiştir ve bu nedenle, apoptozisin, global iskemiyi takiben nöronal hasara katkıda bulunduğu görüşünü kanıtlamıştır (2).

#### **2.1.4.2. İSKEMİYE BAĞLI NÖRONAL KAYIP**

Global iskemiy e hassasiyetlerine göre beyin bölgeleri arasında farklılıklar vardır. Örneğin bazı hipokampal nöronlar iskemik müdahalelere duyarlıdır. CA3 piramidal nöronlarının çoğu canlı kalırken ve dentat girusdaki granüler hücreler iskemik hasara dirençli iken, CA1 bölgesindeki piramidal nöronlar ve hilusdaki bazı nöronlar iskemik hasara en fazla maruz kalır. Ventral CA1, dorsal CA1'e göre global iskemiy e daha fazla dirençlidir ve bu bölgede sadece az miktarda hücre kaybı söz konusudur (14).

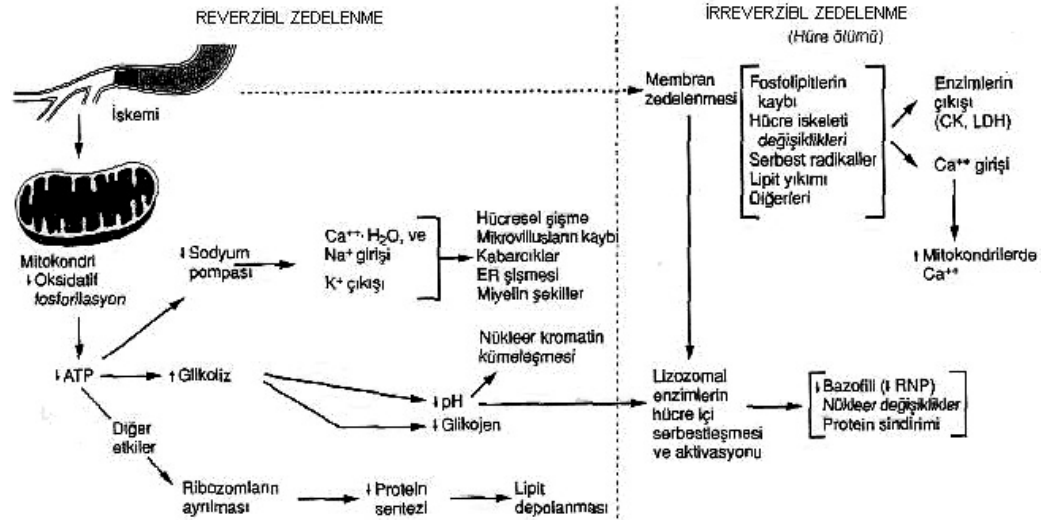
Beş dakikalık global iske mi, diğer grupları etkilememesine rağmen CA1 bölgesindeki piramidal hücre nöronlarının hemen hemen tümünde gecikmiş ölüme neden olur (14). Gelinciklerde 3 dakikalık ve sıçanlarda 10 dakikalık süre bu hipokampal hasarı oluşturmak için yeterlidir (2). Bununla birlikte 20 dakikalık iske mi, CA3 nöronlarında ölüme neden olur ancak hipokampusdeki dentat granül hücrelerde hemen hemen hiç etkisi olmaz (15).

Hipokampal nöronların seçici hassasiyeti glutamatla bağlantılı olabilir. Teorik olarak, glutamaterjik girişin antagonistlerle veya diğer yollarla

engellenmesi glutamaterjik eksitotoksiteyi önleyebilir. Örneğin, CA1 bölgesine eksitator girişin haraplanmasının iskemi sonrası CA1 hücre ölümüne karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Hem farelerde hem de insanlarda hipokampusün CA1 bölgesi, N-metil-D-aspartat reseptörlerinin en yüksek yoğunluğunu içerir. Bu reseptörlerin yoğun şekilde bulunmasının, seçici hassasiyette bir rol oynadıkları düşünülmektedir (16).

### 2.1.4.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

Mitokondriyel elektron iletim zincirinde terminal bir alıcı olan moleküler oksijenin kaybı, hücresel enerji üretiminde hızlı bir düşüşe neden olur (Şekil-4). Azalan metabolik enerji, nöronal hücre membranı içindeki iyonik pompalarda fonksiyon kaybıyla sonuçlanır ve hücre şişmesi oluşur. Bu hücresel şişme ile bağlantılı olarak, serbest iyonize kalsiyumun hücre içi konsantrasyonunda hızlı bir artış meydana gelir ve hücresel proteazlar kontrolsüz bir şekilde aktive olur. Ardından hücresel proteazlar, nöronal hücre fonksiyonu için önemli olan enzimleri denatüre etmek için gelişigüzel biçimde etki gösterirler. İskeminin de dahil olduğu patolojik ve fizyolojik ölüm yolları ile geri dönüşümsüz nöronal hücre ölümleri oluşur. Klinik açıdan, santral sinir sisteminin (SSS) iskemi reperfüzyon hasarı çok sayıda hastada ciddi nörolojik bozukluklara neden olur (17).



Şekil-4: İskemi-reperfüzyon hasarı, reverzibl-irreverzibl zedelenme (18)

İskemik dokulara kan akımının tekrar sağlanması, reverzibl hasara uğramış hücrelerin iyileşmesiyle sonuçlanırken irreverzibl hasara uğramış olanları etkilemez. Bununla birlikte iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak, çeşitli hücreler kan akımının yeniden başlamasından sonra da ölüme gidebilir (18).

ATP sentezinin azalması, iskemik ve toksik hasarın genel sonucudur. Reperfüzyon sırasında ATP üretimi yetersiz kalır. ATP yapımının durmasına ilaveten, toplam ATP'nin yarısına yakını iskeminin ilk 10-15 dakikasında yıkılır. Sitozol ve mitokondride kalsiyumun aşırı toplanması, reperfüzyon hasarında ileri sürülen önemli mekanizmalardan biridir (18).

Oksijen ve oksijen kökenli serbest radikallerin birikimi, iskemik dokunun revaskülarizasyonu sırasında oluşan iskemik hasarın diğer bir mekanizmasıdır. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ile hücre membranında hasar oluşturur (18). Geçici beyin iskemisine ikincil olan hasar, serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonu da dahil olmak üzere, birkaç mekanizma içerir ve beyin iskemisi sırasında reperfüzyonun ardından malondialdehid (MDA) salınır. İskemi sonrası MDA düzeylerindeki artış, serbest radikal salıverilmesinin neden olduğu lipid peroksidasyonun bir göstergesi olarak değerlendirilir (19). İskemi-reperfüzyonda Nitrik Oksit (NO) üretimi bozular. İskemi sırasında oksijen yokluğu nedeniyle NO sentezi engellenir. İskemi-reperfüzyonda NO sentaz aktivitesi de engellenir. Azalmış NO üretiminin bölgesel kan akımında bozulmaya ve mortaliteye katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (18).

#### **2.1.4.4. GLOBAL SEREBRAL İSKEMİYİ TAKİBEN KULLANILAN DAVRANIŞSAL TESTLER**

Sıçanlarda global iskemiden sonra öğrenme ve bellekte bozulmalar saptanır ve hipoksik/iskemik hipokampal hasarı olan hastalarda bellek kaybı görülür. İskemik sıçanlarda; T-maze, radial arm maze, water-maze, circular platform task ve gecikmiş non-matching to sample/position görevleri gibi çalışma ve uzamsal bellek gerektiren görevlerde bozulma görülür. Sıçanlarda

radial arm maze veya T-maze testlerinde davranışsal bozulma ve CA1'deki iskemik hücre ölümü arasında ilişki olduğu bulunmuştur (14).

Global iskemiyeye maruz kalan hayvanlara uygulanan davranışsal testler bakımından üç soru ortaya çıkmaktadır:

1. Global iskemiyeye davranışlar tamamen etkilenmiş mi?
2. Özel davranışsal görevler etkilenmiş mi?
3. Bu davranışsal bozukluklar geçici mi?

Öğrenme ve bellekteki bozukluklar oldukça uzun süreli gözükür. Bu davranışsal çalışmalar, global iskeminin neden olduğu bozukluklarda nöron koruyucu etki stratejilerinin azalmaya yol açıp açmadığını gösterebilir (2).

### **Sekiz Kollu Labirent Testi**

İskemik hasarın etkilerini değerlendirmek için 8 kollu labirent kullanılmıştır. Sekiz kollu labirent testinde kısa-dönem bellek başarısı iskemiden sonra tipik olarak bozulmaktadır. 4-VO ile yapılan 30 dakikalık global iskemi, 8 kollu labirent testinde başarının bozulmasıyla sonuçlanmıştır. Kısa süreli bellek hataları (daha önce girilmiş yemli kola tekrar girme) ve uzun süreli bellek hataları (yemlenmemiş kollara girme) ölçülmüştür. 4-VO kaynaklı iskemi, kısa süreli bellek üzerine bilgiyi kullanma yeteneğini uzun süreli bellekteki çapraz bilgi denemelerinden daha fazla bozmuştur (16).

Tekil bir iskemik dönemin uzamsal bellekte uzun süreli ve sürekli bir bozulmaya neden olmadığı, 8 kollu labirent uygulamasıyla gösterilmiştir. Buna karşın, 1 saatlik bir aradan sonra tekrarlanan 10 dakikalık iskemik dönem, bellekteki uzun süreli bozulma ile birlikte hipokampal CA1 bölgesinde apoptozisi başlatabilir (1).

## **2.2. ERİTROPOİETİN**

Epo, izole edilen ilk insan hematopoietik büyüme faktörüdür (20). Epo, molekül ağırlığı 36 kD olan bir glikoproteindir (3). 166 Amino asitten oluşmaktadır (21). Erişkinlerde %90'ı böbrekte, %10'u karaciğerde üretilir.

Gelişmekte olan fetüste ise esas olarak karaciğerde yapılır. Kronik böbrek yetmezliği, böbrek Epo üretimini azaltarak böbrek hastalığı anemisine neden olur. Böbrek hastasına hemodiyaliz sırasında i.v. olarak, diyaliz yapılmayan ya da peritoneal diyaliz yapılanlara ve diğer olgulara i.v. veya subkutan (s.c.) enjekte edilir. Ağızdan alınabilen şekillerin yapılmasına çalışılmaktadır (3).

### **2.2.1. FARMAKOKİNETİĞİ**

İlk olarak, şiddetli anemisi olan hastaların idrarlarından saflaştırılmıştır. Rekombinant insan Epo'su (rHuEpo, epoetin alfa), rekombinant DNA teknolojisi kullanan bir memeli hücre salınım sisteminde üretilir. Kronik renal yetmezliği olan hastalarda i.v. uygulamadan sonra, Epo 4-13 saatlik bir serum yarı ömrüne sahiptir. Diyalizle temizlenmez. Darbepoetin alfa, Epo'nun glikozilat bir formudur ve sadece, iki veya üç kat daha uzun yarı ömüre sahip olması yönüyle fonksiyonel olarak Epo'dan farklıdır (20). Epo'nun nonlineer farmakokinetik davranışı, yıkımının doygunlukla ilgili bir mekanizma içerdiğine işaret etmektedir. Darbepoetin alfanın yarı ömrü, epoetinlere göre 3-4 kat daha uzundur (yaklaşık 25 saat) (22).

### **2.2.2. FARMAKODİNAMIĞİ**

Epo, eritroid proliferasyonunu ve farklılaşmasını, alyuvar öncülleri üzerindeki özel Epo reseptörleriyle etkileşime girerek stimüle eder. Ayrıca kemik iliğinden retikülositlerin salınımını indükler. Endojen Epo, doku hipoksisine karşı böbrekte üretilir. Anemi ortaya çıkarsa, böbrek tarafından daha fazla Epo üretilir ve bu da kemik iliğine daha fazla alyuvar üretmesi için sinyal gönderir.

Normal şartlarda, hematokrit veya hemoglobin düzeyi ile serum Epo düzeyi arasında ters bir ilişki vardır. Anemik olmayan kişilerde serum Epo düzeyleri 20 IU/L'den daha azdır. Hematokrit ve hemoglobin düzeyleri düşerse ve anemi daha şiddetli bir hal alırsa, serum Epo düzeyi üstel olarak yükselir. Orta şiddette anemili hastalar genellikle 100-500 IU/L aralığında Epo düzeyine sahiptir (20).



### **2.2.3. KLİNİK FARMAKOLOJİSİ**

Kronik böbrek yetmezliği anemisinde Epo tedavisi, eritrosit sayısını 3-4 gün içinde maksimuma çıkartır; 4-6 hafta içinde hemoglobin düzeyini ve hematokriti yükseltir. Hematokrit %30-38 olmalıdır. Böbrek yetmezliği olan hastada serum paratiroid hormon düzeyi artmış ve kemik iliği fibrozisi varsa Epo'ya direnç gelişmiştir, dozu arttırmak gerekir (3).

Epo sürekli şekilde hematokrit ve hemoglobin düzeyini geliştirir ve genellikle bu hastalarda transfüzyon ihtiyacını ortadan kaldırır. Retikülosit sayısındaki bir artış genellikle yaklaşık 10 gün içinde gözlenir ve 2-6 hafta içinde hematokrit ve hemoglobin düzeyleri yükselir. Çoğu hasta, i.v. veya s.c. olarak haftada üç defa 50-150 IU/kg Epo dozuyla yaklaşık %35'lik bir hematokrit düzeyi gösterir. Epo'ya yanıt verilememesi, genellikle aynı zamana rastlayan demir yetersizliğine bağlıdır ve bu durum ağızdan demir verilerek düzeltilebilir. Bazı hastalarda folat desteği de gerekebilir. Belirli hastalarda, Epo primer kemik iliği düzensizlikleri ve ikincil anemiye bağlı anemilerin tedavisinde de faydalı olabilir (20). Epoetin alfa, cerrahi, AIDS, kanser, kemoterapi, prematürite ve belirli kronik inflamatuvar durumlarla bağlantılı anemilerin tedavisinde de etkilidir (21).

Romatoid artrit gibi bazı kronik hastalıklarda gelişen anemilerde ve kalça replasmanı gibi elektif cerrahi girişimlerden önce uygulanması yararlıdır. Elektif cerrahi girişimden önceki 14 gün boyunca bölünmüş dozlarda toplam 300 U/kg verilmesi kan transfüzyon sayısını yaklaşık %50 azaltır. Perioperatif olarak 6 gün önceden 3 gün sonraya kadar verilmesi de bu bakımdan yararlıdır. Kanın hemoglobin konsantrasyonunu ve oksijen taşıma kapasitesini arttırdığı için sportif başarıyı artırır ve yasak olmasına rağmen doping ilacı olarak kullanılabilir (3).

### **2.2.4. YAN ETKİLER**

Epo'nun en önemli yan etkisi hipertansiyon oluşturmalarıdır. Hipertansiyon olasılığı, hematokritteki artmaya paralel olarak yükseldiğinden tedavi sırasında hematokritin %36'yı geçmemesi tavsiye edilir. Hipertansiyon,

antihipertansif ilaç tedavisine cevap verir (3). Diğer yan etkileri arasında, baş ağrısı taşikardi, ödem, solunum darlığı, bulantı, kusma, diyare, grip benzeri semptomlar (artralji ve miyalji) ve enjeksiyon bölgesinde yanma sayılabilir (21).

### **2.2.5. BEYİNDE EPO VE EPO RESEPTÖR SALINIMI**

İnsan beynindeki Epo gen salınımı temporal korteks, hipokampus ve amigdalada bulunmuştur. Maymun beyninde, Epo salınımı, temporal, frontal ve oksipital korteks, serebellum, hipotalamus, hipokampus ve nukleus kaudatusda saptanmıştır. Ayrıca, Epo yetişkinlerde ve yeni doğanlarda beyin omurilik sıvısında (BOS) saptanmıştır. Hücresel düzeyde, astrositler ve nöronlar (23) *in vitro* ve *in vivo* gösterildiği gibi beyindeki Epo'nun kaynağıdır (24).

Epo reseptörüne bağlanarak etkisini gösterir. Bu yüzden, Epo'nun biyolojik fonksiyonları ortaya çıkarabilmesi için Epo reseptörü SSS'de etki göstereceği bölgede salınmalıdır. Epo reseptör mRNA ve proteininin salınımı, fındık faresi, sıçan, maymun ve insanlarda gösterilmiştir. Özellikle, kapiler etrafındaki astrositik işlevin güçlü bir şekilde reseptör salınımı yaptığı gözükmektedir (24). Buna ek olarak, Epo reseptör immunoreaktivitesi ayrıca endotel hücreleri içinde yerleşmiştir (25). Hücre kültürü modellerinde, nöron ve astrositlerde olduğu gibi (23) beyin-kaynaklı endotel hücrelerinin dahil olduğu çeşitli endotel hücrelerinde salınımı doğrulanmıştır. Epo reseptörü insan mikrogial hücre kültürlerinde ve sıçan oligodendrositlerinde gösterilmiştir (24).

Epo reseptörü, nöronlar, endotel hücreleri, mikrogial hücreler ve astrositlerin dahil olduğu beyin hücre tiplerinde yaygın olarak salınır. Tablo-3, SSS'deki Epo ve Epo reseptör salınımının hücresel bölgelerini göstermektedir (24).

Tablo-3: Santral sinir sisteminde Epo ve Epo reseptör salınım bölgeleri

	Epo				Epo Reseptörü			
	Kemirgenler		İnsanlar		Kemirgenler		İnsanlar	
Hücre tipleri	In vitro	In vivo	In vitro	In vivo	In vitro	In vivo	In vitro	In vivo
Nöronlar	+	+	-	+	+	+	+	+
Astrositler	+	+	+	+	+	+	+	+
Mikroglial Hücreler	AE	AE	-	AE	AE	AE	-	AE
Oligodendrositler	+	AE	-	AE	+	AE	-	AE
Endotel hücreleri	-	?	AE	?	+	+	+	+

+, salınım tespit edildi; -, salınım yok; AE, analiz edilmedi; ?, ispat edilmedi

### 2.2.6. EPO GEN SALINIMININ OKSİJEN-BAĞIMLI DÜZENLENMESİ

Vücuttaki hipoksik uyum işlevlerinin birçoğu hipoksi-indüklenebilir faktörlerden (HIF) HIF-1 ve HIF-2 tarafından gerçekleşen transkripsiyonel düzenlenme temeline dayanır. Oksijenle düzenlenen Epo salınımı HIF-1 tarafından kontrol edilir.

Beyinde, HIF-1'in  $\alpha$  alt birimi hipoksi sırasında güçlü bir şekilde uyarılır, ve uzun süren HIF-1 düzeyleri yüksekliği, bu organda hipoksik maruziyet sırasında görülen sürekli Epo artışından sorumludur. Hipoksinin şiddetine bağlı olarak, böbrekteki 200 kata kadar artışla karşılaştırıldığında beyinde Epo mRNA düzeyleri 3-20 kat arasında artar. Böylece, böbreklerine göre induksiyon düzeyleri daha az olmasına rağmen beyindeki hipoksik Epo gen aktivasyonu böbreklerine çok benzer yolla ortaya çıkar.

Hücresele düzeyde, primer fare astrosit kültüründe hipoksik maruziyete yanıt olarak Epo salınımı 100 kat artar ve Epo gen salınımı ayrıca nöronlardaki hipoksi tarafından stimüle olur. Buna karşılık, Epo reseptör gen transkripsiyonu in vivo olarak sistemik hipoksi maruziyetinden direk olarak etkilenmez, fakat in vitro kültürde hipokampal nöronlarda hipoksik maruziyete karşı Epo reseptör gen mRNA'sının sayısında artış gösterilmiştir (24). Üstelik, anemik stres ve iskemik koşulların her ikisi de in vivo Epo reseptör

salınımını arttırmıştır (23) ve bu stres durumları sırasında Epo'ya nöronal hücrelerin hassasiyetinin yükselmesini kesinleştirmiştir (26).

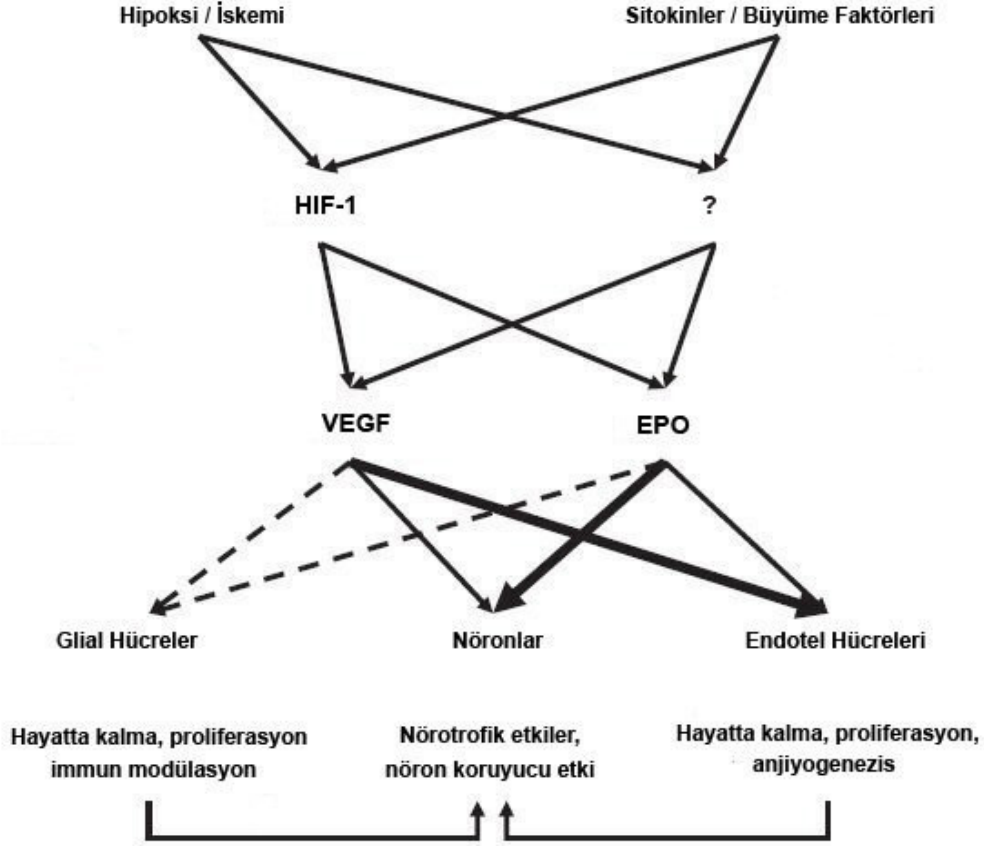
### **2.2.7. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE EPO SALINIMININ FİZYOLOJİK ROLÜ**

Embriyonik beyinde Epo ve reseptörü bol miktarda salındığı gibi Epo'nun beyin gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Beyin kaynaklı Epo fonksiyonunu değerlendiren ilk çalışmalar Epo'nun trofik aktiviteye sahip olduğunu ileri sürmektedir. Epo, primer fare septal nöron kültürlerinde kolin asetil transferaz aktivitesini artırır ve fimbria-fornix transeksiyonuna uğramış yetişkin sıçanlarda septal kolinerjik nöronların rejenerasyonunu destekler. Epo eklenmesinin, in vitro merkezi sinir sistemi prekürsör hücrelerinin hayatta kalabilmelerini ve dopaminerjik farklılaşmalarını arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar Epo'nun nörotrofik faktör olarak nöronlar üzerinde etki gösterdiğini ileri sürmektedir (24).

Epo, kalsiyum kanalları aktivasyonu ve nörotransmitter salınımı aracılığıyla nöronal fonksiyonu ve hayatta kalabilirliği stimüle edebilir. Beyin kapiler endotel hücrelerinin Epo reseptör mRNA'nın iki formunun salınımını yaptığı gerçeği beyin angiogenezine Epo'yu dahil eder. Aslında, Epo beyin kapiler endotel hücrelerinde doz-bağımlı mitojenik aktivite gösterir. Glial hücreler beyinde Epo için ilave hedeflerdir. Örneğin, in vitro olarak Epo'nun oligodendrositlerin matürasyon ve farklılaşmasını ve astrositlerin proliferasyonunu uyardığı gösterilmiştir (24).

Bugüne kadar elde edilebilen verilerden, Epo'nun birinci olarak direk nörotrofik veya nöron koruyucu faktör olarak etki göstererek ve ikinci olarak angiogenezini indükleyerek en azından iki yolla etki edebileceği sonucuna varılabilir (27). Hipoksi veya iskeminin indüklediği Epo, daha fazla alyuvar transportunu sağlayarak ve hipoksik dokuya taşınan oksijen miktarını artırarak yeni damar büyümesini stimüle edebilir. Bu yüzden, Epo, beynin hipoksi ve iskeminin zararlı etkilerine karşılık veren endojen defansif

sisteminin bir parçası olarak gözükmektedir. Beyindeki bu koruyucu sistemin bir modeli Şekil-5'de gösterilmiştir (24).



Şekil-5: Merkezi sinir sistemindeki hipoksinin uyardığı nöronal koruma mekanizmaları (24)

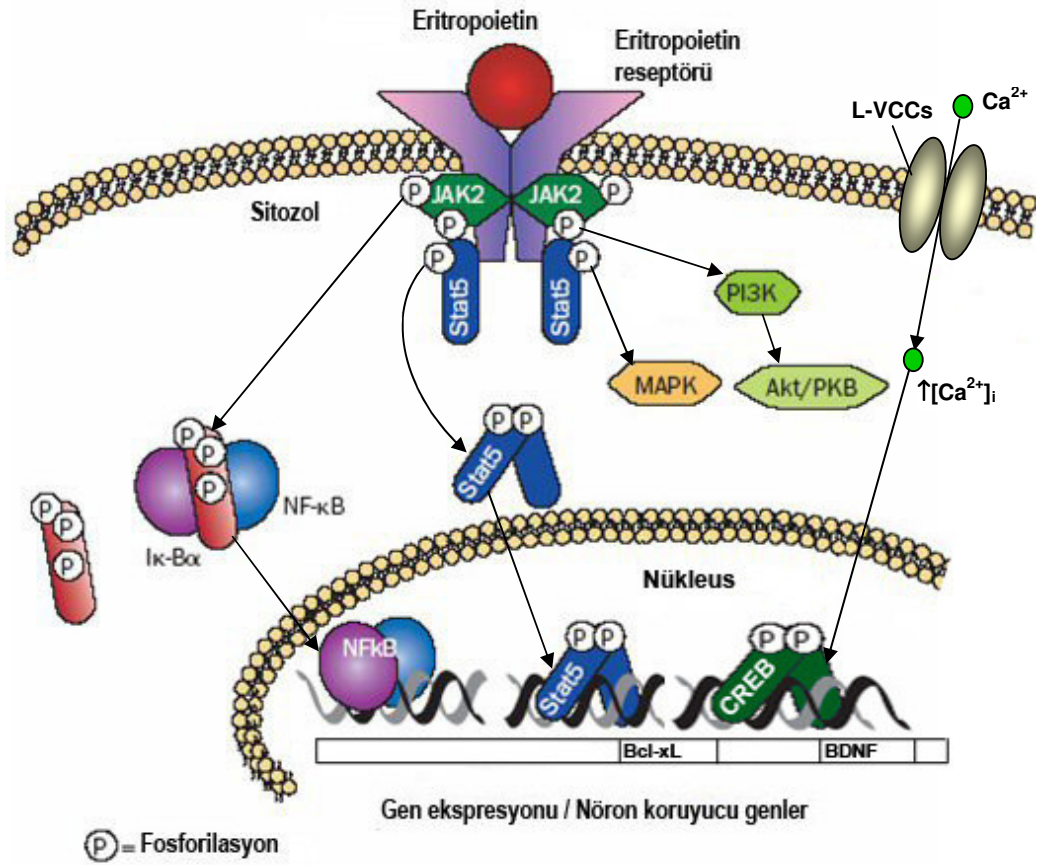
Doku hipoksisi ve serebral iskemi, Epo ve vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) de aralarında bulunduğu çeşitli oksijenle regüle edilmiş faktörlerin gen transkripsiyonunu aktive eden HIF-1'i aktive eder. HIF-1, büyüme faktörleri veya sitokinler gibi hipoksiden-bağımsız uyarılar tarafından da aktive edilebilir. Epo için ana hedef (*kalın okla gösterilen*) nöronlardır. VEGF esas olarak apoptozisi önler, endotel hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder ve yeni damar oluşumunu sağlar. Epo, endotel hücre proliferasyonuna daha az miktarda katkıda bulunur ve VEGF de direk nöron koruyucu faktördür (*ince oklarla gösterilen*). Ek olarak, hem Epo hem de

VEGF nörotrofik özelliklere sahiptir. Epo ve VEGF için reseptörlerin mikroglial hücreler ve astrositlerde salınması nedeniyle, glial hücreler her iki faktör için de hedef olabilir, ancak bu hücreler üzerindeki etkileri açık değildir (*kesik oklarla gösterilen*) (24).

### **2.2.8. MERKEZİ SİNİR SİSTEMİNDE EPO ETKİSİNİN MOLEKÜLER MEKANİZMALARI**

Epo, reseptörüne bağlandığında, reseptörün dimerizasyonuna, Janus-tirosinkinaz-2 (JAK-2)'nin otofosforilasyonuna ve reseptör aktivasyonuna neden olur. JAK-2 aktivasyonu, Ras-mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK), fosfatidilinositol-3-kinaz ve transkripsiyon faktörü sinyal transdüsörleri ve transkripsiyon 5 aktivatörleri (STAT-5) dahil olmak üzere birkaç aşağı yönde sinyal yolağının fosforilasyonuna neden olur. Bu yolağı kullanarak Epo, kortikal nöronları eksitotoksik ve NO tarafından başlatılan apoptozisten korur. MAPK ve STAT-5, *bcl-xL*'yi artırır. STAT-5 ve NF- $\kappa$ B nukleusa transloke olup DNA'ya bağlanır ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu uyarır. Akt-1 aktivasyonu, nöronal hayatta kalmaya, mitokondriyel membran potansiyelini stabilize ederek ve sitokrom c'nin salgısını önleyerek katkıda bulunabilir. Epo, primer hipokampal hücrelerde biyolojik olarak aktif beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) üretimini indükler ve özgün reseptörü TrkB'nin uzun süreli aktivasyonuna neden olur. Sinir hücrelerinde BDNF üretimi, L tipi voltaj bağımlı  $Ca^{2+}$  kanallarının aktivasyonu ve  $Ca^{2+}$  hassas transkripsiyon faktörünün alınmasıyla indüklenir. Hücre içi  $Ca^{2+}$  artışı, Epo tarafından sinir hücrelerinde tetiklenen erken olaylardan birisidir ve nöron koruyucu etkileri için kritik bir adımı temsil eder (Şekil-6) (28).

Epo *bcl-2* ve *bcl-xL* gibi anti-apoptotik genlerin salınımını sürdürdüğü eritroid prekürsör hücrelerde olduğu gibi anti-apoptotik genlerin aktivasyonu veya kaspazların süpresyonu nöronlardaki hücre ölümünü baskılayabilir. Gerçekten, apoptozis-inhibitör gen üyelerinden *XIAP* ve *c-IAP2* nin artmış gen salınımı, Epo ile pre-inkübasyonu takiben serebrokortikal hücrelerde gösterilmiştir (29).



Şekil-6: Epo reseptörüyle aktive edilen hücre içi sinyal transdüksiyon yolları (28, 30). JAK-2: Janus-tyrosine-kinase-2; PI3K: fosfatidylinositol-3-kinase; MAPK: Ras-mitogen-activated protein-kinase; STAT-5: signal transducers and activators of transcription 5; NF-κB: nuclear factor kappa B; IκB: inhibitor of transcription factor NF-κB; Akt-1: protein kinase B; CREB: Ca<sup>2+</sup>/cAMP-response element-binding protein; BDNF: brain-derived neurotrophic factor; L-VCCs: L-voltage calcium channels.

### 2.2.9. EPO'NUN NÖRON KORUYUCU ETKİLERİ

Eritroid öncül hücrelerin ana düzenleyicisi olan Epo, nöronal hayatta kalmayı önemli derecede artırır. Çok çeşitli deneysel çalışmalar hem Epo'nun hem de reseptörünün fonksiyonel olarak sinir sisteminde ortaya çıktığını ve hem in vitro olarak çeşitli nörotoksikantlara karşı hem de sinir sistemi bozuklukları oluşturulan hayvan modellerinde dikkate değer bir nöron koruyucu etki sağladığı gösterilmiştir (28).

Serebral iskemi esnasında Epo ve reseptörünün artışı, Epo/Epo reseptör sistemini iskemik hastalıkların patofizyolojisine dahil eder (23). Global iskemi modelinde gelinciklere Epo'nun intraserebroventriküler (i.c.v.) infüzyonu, iskeminin neden olduğu öğrenme bozukluğunu önler ve hipokampal CA1 nöronlarını ölümcül iskemik hasardan korur (31). Epo'nun i.c.v. enjeksiyonu, orta serebral arterin kalıcı oklüzyonu uygulanmış fındık fareleri ve sıçanlarda fokal serebral iskemi modellerinde nöronal dokunun belirgin şekilde korunmasını sağlamıştır (23, 26).

Epo'nun, iskemi sırasında nöron koruyucu etkisinin olması, kolinerjik nöronların hayatta kalabilirliğini ve dopamin salınımını etkilemesi gerçeği, Parkinson hastalığında yararlı etkileri olabileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır. Deneysel bir fare Parkinsonizm modelinde, fındık faresine i.p. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine enjeksiyonları uygulanması, selektif dopaminerjik nöronal hücre ölümüne yol açar. Fındık fareleri aynı anda, beyine direk bilateral Epo veya serum fizyolojik enjeksiyonu ile tedavi edilirler. Kontrol hayvanları ile karşılaştırıldığında Epo ile tedavi edilen fındık fareleri, lökomotor aktivitede anlamlı düzelme gösterirler. Üstelik, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine'nin neden olduğu dopaminerjik nöron kaybı Epo tarafından önlenir (32).

Pentilentetrazol ile nöbet oluşturulan sıçan beyinlerinde tipik bir kan-beyin bariyeri (KBB) bozulması gözlenirken nöbet öncesi Epo öntedavisinin kan beyin kaçağını serebellum ve kortikal alanlarda sınırlandırdığı ve Pentilentetrazol nöbetlerinde gözlenen tonik-klonik nöbetlerinin yoğunluğunu azalttığı gözlenmiştir (33).

Bir epilepsi modelinde, fındık farelerinde glutamat analogu kainik asit uygulanması ile nöbetler uyarılır. Kainat uygulanmasından önce, 24 saat boyunca Epo ile ön tedavi uygulaması, kontrollerle karşılaştırıldığında status epilepticus başlangıcını önemli bir şekilde geciktirir ve mortalite oranını azaltır. Buna karşın, kainat maruziyetinden 30 dakika önce Epo uygulanması nöbetlerden koruma sağlamaz. Aynı grup ayrıca sistemik Epo



uygulanmasından sonra deneysel otoimmün ensefalomyelitin klinik şiddetinde azalma gösterir (25). Epo'nun, proinflamatuvar sitokinlerden TNF ve interlökin-6'daki artışı geciktirerek deneysel otoimmün ensefalomyelitte SSS üzerindeki antiinflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Multiple skleroz için deneysel otoimmün ensefalomyelit uygun bir hayvan modeli olarak değerlendirildiği için, Epo, SSS'nin bu inflamatuvar patolojisinde koruyucu faktör olarak etki gösterebilir. Ayrıca, Epo ile tedavinin beyin hasarı için de etkili olduğu ortaya çıkmıştır. Sistemik Epo uygulamasına, müdahaleden 24 saat önce önşağaltım olarak veya en fazla 6 saat sonra başlandığında ve 4 gün devam edildiğinde, bir künt beyin travması modelinde inflamatuvar infiltratta belirgin azalmayla bağlantılı belirgin bir koruma ortaya koymuştur (24).

#### **2.2.10. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNDE EPO'NUN KLİNİK ETKİSİ**

İnsanlarda sadece i.v. veya s.c. ilaç uygulanması mümkün olduğu için, sistemik uygulanan Epo'nun SSS hastalıkları tedavisinde yararlı olabilmesi için KBB'yi geçmesi gerekir. Buna rağmen, çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar, endojen böbrek-kaynaklı Epo'nun yalnızca KBB'nin bozulmasından sonra beyine geçebildiğini göstermektedir.

İmmunohistokimyasal çalışmalar Epo reseptörlerinin, beyin kapillerleri etrafında özellikle astrositlerde ve kapiler endotel hücrelerinin luminal tarafında yüksek yoğunlukta bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle, dolaşımdaki Epo'nun bu reseptörlere bağlanabileceği ve transitoz ile KBB'den geçerek taşınabileceği ileri sürülmüştür. Aslında, yüksek dozda Epo sistemik olarak verildiğinde, BOS'ta görünür ancak transfer olan miktar uygulanan dozun %1'inden daha azdır (25). Bu sonuçlar, sistemik uygulanan Epo'nun SSS'ye ulaşabileceğini, zaman ve doz bağımlı biçimde BOS'ta birikebileceğini gösterir ve beyin rahatsızlıkları olan hastalara kolay i.v. Epo verilmesi olasılığını ortaya çıkarır. Bu yaklaşım daha fazla umut verici olabilir çünkü serebral iskemi gibi birçok beyin rahatsızlığı KBB'de bir açılmayla ilişkilidir ve böylece i.v. verilen ilaçlar SSS'ye daha iyi geçebilir. Buna rağmen, i.v. uygulanan Epo'nun KBB'den beyine sınırlı geçişini ve böylece

SSS'de Epo'nun koruyucu düzeyini elde etmek için gerekli yüksek doz Epo ihtiyacını ortadan kaldırmak amacıyla alternatif terapötik stratejiler göz önünde tutulmalıdır (24). Asialoeritropoietin total enzimatik desialylation ile oluşturulur ve hiçbir eritropoietik aktivite olmamasını sağlayan çok kısa bir plazma yarılanma ömrüne sahiptir. Bununla birlikte, asialoeritropoietin, KBB'yi geçebilir ve SSS'de tam nöroprotektif etki gösterir (34).

SSS hastalıkları için temel hedef nöral fonksiyonu korumaktır. Klinik olarak oldukça iyi çalışılmış ve tolere edilmiş bir bileşik olarak Epo'nun inme hastalarında kullanımı özendiricidir. Toplam 53 inme hastasında i.v. yüksek doz Epo iyi tolere edilmiştir ve bir ayda herhangi bir yükselmiş hematokrit düzeyi işareti olmaksızın klinik sonuçlardaki iyileşme ile ilişkilidir (35).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. HAYVANLAR

Çalışmada, 4-5 aylık, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen, erkek, Wistar albino 50 sıçan kullanıldı. Sıçanlar kafeslere (20X30X40 cm) yerleştirildi. Çalışma süresince hayvanlar standart oda ısısında ( $22\pm 2$  °C),  $\%50\pm 5$  nem ortamında ve 12 saat aydınlık-karanlık döngüsü bulunan bir ortamda takip edildi. Çalışma Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi'nde gerçekleştirildi. Çalışmanın davranışsal bölümü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD Davranışsal Farmakoloji Laboratuvarı'nda, biyokimyasal ölçümler Biyokimya AD Merkez Laboratuvarı'nda ve hücre sayımı Anatomi AD'da gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya başlamadan önce Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Başkanlığı'ndan 06.10.2004 tarihli ve 2004/ 57 sayılı yazı ile "Tıbbi Etik Kurul İzni" alınmış olup tüm çalışma süresince deney hayvanları çalışma etiğine uyulmuştur.

#### 3.2. ÇALIŞMA GRUPLARI

Sıçanlar 4 gruba ayrıldı; sham grubu, kontrol 4-VO grubu, Epo-1 grubu ve Epo-6 grubu:

1. Sham grubu (n=11): Sadece vertebral arterler koterize edildi, ana karotis arterler klamplenmedi.

2. Kontrol 4-VO grubu (n=10): 4-VO modelinde vertebral damarların kalıcı koterizasyonu ile birlikte ana karotis arterlerin bilateral olarak 10 dakika süre ile 60 dakika aralıklarla iki kez klamplenmesiyle iskemi reperfüzyon hasarı uygulandı. İskemi-reperfüzyondan 1 saat ve 6 saat sonra i.p. serum fizyolojik ( $\% 0.9$  NaCl) verildi.

3. Epo-1 grubu (n=10): 4-VO uygulanan sıçanlara iskemi reperfüzyondan 1 saat sonra Epo (Eprex) 20U/kg i.p. verildi (19).

4. Epo-6 grubu (n=11): 4-VO uygulanan sıçanlara iskemi reperfüzyondan 6 saat sonra Epo (Eprex) 20U/kg i.p. verildi.

### 3.3. DENEY USÜLÜ

1. Sekiz kollu labirent testi uygulaması
2. 4-VO modeli
3. Post operatif değerlendirme bölümü

#### 3.3.1. SEKİZ KOLLU LABİRENT TESTİ UYGULAMASI

##### 3.3.1.1. DÜZENEK

Test için kullanılan düzenek daha önce belirtilmiş şekilde yapılmıştır (1). Sekiz kollu labirent (Şekil-7), 24 cm çapında bir sekizgen tablanın tüm kenarlarına eklenmiş olan sekiz adet kola sahiptir. Her kolun genişliği 10 cm, uzunluğu 50 cm'dir. Tüm kollar ve merkezdeki sekizgen tablanın zemini yarı mat orta kayganlıkta siyah renkli suntalam malzemedendir yapılmıştır. Tüm kolların etrafı, 50 cm yüksekliğinde saydam-plastik ile çevrilmiştir. 1m çapında sekizgen bir tabla üzerine yerleştirilerek yerden 50 cm yükseltilmiştir. Her kola sırayla 1-8 arası numara verilmiştir. Her kolun sonuna, 3 cm çapında 1 cm yüksekliğinde siyah renkli yem kapları konulmuştur.



Şekil-7: Deneyde kullanılan 8 kollu labirent test düzeneğinin test anında üstten görünümü

Testin yapıldığı odaya, sıçanların görebileceği şekilde, test düzeneğinin kenarlarından 50 cm uzağa, görsel cisimler yerleştirilmiştir. Bu amaçla 20x30 cm boyunda 2 adet resim duvara monte edilmiş ve büyük bir tabure, bir dolap ve koyu renkli büyük bir paravan düzeneğin yakınına yerleştirilmiştir.

Aydınlatma olarak 4 adet 50 cm boyundaki floresan ışık düzeneğin 2 m yukarisından kullanılmıştır. Tüm çalışmalar boyunca bu çevre düzeni ve aydınlatma hiç değiştirilmemiştir. Deneylere başlamadan önce, her kolun uç kısmındaki yem kaplarına 50-60 mg tek parça kahverengi şeker bırakılmıştır.

### **3.3.1.2. USÜL**

#### **Kısıtlı beslenme**

Sekiz kollu labirent çalışması süresince sıçanlara kısıtlı yem usulü uygulanmıştır. Bu usüle göre önce her sıçanın günlük tükettiği yem miktarı hesaplanmıştır. Bu miktar %10-15 azaltılarak, sıçanların günlük tartı takipleri de yapılarak, test süresince sıçanların %10-15 düzeyinde ağırlık kaybetmesi sağlanmıştır. Bu uygulama etik kurallarda belirtilen %20 yem kısıtlaması sınırının altındadır. Deney boyunca su kısıtlaması yapılmamıştır.

### **3.3.1.3. SEKİZ KOLLU LABİRENT TESTİNİN BAŞARI DEĞERLENDİRMESİ**

Deneydeki kullanılan tüm sıçanlara 8 kollu labirent testi 3 bölüm olarak uygulandı:

- a) Ön alıştırma bölümü (3gün)
- b) Öğrenme bölümü (14 gün)
- c) Post operatif değerlendirme bölümü (Post operatif 7.gün)

#### **a) Ön alıştırma bölümü:**

Bu bölümün amacı temel olarak deney hayvanlarının düzeneğe ve çevreye alışmasını sağlamaktır. Bu amaçla 3 gün boyunca her gün, günde 3 defa birer saat arayla, sıçanlar 5'li gruplar halinde düzeneğe bırakıldılar, bu işlemin her birine bir tur denildi. 3 günlük ön alıştırma bölümü bitiminde 1 gün ara verilerek öğrenme bölümüne geçildi.

#### **b) Öğrenme bölümü:**

Bu bölümün amacı sıçanların testi öğrenmesidir. Bu amaçla ön alıştırmadan bir gün sonra, 14 gün boyunca her sıçana öğrenme ve ilaç verilisindeki 8 kollu labirent çalışmalarında tek tek olarak, hergün günde 3 tur

olarak birer saat arayla 8 kollu labirent testi uygulandı. Sıçanlar sekizgen tablanın merkezine konuldu, ve bir dakika sonra sekizgen ile kollar arasındaki kapı kaldırıldı. Test turu tüm kollara girildikten sonra veya 10 dakika geçtikten sonra sonlandırıldı. 14. gün sıçanların seçimi yapıldı, herhangi bir turda hiç yanlılık yapmayan veya yalnız bir yanlılık yapan sıçanlar öğrenmiş olarak deneye seçildi. Ardışık komşu kollara (45°) giren sıçanlar deneye alınmadı. Seçim günü verileri operasyon sonrası verileri ile karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı. Seçim sonrası bir gün ara verilerek deneysel beyin iskemisi modeli, daha önce yapılmış çalışmalarda (36) tanımlandığı şekilde uygulandı.

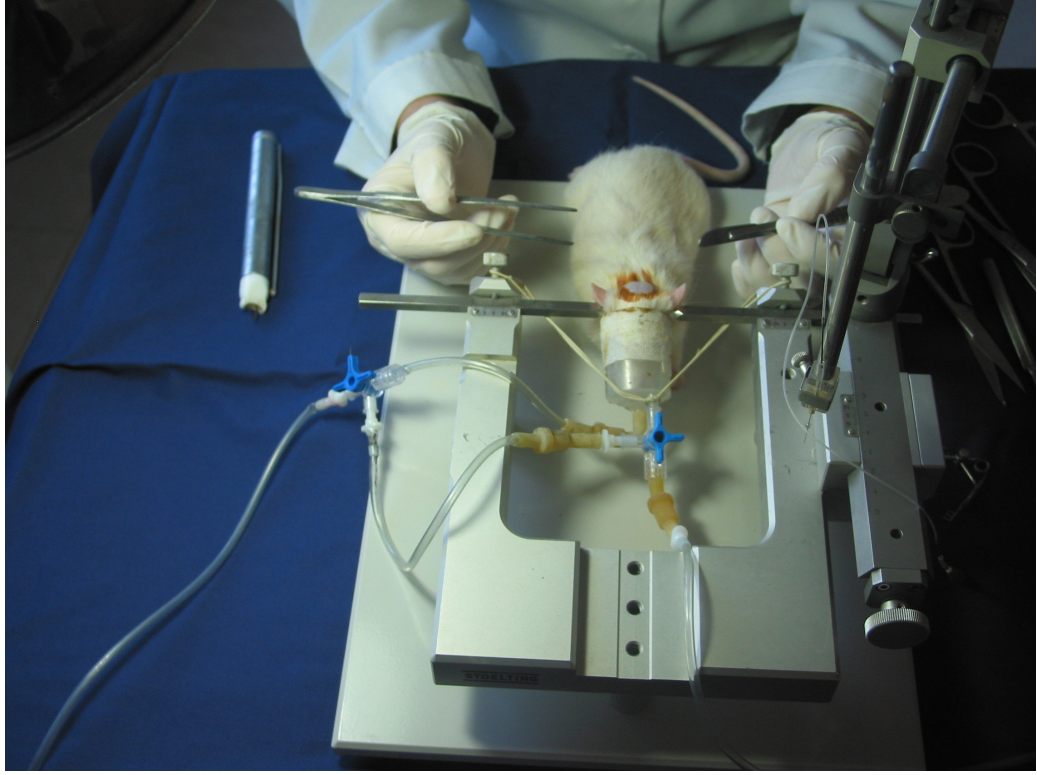
### **c) Başarı değerlendirmesi**

Bu çalışmada iki parametre 8 kollu labirent testinde başarı ölçütü olarak kullanıldı: 1) Doğru seçim (DS) sayısı (Kollara ilk giriş -daha önceden girilmemiş kola giriş -ve yemi tüketilmiş kola girmemek), ve 2) yanlış seçim (YS) sayısı (herhangi bir kola ikinci ve daha sonraki tekrar girişleri, yemi bitmiş kollara giriş veya ardışık komşu kollara girişleri). DS'ler referans belleği yansıtır (Kolların düzeni ve yemlerin dağılımı deney boyunca bellekte tutulumu). YS'ler ise çalışan belleği yansıtır (deneyin bir oturumu içindeki ardışık seçimler sırasında işi götürme dikkatinin bozulmasıdır).

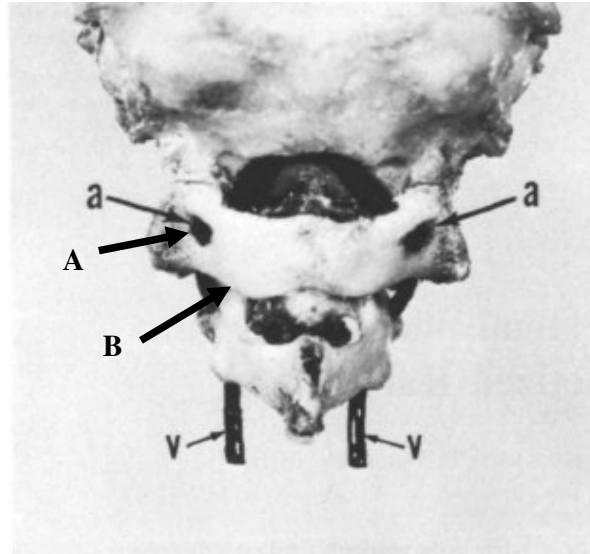
### **3.3.2. DÖRT- DAMAR OKLÜZYON (4-VO) MODELİ**

Tüm hayvanlara halotan anestezisi uygulandı. Öncelikle %4 lik Halotan (Fluothane ,Astra Zeneca İlaç San. Ve Tic. Ltd. Şti. İstanbul) inhalasyonu ile indüksiyon yapıldı. Operasyon sırasında sürdürme dozu olarak % 2 oranında Halotan kullanıldı.

Hayvanlar stereotaksiye (Stoelting, USA) yerleştirildi (Şekil-8). Kafası hiperfleksiyona getirilerek atlanto-aksiyal eklem açılması sağlandı. Arka boyun kasları orta çizgiden ayrılarak, ilk servikal vertebranın sağ ve sol alar foraminası ortaya çıkarıldı. Sıçanın vertebral arterleri vertebral kanal boyunca devam eder ve posterior fossa'ya girmeden önce alar foramen'in altından geçer (Şekil-9) (37).



Şekil-8: Sıçanın stereotaksiye yerleştirilmiş hali



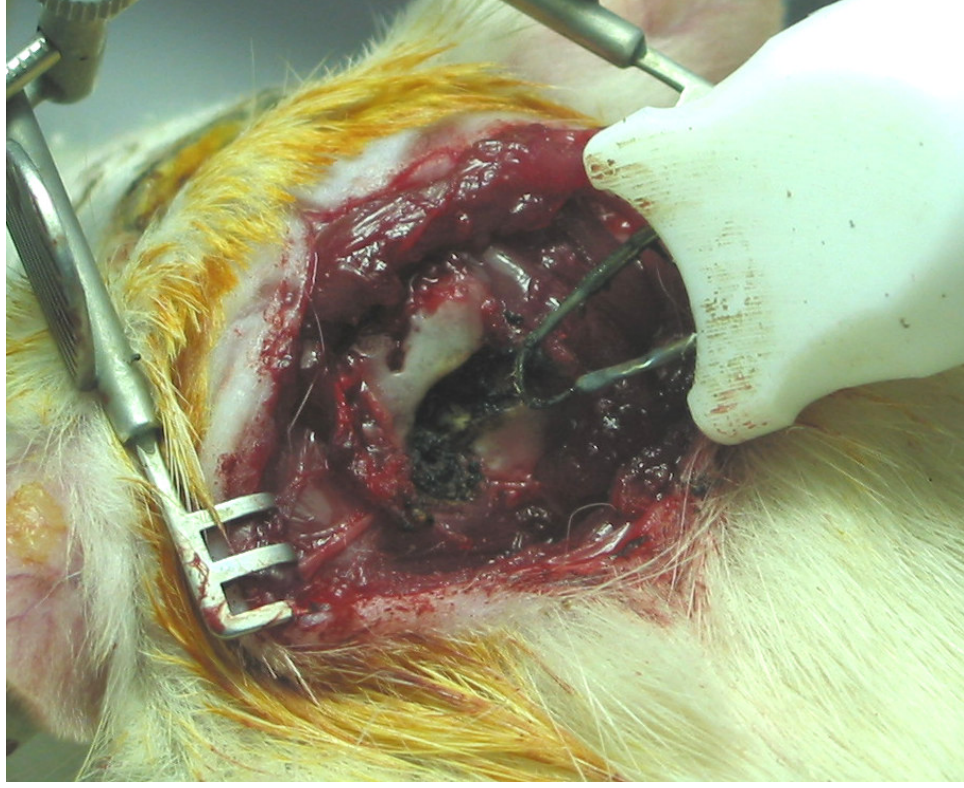
Şekil-9: Sıçan kafatasının ve birinci ve ikinci servikal vertebranın dorsal görünümü. a: birinci servikal vertebranın alar foraminası, v: alar foraminanın altından ve vertebral kanal boyunca rostral olarak geçen vertebral arterler (37). Koterize edilen noktalar: A- alar foramina, B- transvers kanal altı.

Foramina alar içi (Şekil 9, A) ve alar altı (Şekil 9, B) bipolar koagülatör (FST 18000-00, Fine Science Tools, Japan ) ile koterize edilerek vertebral arterlere kalıcı olarak oklüzyon yapıldı (Şekil-10).

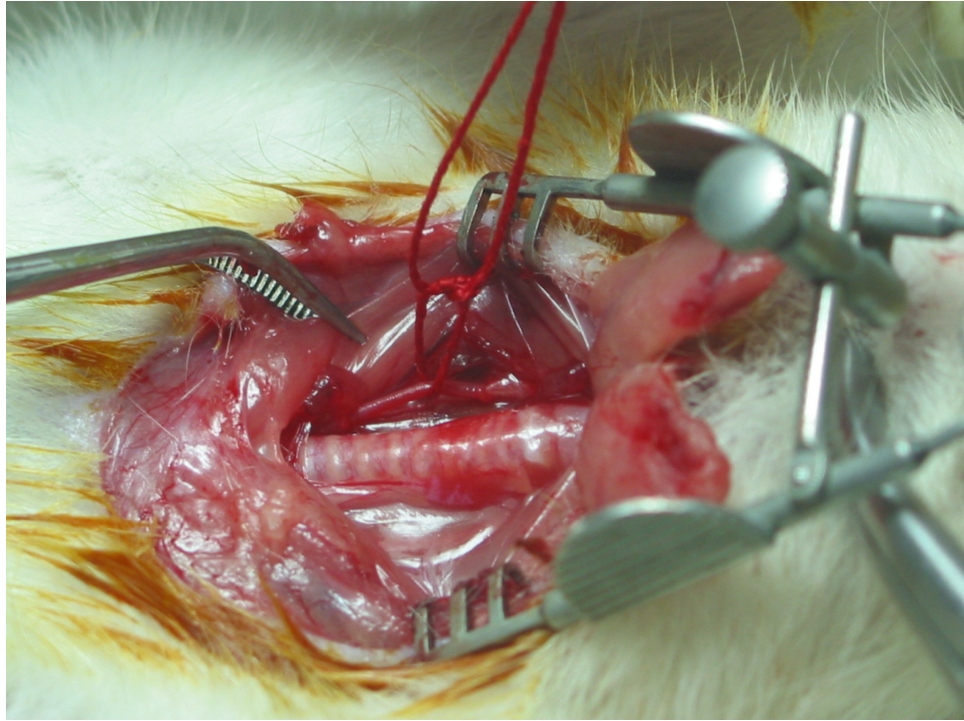
Hayvanlar sırtüstü yatırıldı. Başa ekstansiyon pozisyonu verilerek, operasyon tahtası üzerine sabitlendi. Sternumun hemen üstünden karotis boyunca yaklaşık 2 cm'lik kesi yapıldı. Penset yardımıyla submandibular tükürük bezleri etraf dokulardan ayrıldı, ön boyun kasları yanlara doğru ayrılarak trakeaya ulaşıldı. Trakeanın her iki tarafında karotis-nervus vagus damar sinir paketi görüldükten sonra penset ve damar ayırıcı yardımıyla nervus vagus, ana karotis arterden izole edildi. Damarın altından 1 mm kalınlıkta pamuk iplik geçirilip, 1 cm çaplı geniş bir düğüm atılarak damar askıya alındı (Şekil-11).

Tüm sıçanlara operasyon sonrası sıvı kaybını yerine koymak amacıyla 3 cc serum fizyolojik s.c. verildi. Sıçanlar anesteziden çıkarıldı ve ısı battanisi ve ışık kullanılarak 37°C'de uyanmaya bırakıldı. Hayvanlar kafeslerine yerleştirilerek su ve yem verildi. Yirmidört saat beklendi. Daha sonra, tekrarlanmış 4-VO iskemisi modeli uygulandı. Bu modelde kontrol 4-VO grubunda ana karotis arterlerin (anestezi kullanmaksızın) 100 g lık arter klampları kullanılarak bilateral olarak 10 dakika süre ile 60 dakika aralıklarla iki kez klamplenmesiyle iskemi reperfüzyon hasarı uygulandı. 10'ar dakikalık iskemi oluşturulduktan sonra önce kapatılan arterden başlayarak, klampları açıldı. Her damardan kan akışı izlendi. Operasyondan sonra tüm hayvanlar kafeslerine konuldu. Yalnız yan tarafa yatıp düzeltme refleksini kaybeden sıçanlar 4-VO iskemili olarak kabul edildi ve deneye alındı. Sham grubunda sıçanlar klamplama hariç aynı işlemlere tabii tutuldu.





Şekil-10: Alar foramina ve transvers kanal altından vertebral arterin koterlenişi



Şekil-11: Ana karotis arterin askıya alınmış hali

### **3.3.3. POSTOPERATİF DEĞERLENDİRME**

Deneysel beyin iskemisi operasyonu sonrası 7. gün 8 kollu labirent testi, hayvanların belleğini değerlendirmek amacıyla tüm hayvanlara tek tur olarak uygulandı.

### **3.4. DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI**

Operasyon sonrası yedinci gün tüm sıçanlara 8 kollu labirent testi uygulandıktan sonra derin eter anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki bu sıçanlara servikal dislokasyon yapıldı. Dekapitasyon sonrası beyinleri açığa çıkarıldı. Histopatolojik incelemeye alınacak beyinler %10 tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna konuldu, biyokimyasal ölçüm yapılacak beyinler bir lam üzerine konularak hemen -20 °C de donmaya bırakıldı.

### **3.5. BİYOKİMYASAL İNCELEME**

Dondurulmuş beyinlerin biyokimyasal ölçüm öncesi hipokampusları ayrıldı (Şekil-12). Beyinde Bregma noktasının 2 mm arkasından başlayarak bir bistüri ile koronal kesi yapıldı. Hipokampus görüldükten sonra hipokampusu kaplayan korteks kaldırıldı. Hipokampusun tamamı görüldükten sonra penset yardımıyla beyinden ayrıldı.

#### **3.5.1. HİPOKAMPAL MALONDİALDEHİD (MDA) DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ**

Lipid peroksidasyon ürünü olarak MDA düzeyi, asidik ortamda thiobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbansının ölçülmesi prensibine dayanan yöntem uygulanarak ölçüldü (38). Yarım ml örnek üzerine %8.1 sodyum dodesil sülfat 0.2 ml, pH'sı 3.5 olan %20 asetik asit 1.5 ml ve %0.8 thiobarbitürik asit solüsyonu 1.5 ml eklenerek 95 °C'de 60 dakika ısıtıldı. Soğutulduktan sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst tabakanın absorbansı 532 nm'de ölçüldü. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiğinde numunedeki MDA miktarı hesaplandı ve nmol/g doku olarak ifade edildi.



Şekil-12: Hipokampus görünümü

### 3.6. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

%10'luk tamponlanmış nötral formalin solüsyonuna konulan beyinler yirmidört saat fikse edildi. Rutin doku takibi sonrası parafin bloklara koyuldu. Hipokampus bölgesinden 10 µm kalınlığında kesitler alındı. Preparatlar hematoksilen-eosin ile boyandı.

#### 3.6.1. HEMATOKSİLEN-EOZİN İLE BOYAMA YÖNTEMİ

Bloklardan 10 µm'lik kesitler alınıp ılık su havuzuna bırakıldı. Lamlarla dokular toplanıp zembillere yerleştirildi. Etüvde 1 saat 60 °C'de bırakıldı. Ksilende 3 seri halinde 20'şer dakika olmak üzere toplam 1 saat tutuldu. Sırasıyla %100, %96, %70, %50'lik azalan etil alkol serilerinden 2'şer dakika tutularak geçirildi. Alkolden çıkan preparatlar:

- a) Hematoksilende üç dakika bekletildi
- b) Asit-alkole daldırılıp çıkartıldı
- c) Amonyak solusyonuna daldırılıp çıkartıldı
- d) Eozinde 3-5 saniye tutuldu.

Her bir işlem sonunda preparatlar akar suda yıkandı. Sırasıyla %50, %70, %96, %100'lük artan etil alkol serilerinde 2'şer dakika tutuldu. Havada kurutulduktan sonra 30 dakika ksilende bekletildi. Kesitler entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

### 3.6.2. HÜCRE SAYIMI

Her sıçan için hipokampusun tipik C harfi görünümünü içeren 10 µm kalınlığındaki ortalama 4-5 kesitinde, iskemiye hassas bölge olan CA1 ve CA3 bölgesinden rastgele toplam 10 mikroskop alanı, x100 büyütmede görüntülendi. Görüntü mikroskop kamerası aracılığı ile ekrana yansıtıldı. Ekran üzerine saydam kondu ve üzerine kenarları 50 µm olan kare işaretlendi. Kare içine düşen hücreler sayıldı. Karenin üst ve sağ kenarlarına rastlayan hücreler sayıma dahil edilirken, alt ve sol kenarına rastlayanlar sayım dışı bırakıldı (Şekil-13a, 13b, 13c).

### 3.7. KULLANILAN İLAÇLAR VE KİMYASAL MADDELER

Halotan: Fluothane ® şişe 50 ml volatil sıvı (Astra Zeneca İlaç San. Ve Tic. Ltd. Şti. İstanbul)

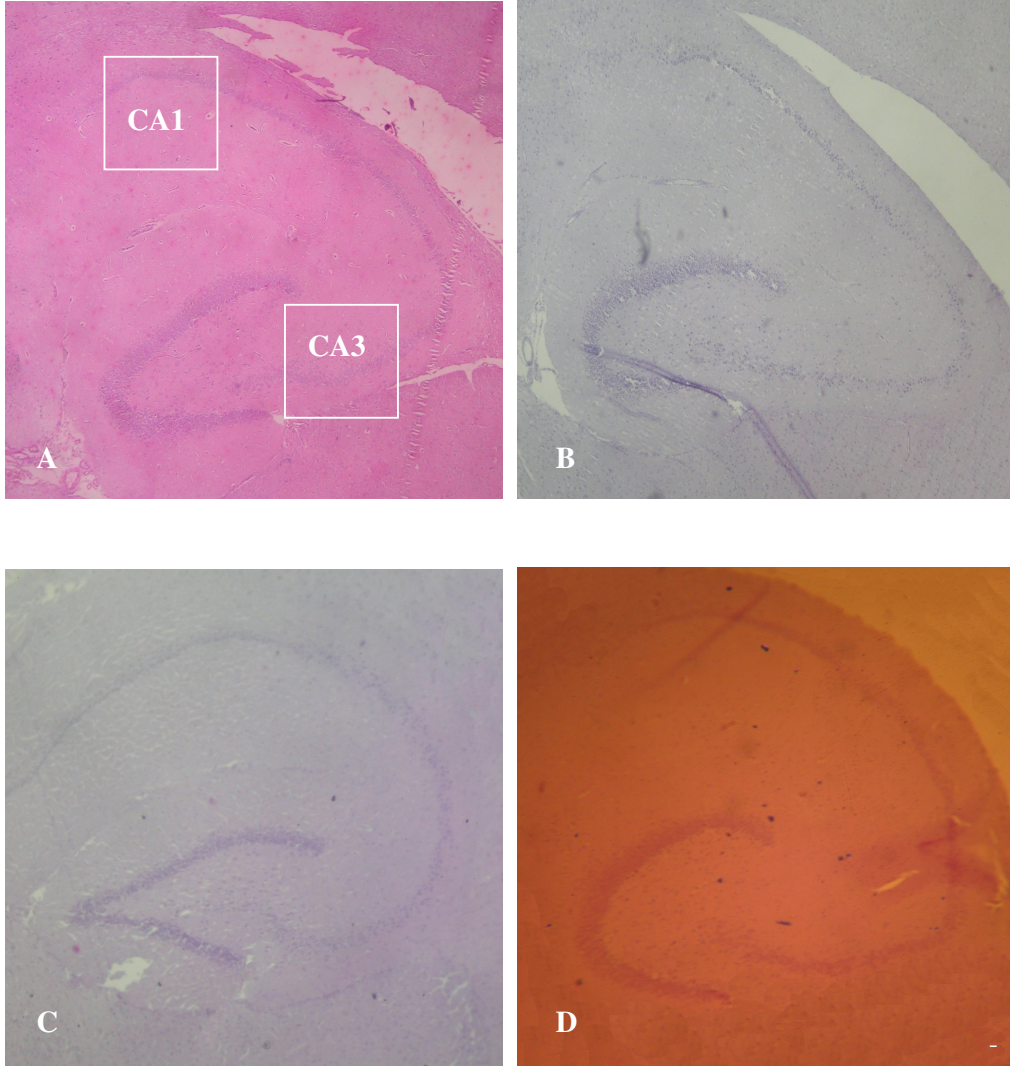
Eritropoietin: Eprex ® flakon 1 ml 4000IU/ml (Cilag)

Polivinilpirolidon İyot Kopleks (Batticon, Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler, Samsun)

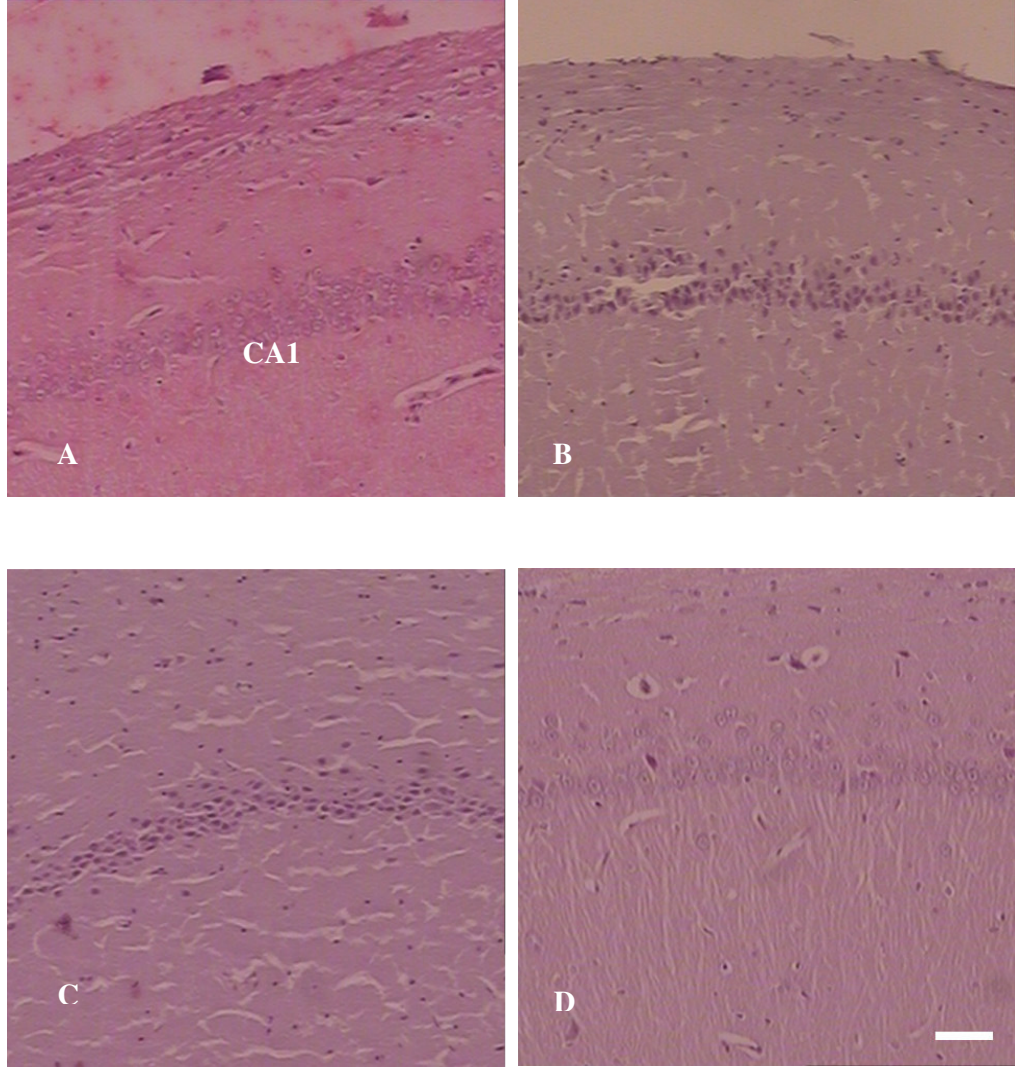
Acetic Acid 100%, puriss (glacial)	2.5 l	Riedel-de Haen
2-Thiobarbituric Acid	50 g	Fluka
Sodium dodecyl sulfat	50 g	Fluka
Potassium chloride	1 kg	Riedel-de Haen
Ammonium hydroxide solution 26% NH <sub>3</sub> , puriss	2.5 l	Riedel-de Haen
Ethanol absolut puriss	2.5 l	Riedel-de Haen
Xylenes puriss	2.5 l	Riedel-de Haen
Hematoxylin	100 g	Carlo Erba
Eosin Y	100 g	Carlo Erba
Ammonium aluminium sulphate dodecahydrate	1 kg	Fluka
Merkury(II) oxide	100 g	Merck

### **3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ**

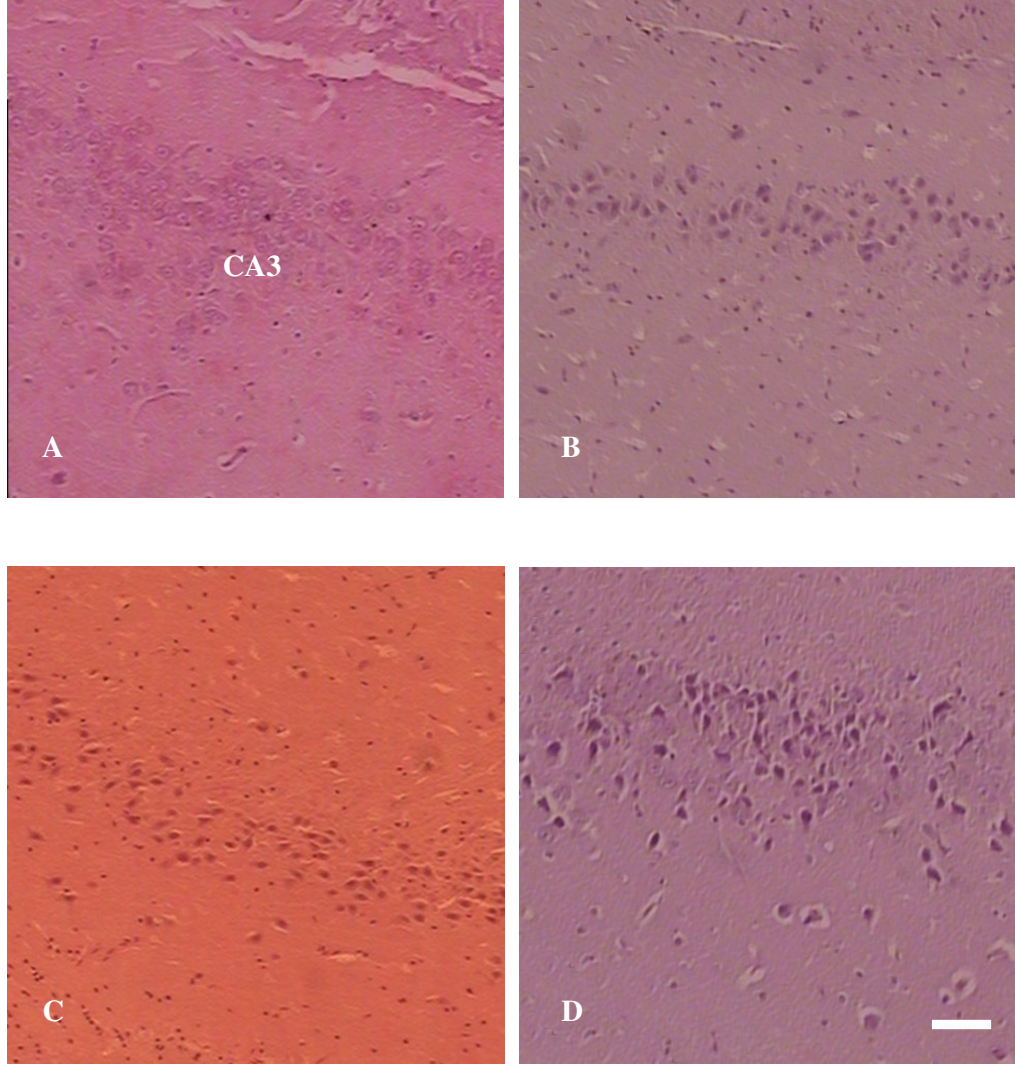
Sıçanların 8 kollu labirent testi başarısı açısından tüm gruplar arası karşılaştırmasında çift yönlü varyans analizi (Analysis of variance “two way ANOVA”) kullanıldı. Aynı grubun grup içi iskemi öncesi ve sonrası karşılaştırmaları ve CA1 ve CA3 bölgeleri hücre sayıları açısından gruplar arası karşılaştırmaları t testi kullanılarak yapıldı. İskemi öncesi ve sonrası verilerin gruplar arası ikişerli karşılaştırılması ve MDA düzeylerinin gruplar arası karşılaştırılması tek yönlü ANOVA analizi ile değerlendirildi. Post hoc analizi Tukey testi ile yapıldı.  $p < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil-13a: Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA1, CA3 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham). Büyütme: x4; Kalibrasyon çubuğu= 50 µm. Kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanmıştır.



Şekil-13b: Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA1 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham). Büyütme: x10; Kalibrasyon çubuğu= 50 µm. Kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanmıştır.



Şekil-13c: Tekrarlanmış dört-damar oklüzyon iskemisinin (B: Kontrol), Epo'nun 1 saat sonra (C) ve 6 saat sonra (D) verilmesinin hipokampusun CA3 bölgesindeki hücre sayısı üzerine etkileri (A: Sham). Büyütme: x10; Kalibrasyon çubuğu= 50 µm. Kesitler Hematoksilen-Eosin ile boyanmıştır.



## 4. BULGULAR

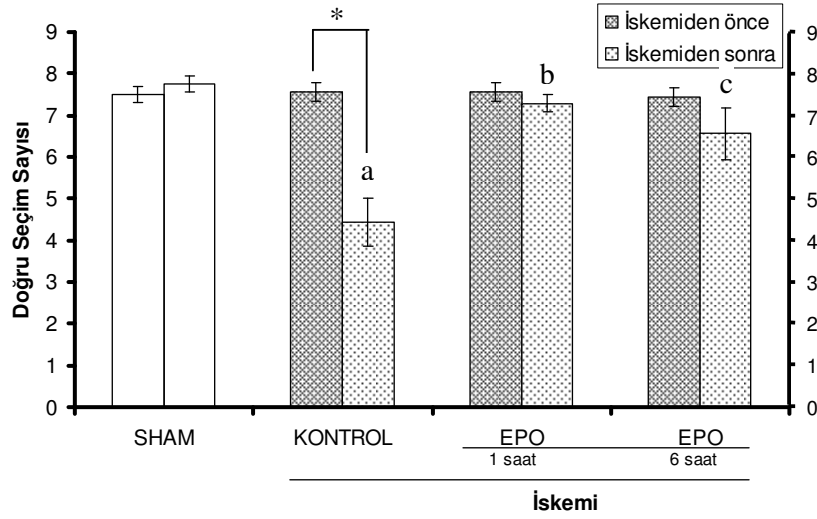
### 4.1. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN 8 KOLLU LABİRENT TESTİ BAŞARISI ÜZERİNE ETKİLERİ

#### 4.1.1. DOĞRU SEÇİM SAYILARI

İskemi öncesi sham, kontrol, Epo-1 ve Epo-6 grupların 8 kollu labirent testindeki DS sayısı sırasıyla  $7.50 \pm 0.20$ ,  $7.57 \pm 0.22$ ,  $7.57 \pm 0.22$  ve  $7.43 \pm 0.22$  olarak kaydedildi (Tablo-4). İskemi öncesi DS sayıları açısından ikişerli olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmedi (Şekil-14).

İskemiden yedi gün sonra gruplar arası DS sayısında önemli fark bulundu ( $F_{3,57}=10.68$ ;  $p<0.0001$ ). İskemi sonrası DS sayıları ikişerli olarak karşılaştırıldığında, sham grubunda  $7.75 \pm 0.17$  olan DS değerinin kontrol 4-VO grubunda  $4.43 \pm 0.57$ 'ye düşerek anlamlı derecede azaldığı bulundu ( $F_{1,14}=40.52$ ;  $p<0.0001$ ). Bu azalmayı Epo-1 anlamlı olarak ( $F_{1,13}=26.09$ ;  $p<0.0001$ )  $7.29 \pm 0.20$  düzeyine çıkardı. Ayrıca, Epo-6 da anlamlı olarak ( $F_{1,13}=7.59$ ;  $p<0.02$ ) DS'yi düzelterek  $6.57 \pm 0.62$  düzeyine çıkardı. Sham - Epo-1, sham – Epo-6 ve Epo-1 - Epo-6 gruplarının iskemi sonrası DS sayıları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

İskemi öncesi ve sonrası DS verilerin değerlendirilmesinde sham grubunda anlamlı bir fark bulunmazken kontrol 4-VO grubunda anlamlı ( $p<0.002$ ) düşüş kaydedildi (Şekil-14). İskemi sonrası Epo-1 ve Epo-6 gruplarındaki DS artışı bu iki gruptaki iskemi sonrası DS'yi iskemi öncesinden farksız kılmaktadır.



Şekil-14: Sekiz kollu labirent testinde dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu doğru seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri. İstatistiksel değerlendirme: grup içi (t-test): \* $p < 0.002$ ; gruplar arası (Tek yönlü ANOVA): a:  $p < 0.0001$  (kontrol - sham), b:  $p < 0.0001$  (Epo-1 - kontrol), c:  $p < 0.02$  (Epo-6 - kontrol).

Tablo-4: Sekiz kollu labirent testinde dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu doğru seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri

Gruplar	İskemi öncesi	İskemi sonrası
Sham	7.5 ± 0.20	7.75 ± 0.17
Kontrol 4-VO	7.57 ± 0.22	4.43 ± 0.57 <sup>a</sup>
Epo-1	7.57 ± 0.22	7.29 ± 0.20 <sup>b</sup>
Epo-6	7.43 ± 0.22	6.57 ± 0.62 <sup>c</sup>

Veriler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme (tek yönlü ANOVA): a:  $p < 0.0001$  (kontrol - sham), b:  $p < 0.0001$  (Epo-1 - kontrol), c:  $p < 0.02$  (Epo-6 - kontrol).

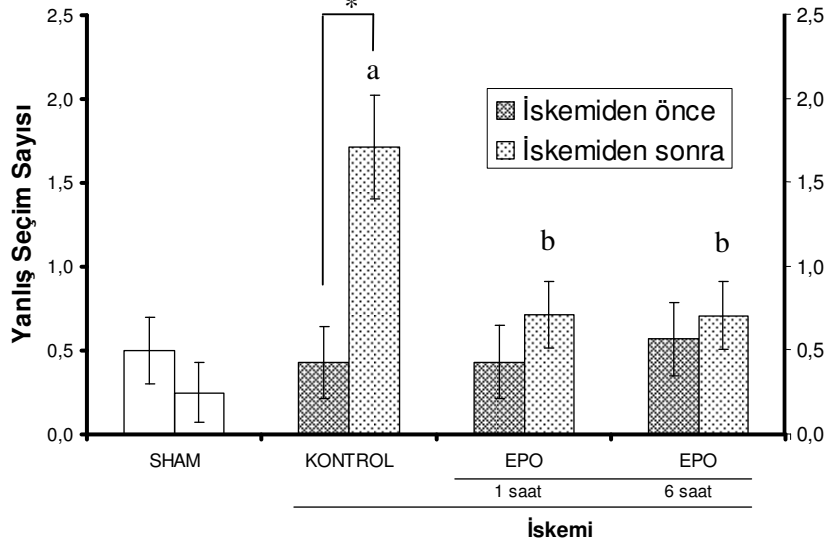
#### 4.1.2. YANLIŞ SEÇİM SAYILARI

İskemi öncesi sham, kontrol, Epo-1 ve Epo-6 grupların 8 kollu labirent testindeki YS sayıları sırasıyla  $0.50\pm 0.20$ ,  $0.43\pm 0.22$ ,  $0.43\pm 0.22$  ve  $0.57\pm 0.22$  olarak kaydedildi (Tablo-5). İskemi öncesi YS sayıları açısından, ikişerli olarak karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark görülmedi (Şekil-15).

İskemiden yedi gün sonra gruplar arası YS sayısında önemli fark bulundu ( $F_{3,57}=4.22$ ;  $p<0.01$ ). İskemi sonrası YS sayıları ikişerli olarak karşılaştırıldığında, sham grubunda  $0.25\pm 0.17$  olan YS değeri kontrol 4-VO grubunda anlamlı olarak ( $p<0.001$ )  $1.71\pm 0.31$ 'e yükseldi (Şekil-15).

Kontrol 4-VO grubundaki YS artışını Epo-1 ve Epo-6 anlamlı olarak ( $F_{1,13}=8.65$ ;  $p<0.01$ )  $0.71\pm 0.20$ 'ye indirdi (Şekil-15, Tablo-5). Sham - Epo-1, sham - Epo-6 ve Epo-1 - Epo-6 gruplarının iskemi sonrası YS sayıları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

İskemi öncesi ve iskemi sonrası YS sayıları farklılığına göre gruplar arası anlamlı fark saptandı ( $F_{3,57}=5.21$ ;  $p<0.003$ ). Sham grubunda iskemi öncesi ve sonrası arasında bir fark bulunmazken, iskemi grubundaki artış iskemi öncesine göre anlamlı olarak farklıydı ( $p<0.01$ ) (Şekil-15). Öte yandan Epo-1 ve Epo-6 gruplarında iskemi öncesi ve sonrası arasında anlamlı fark bulunmadı.



Şekil-15: Sekiz kollu labirent testinde, dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu yanlış seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri. İstatistiksel değerlendirme: grup içi (t-test): \*:p<0.01; gruplar arası (Tek yönlü ANOVA): a: p<0.001 (kontrol - sham), b: p<0.01 (Epo - kontrol).

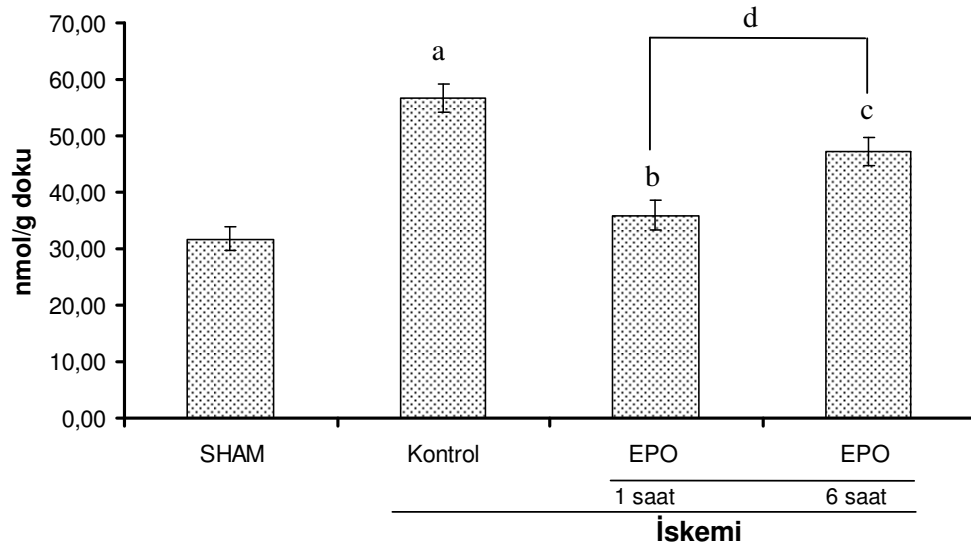
Tablo-5: Sekiz kollu labirent testinde, dört-damar oklüzyon iskemisinin neden olduğu yanlış seçim sayıları üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri

Gruplar	İskemi öncesi	İskemi sonrası
Sham	0.5±0.20	0.25±0.17
Kontrol 4-VO	0.43±0.22	1.71±0.31 <sup>a</sup>
Epo-1	0.43±0.22	0.71±0.20 <sup>b</sup>
Epo-6	0.57±0.22	0.71±0.20 <sup>b</sup>

Veriler ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme (tek yönlü ANOVA): a: p<0.001 (kontrol - sham), b: p<0.01 (Epo - kontrol)

## 4.2. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN HİPOKAMPAL MDA DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada sham grubunda MDA düzeyi  $31.77 \pm 2.05$  nmol/g doku olarak kaydedildi. Kontrol grubunda 4-VO iskemisi MDA'yı anlamlı olarak ( $F_{1,14}=70.25$ ;  $p<0.0001$ )  $56.70 \pm 2.49$  nmol/g doku düzeyine arttırdı. İskemi grubundaki MDA düzeyi artışını Epo-1 anlamlı olarak ( $F_{1,13}=39.46$ ;  $p<0.0001$ ) MDA'yı  $35.94 \pm 2.55$  nmol/g doku düzeyine azalttı. Öte yandan, Epo-6 da MDA'yı anlamlı derecede ( $F_{1,13}=8.36$ ;  $p<0.01$ )  $47.18 \pm 2.54$  nmol/g düzeyine düşürdü, fakat Epo-1'in MDA düzeyini azaltıcı etkisinin Epo-6'ya göre daha belirgin olduğu anlaşılmıştır ( $F_{1,13}=11.37$ ;  $p<0.006$ ) (Şekil-16, Tablo-6).



Şekil-16: Dört-damar oklüzyon iskemisiyle oluşan hipokampal MDA artışı üzerinde Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri. İstatistiksel değerlendirme (Tek yönlü ANOVA): a:  $p<0.0001$  (Kontrol - sham); b:  $p<0.0001$  (Epo-1 - kontrol); ve c:  $p<0.01$  (Epo-6 - kontrol); d:  $p<0.006$  (Epo-1 - Epo-6).

Tablo-6: Dört-damar oklüzyon iskemisiyle oluşan hipokampal MDA artışı üzerinde Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri

Gruplar	MDA Düzeyi
Sham	31.77±2.05
Kontrol 4-VO	56.70±2.49 <sup>a</sup>
Epo-1	35.94±2.55 <sup>b</sup>
Epo-6	47.18±2.54 <sup>c,d</sup>

Veriler ortalama ± Standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme (tek yönlü ANOVA): a:  $p<0.0001$  (Kontrol - sham), b:  $p<0.0001$  (Epo-1 - kontrol), c:  $p<0.01$  (Epo-6 - kontrol), d:  $p<0.006$  (Epo-1 - Epo-6)

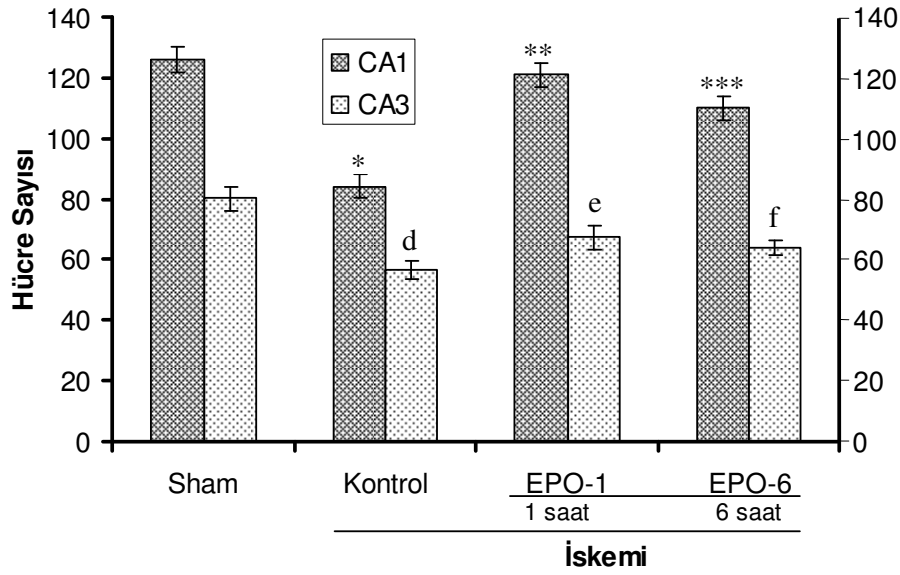
### 4.3. İSKEMİ, EPO-1 VE EPO-6'NİN HİPOKAMPUSUN CA1 ve CA3 BÖLGELERİNDEKİ HÜCRE SAYISI ÜZERİNE ETKİLERİ

#### 4.3.1. CA1 BÖLGESİNDEKİ HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI

Sham grubunda ortalama  $126.13±4.25$  hücre sayıldı. 4-VO iskemisi bu sayıyı anlamlı olarak ( $p<0.003$ )  $84.28±3.95$  hücreye düşürdü. İskemi grubunda Epo-1, hücre sayısı azalmasını anlamlı olarak engelledi ( $p<0.0001$ ) ve  $121.00±3.94$  hücre sayıldı. Aynı şekilde Epo-6 da hücre sayısı azalmasını anlamlı olarak ( $p<0.02$ ) engelledi ve  $109.94±4.05$  hücre sayıldı. Epo-1 ile Epo-6 karşılaştırmasında hücre sayımı açısından anlamlı fark tespit edilmedi ( $p<0.16$ ) (Şekil-17, Tablo-7).

#### 4.3.2. CA3 BÖLGESİNDEKİ HÜCRE SAYIMI SONUÇLARI

Sham grubunda ortalama  $80.27±3.96$  hücre sayıldı. 4-VO iskemisi bu sayıyı anlamlı olarak ( $p<0.02$ )  $56.67±2.94$  hücreye düşürdü. İskemi grubunda Epo-1, hücre sayısı azalmasını anlamlı olarak engelledi ( $p<0.03$ ) ve  $67.37±4.12$  hücre sayıldı. Aynı şekilde Epo-6 da hücre sayısı azalmasını anlamlı olarak engelledi ( $p<0.0008$ ) ve  $64.00±2.45$  hücre sayıldı. Epo-1 ile Epo-6 karşılaştırmasında hücre sayımı açısından anlamlı fark tespit edilmedi ( $p<0.26$ ) (Şekil-17, Tablo-7).



Şekil-17: Dört-damar oklüzyon iskemisi sonrasında hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerindeki hücre sayısı üzerine Epo'nun 1 saat (Epo-1) ve 6 saat (Epo-6) sonra verilmesinin etkileri. İstatistiksel değerlendirme (t-test): CA1 için \*:  $p < 0.003$  (kontrol - sham); \*\*:  $p < 0.0001$  (Epo-1 - kontrol); \*\*\*:  $p < 0.02$  (Epo-6 - kontrol); CA3 için d:  $p < 0.02$  (kontrol - sham); e:  $p < 0.03$  (Epo-1 - kontrol); f:  $p < 0.0008$  (Epo-6 - kontrol).

Tablo-7: Dört-damar oklüzyon iskemisi uygulanan sıçanlarda hipokampusun CA1 ve CA3 bölgelerindeki hücre sayılarının ortalaması

Gruplar	CA1	CA3
Sham	126.13±4.25	80.27±3.96
Kontrol 4-VO	84.28±3.95*	56.67±2.94 <sup>d</sup>
Epo-1	121.00±3.94**	67.37±4.12 <sup>e</sup>
Epo-6	109.94±4.05***	64.00±2.45 <sup>f</sup>

Veriler ortalama  $\pm$  Standart hata olarak verilmiştir. İstatistiksel değerlendirme (t testi): CA1 için \*:  $p < 0.003$  (kontrol - sham), \*\*:  $p < 0.0001$  (Epo-1 - kontrol), \*\*\*:  $p < 0.02$  (Epo-6 - kontrol); CA3 için: d:  $p < 0.02$  (kontrol - sham), e:  $p < 0.03$  (Epo-1 - kontrol), f:  $p < 0.0008$  (Epo-6 - kontrol).

## 5. TARTIŞMA

Bizim çalışmamızda, tekrarlanmış serebral iskemi, sıçanlarda DS'leri azaltıp, YS'leri artırarak 8 kollu labirent testi başarısını olumsuz etkilemiştir ve bellek fonksiyonunu bozmuştur.

Tekrarlanmış serebral iskeminin reperfüzyondan 7 gün sonra uzamsal bellekte göze çarpan bir bozulmaya neden olduğu gösterilmiştir (1). Tekrarlanmış iskemide sıçanlar DS sayısında belirgin bir düşüş ve YS sayısında da bir artış göstermişlerdir, ayrıca tekrarlanmış iskemiden 7 gün sonra 8 kollu labirent testi uygulandığında, iskeminin motor sorunlara neden olmadan uzamsal belleği bozduğu gösterilmiştir. Apoptozis, iskemiden 3 gün sonra ortaya çıkmıştır ve bellek bozukluğuyla birlikte gözlemlendiği en yüksek düzeyine iskemiden 7 gün sonra ulaşır (39, 40). Bu değişikliklerden, monoamin (41),  $\alpha$ -Amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionik asit reseptörler (1, 42) ve iskemi reperfüzyonun indüklediği reaktif oksijen radikali iskemi sonrası nöronal hasar (42) sorumlu olabilir.

Çalışmamızda kullanılan 4-VO modeliyle oluşturduğumuz global beyin iskemisi, hipokampusun CA1 ve CA3 bölgesinde selektif nöron kaybı oluşturmuştur. Bu durum diğer çalışmalarda (14, 31) elde edilen sonuçlarla benzerlik taşımaktadır.

Yaptığımız çalışmada 4-VO'nun hipokampal MDA'yı arttırdığı görülmüştür. I-deprenyl tedavisi uygulanmayan geçici global iskemiyeye maruz bırakılan iskemik farelerle karşılaştırıldığında, sırasıyla 5 ve 10 mg/kg dozlarında I-deprenyl tedavisi uygulanan farelerde tedaviden sonra hipokampal MDA düzeylerinde, %34 ile 38 arasında bir azalma olduğu gösterilmiştir. Bu ilaç ayrıca beyni hiperperoksidasyona ve iskemiden sonra gözlenen serbest radikal oluşumuna karşı korur. Bu etkiler kısmen antioksidana ve sonuç olarak I-deprenyl'in ortaya koyduğu serbest radikal üretiminin inhibisyonuna bağlıdır (41). Serbest oksijen radikalleri, NO ve inflamatuvar reaksiyonlar ve eksitatör amino asitler tarafından modüle edildiği



düşünülen iskemi reperfüzyon hasarından sonra fetal sıçan beyinde thiobarbitürik asit-reaktif maddelerin, kontrol grubundakilerde istatistiksel olarak önemli olan yüksek düzeylere çıktığı gözlenmiştir (43).

Bu bulgulardan, 4-VO'nun bellek fonksiyonunu bozucu etkisinin, hem hipokampusun CA1 bölgesindeki nöron ölümüyle, hem de iskemi/reperfüzyon sonrası hipokampal MDA düzeyi artışı ile bağlantılı olduğu sonucu çıkarılabilir.

Çalışmamızda Epo'nun, DS'leri artırıp YS'leri azaltarak iskeminin yol açtığı bellek fonksiyonunun bozukluğunu düzelttiği gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada beyin kapillerlerindeki Epo reseptörünün bol miktarda salınımı gözlenmiştir ve bunun, dolaşımdaki Epo'nun beyne girişi için bir yol sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezi doğrular şekilde, rHuEpo sarsıntılı beyin hasarını, deneysel otoimmün ensefalomiyelitteki immun hasarı ve kainat toksisitesini iyileştirmiştir (25). Epo farklı araştırıcı grupların kullanmış olduğu modellerde bellek iyileştirici etkinlik göstermiştir. Epo'nun i.c.v. olarak infüzyonunun, bilateral karotis oklüzyonunun neden olduğu öğrenme yetersizliğini (31) ve pasif kaçınma testinde algı zayıflığını önlediği belirlenmiştir (44).

Epo iskeminin yanı sıra spinal kord zedelenmesi gibi (45) çeşitli modellerde de koruyucu etkinlik göstermiştir. Çalışmamızda, Epo, iskemiyle hipokampal hücre sayısındaki azalmayı azalttı. Bu sonuç gelinciklerde i.c.v. Epo infüzyonu ile sağlanan CA1 nöroprotektif etki ile benzerlik taşımaktadır (31, 44, 46). Epo'nun bu koruyucu etkisi, hipokampal nöronları hipoksi kaynaklı nöronal ölümden olduğu gibi, hücre içi sinyal düzenleyici kinaz ve Akt-1 protein kinaz B'nin aktivasyonu yoluyla olabilir (46, 47). Öte yandan, Epo glutamat nörotoksitesine aracılık eden, NO aşırı üretiminin düşürülmesi ve serbest radikal oluşumunun önlenmesi (48) veya direkt serbest radikal süpürücü etkisi (43, 45) gibi birçok mekanizma ile nöroprotektif etkisini göstermiş olabilir.

Zamansal olarak, Epo'nun, iskemi öncesi veya iskemi sonrası verilmesiyle nöron koruyucu etkisinin olduğu belirlenmiştir. Epo, iskemiden bir saat önce ve hemen sonra (19), veya 20 saat önce ve 20 dakika sonra (46) koruyucu etki ve bellek iyileştirici etkinlik göstermiştir. Epo'nun nöron koruyucu etkilerinin mekanizmalarının NO senteziyle bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (19). Öte yandan, bir diğer çalışmada iskemiden önce rHuEpo'nun sadece i.c.v. yoluyla uygulanması, MDA artışını, belirgin ölçüde ve doz bağımlı olarak azalttığı kaydedilmiştir. rHuEpo'nun i.p. veya i.c.v. uygulamasından sonra postiskemik MDA düzeylerini ve beyin ödemi azaltırken yaşam süresini arttırdığı bulunmuştur (19). Çalışmamızda Epo-1 ve Epo-6, bellek iyileştirici etkisi ile birlikte, hipokampal MDA düzeyini düşürmüştür, fakat Epo-1'in MDA düzeyini azaltıcı etkisinin Epo-6'ninkinden daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak ilk kez bizim çalışmamızla, özellikle 4-VO ile oluşturulan iskemide, hipokampusta hücre azalması üzerine olan Epo'nun koruyucu etkileri, bellek başarısı açısından gösterilmiştir. Epo'nun bu etkisinde MDA düzeyini azaltıcı etkisinin bulunduğu düşünülmektedir. Klinik kullanıma yönelik Epo'un başka modellerde ve diğer biyokimyasal parametreler üzerinde etkilerinin araştırılmasında daha fazla deneysel ve klinik çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇLAR

Epo'nun, 4-VO modeliyle tekrarlanmış serebral iskemiyeye maruz kalan sıçanlarda, bellek fonksiyonunun bozukluğu, artmış hipokampal MDA düzeyi, hipokampusta hücre azalması üzerine olan etkilerinin incelendiği bu çalışmada şu sonuçlar elde edildi:

1. 4-VO'nun, iskemi sonrası DS sayılarını, sham grubuna göre, kontrol 4-VO grubunda anlamlı derecede azalttığı bulundu. Bu azalmayı Epo-1 anlamlı olarak yükseltti. Ayrıca, Epo-6 da anlamlı olarak DS'yi düzeltmiştir. Epo-1 grubu ile Epo-6 gruplarının iskemi sonrası DS sayıları arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Sham grubundaki YS değeri, kontrol 4-VO grubunda yükselmiştir. Kontrol 4-VO grubundaki YS artışını Epo-1 ve Epo-6 anlamlı olarak azaltmıştır.

2. 4-VO, sham grubundaki MDA düzeyini anlamlı olarak yükseltmiştir. Kontrol 4-VO grubundaki MDA düzeyi artışını Epo-1 anlamlı olarak azaltmıştır. Öte yandan, Epo-6 da MDA'yı anlamlı derecede düşürmüştür, fakat Epo-1'in MDA düzeyini azaltıcı etkisinin Epo-6'ya göre daha belirgin olduğu anlaşılmıştır.

3. Hipokampusun CA1 bölgesinde sham grubundaki ortalama hücre sayısını 4-VO iskemisi anlamlı olarak düşürmüştür. İskemi grubundaki hücre sayısı azalmasını Epo-1 anlamlı olarak engellemiştir. Aynı şekilde Epo-6 da hücre sayısındaki azalmayı anlamlı olarak engellemiştir. Epo-1 ile Epo-6 karşılaştırmasında hücre sayımı açısından anlamlı fark tespit edilmedi. Hipokampusun CA3 bölgesinde sham grubundaki ortalama hücre sayısını 4-VO iskemisi anlamlı olarak düşürmüştür. İskemi grubunda Epo-1, hücre sayısındaki azalmayı anlamlı olarak engellemiştir. Aynı şekilde Epo-6 da hücre sayısındaki azalmayı anlamlı olarak engellemiştir. Epo-1 ile Epo-6 karşılaştırmasında hücre sayısı açısından anlamlı fark tespit edilmedi.

Sonuç olarak deneysel tekrarlayan geçici beyin iskemisi modelinde, Epo iskemiyeye bağlı hipokampal nöron kaybını ve bellek fonksiyonları bozukluğunu azaltmaktadır. Epo, bellek bozukluğu ve benzeri nörolojik bozuklukların neden olduğu hücre kaybı ve diğer patolojik değişiklere karşı nöron koruyucu bir etki sağlayabilir.

## 7. ÖZET

### DÖRT- DAMAR OKLÜZYON İSKEMİ MODELİNİN UYGULANDIĞI SIÇANLARDA ERİTROPOİETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİNİN DAVRANIŞSAL VE BİYOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ

DR. EMEL DİKBAŞ

Eritropoietin (Epo), peptid yapıda diyaliz hastalarında anemi tedavisinde kullanılmakta olan bir ilaçtır ve günümüzde yeni çalışmalar nöroprotektif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada, 4-damar oklüzyon (4-VO) iskemisi, vertebral damarların kalıcı koterizasyonu ile birlikte ana karotis arterlerin bilateral olarak 10 dakika süre ile 60 dakika aralıklarla iki kez klempenmesiyle iskemi oluşturulmuştur. Çalışma 4 grup içermektedir: 1. sham, 2. serum fizyolojik uygulanan 4-VO, 3. 4-VO'dan 1 saat sonra Epo (20U/kg i.p.) uygulanan, Epo-1 ve 4. 4-VO'dan 6 saat sonra Epo (20U/kg i.p.) uygulanan, Epo-6. Çalışma sonunda sıçanlar dekapite edilmiştir. Hipokampusdeki, malondialdehid (MDA) düzeyi tiobarbitürik asit yöntemiyle ölçülmüş ve nöronal hücreler sayılmıştır.

Sonuçlar, 4-VO'nun doğru seçimleri (DS) azaltıp ( $p<0.0001$ ), yanlış seçimleri (YS) arttırdığını ( $p<0.001$ ) göstermiştir. Buna karşılık, Epo-1 ve Epo-6 DS'yi artırırken (sırasıyla  $p<0.0001$  ve  $p<0.02$ ) YS'yi  $p<0.01$  düzeyine düşürmüştür. Epo-1 ve Epo-6'nın DS ve YS üzerine olan etkileri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Hipokampus dokusunda ortalama MDA seviyeleri, sham grubunda  $31.77\pm 2.05$  nmol/g doku düzeyinde olmuştur. 4-VO, MDA'yı  $56.70\pm 2.49$  nmol/g değerlerine artırmıştır ( $p<0.0001$ ). Epo-1 ve Epo-6 ise MDA'yı sırasıyla  $35.94\pm 2.55$  nmol/g ( $p<0.0001$ ) ve  $47.18\pm 2.54$  nmol/g'a ( $p<0.01$ ) azaltmıştır. Ayrıca Epo-1'in MDA düzeyini azaltıcı etkisinin Epo-6'ya göre daha belirgin olduğu anlaşılmıştır ( $p<0.006$ ).

Sham sıçanlarda, CA1'de  $126.13\pm 4.25$  nöron sayıldı. 4-VO, bu sayıyı  $84.28\pm 3.95$ 'e düşürdü ( $p<0.003$ ). Epo-1 ( $p<0.0001$ ) ve Epo-6 ( $p<0.02$ ) bu sayıyı 4-VO grubunda sırasıyla  $121.00\pm 3.94$  ve  $109.94\pm 4.05$  değerlerine yükseltti. Öte yandan, sham sıçanlarda CA3'te  $80.27\pm 3.96$  nöron sayıldı. 4-VO, nöron sayısını  $56.67\pm 2.94$ 'e düşürdü ( $p<0.02$ ). Epo-1 ( $p<0.03$ ) ve

Epo-6 ( $p < 0.0008$ ) bu sayıyı sırasıyla  $67.37 \pm 4.12$  ve  $64.00 \pm 2.45$ 'e yükseltti. Hücre sayısı üzerine etkileri açısından Epo-1 ile Epo-6 arasında belirgin bir fark gözlenmedi.

Sonuç olarak tekrarlanmış 4-VO MDA'yı yükseltmiş, CA1 ve CA3'teki nöron sayısını azaltmış ve belleği bozmuştur. Epo-1 ve Epo-6, yükselen MDA'yı azaltmış, hipokampusdeki nöronları arttırmış ve belleği düzeltmiştir. Bununla birlikte, Epo-1'in MDA üzerindeki etkisi, Epo-6 ile karşılaştırıldığında daha yüksek olmuştur.

## 8. SUMMARY

### INVESTIGATION OF BEHAVIOURAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF ERYTHROPOIETIN IN RATS WITH FOUR-VESSEL OCCLUSION ISCHEMIA

DR. EMEL DİKBAŞ

Erythropoietin (Epo) is a peptide derivative being used in treatment of anemia in dialysis patients. Plethora of new studies revealed the neuroprotective activity of Epo. In this study, 4-vessel occlusion (4-VO) ischemia was induced by cauterization of the vertebral arteries and bilaterally occluding the carotid arteries for 10 min repeated after 60 min. The study included four groups: 1. sham, 2. 4-VO received saline, control, 3. 4-VO received Epo (20 U/kg i.p.) after one h, Epo-1, and 4. 4-VO received Epo (20 U/kg i.p.) after 6 h, Epo-6. The rats were decapitated at the end of the experiments. The level of malondialdehyde (MDA) was measured by thiobarbituric acid method. The neuronal cell numbers were counted in hippocampus.

The results showed that 4-VO decreased correct choices, CC ( $p < 0.0001$ ), whereas increased error choices, EC ( $p < 0.001$ ). Epo-1 and Epo-6 increased CC ( $p < 0.0001$  and  $p < 0.02$  respectively), whereas decreased EC at  $p < 0.01$  level. No significant difference was detected between Epo-1 and Epo-6 for their effects on CC and EC. The level of MDA detected in hippocampus of sham rats was  $31.77 \pm 2.05$  nmol/g tissue. 4-VO increased MDA to  $56.70 \pm 2.49$  nmol/g ( $p < 0.0001$ ). Epo-1 and Epo-6 decreased MDA to  $35.94 \pm 2.55$  nmol/g ( $p < 0.0001$ ) and  $47.18 \pm 2.54$  nmol/g ( $p < 0.01$ ) respectively. The effect of Epo-1 on MDA was greater than Epo-6 ( $p < 0.006$ ).

In CA1,  $126.13 \pm 4.25$  neurons were counted in sham rats. 4-VO decreased ( $p < 0.003$ ) the cell number to  $84.28 \pm 3.95$ . Epo-1 and Epo-6 increased the number to  $121.00 \pm 3.94$  ( $p < 0.0001$ ) and  $109.94 \pm 4.05$  ( $p < 0.02$ ) respectively in 4-VO group. On the other hand,  $80.27 \pm 3.96$  neurons were counted in CA3 of sham rats. The neurons were decreased to  $56.67 \pm 2.94$

( $p < 0.02$ ) in 4-VO rats. Epo-1 and Epo-6 increased the number to  $67.37 \pm 4.12$  ( $p < 0.03$ ) and  $64.00 \pm 2.45$  ( $p < 0.0008$ ) respectively. No significant difference was detected between Epo-1 and Epo-6 with regard to their effects on cell number.

In conclusion, repeated 4-VO increased MDA, decreased neuronal number in CA1 and CA3 and impaired memory. Epo-1 and Epo-6 lowered the increased MDA, increased the neurons in hippocampus and improved memory. However, the effect of Epo-1 on MDA was greater than Epo-6.



## 9. KAYNAKLAR

- 1) Iwasaki K, Mishima K, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I, Ishibashi D, Irie K, Kobayashi H, Egawa T, Fujiwara M. Effect of nilvadipine on the cerebral ischemia-induced impairment of spatial memory and hippocampal apoptosis in rats. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 188-196.
- 2) Block F. Global ischemia and behavioural deficits. *Prog Neurobiol* 1999; 58: 279-295.
- 3) Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Hacettepe TAŞ, 2000.
- 4) Genc S, Akhisaroglu M, Genc K. Eritropoietinin PC12 hücre hattında amiloid-beta peptid ile oluşturulan nörotoksisiteye karşı koruyucu etkisi. *Türk J Geriat* 2002; 5: 1-6.
- 5) Gabrieli JDE, Brewer JB, Vaidya CJ. Memory. In: Christopher G, Goetz MD. *Textbook of clinical neurology*. San Diego: WB Saunders, 1999: 75-91.
- 6) Ramachandran VS. *Encyclopedia of the human brain*. San Diego: Academic Press, 2002.
- 7) Squire LR, Zola SM. Amnesia, memory and brain systems. *Phil Trans R Soc Lond* 1997; 352: 1663-1673.
- 8) Ganong WF. Çev. Ed. Doğan A. *Tıbbi Fizyoloji* 17. Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi, 1996.
- 9) Guyton AC, Hall JE. *Textbook of medical physiology*, 11th edition. Missisipi: Saunders/Elsevier, 2005.
- 10) Waxman G. Çev. Ed. Yıldırım M. *Korrelatif Nöroanatomi* 24. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
- 11) Radecki D. The putative neuroprotective role of brain-derived neurotrophic factor on stress-induced hippocampal dysfunction. Doctoral dissertation. Kent State University, 2001.
- 12) Clark DL, Boutros NN. *The brain and behavior*. Massachusetts: Blackwell Science, 1999.

13) Shen J. The aging hippocampus: Neural mechanisms underlying learning and memory deficits in old rats. Doctoral dissertation. The University of Arizona, 1996.

14) Puurunen K. The effects of pharmacotherapy and training on functional recovery after global and focal cerebral ischemia in rats. Doctoral dissertation. University of Kuopio, 2001.

15) Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 1999; 79: 1432-1568.

16) Matzke SM. Effects of global cerebral ischemia on long-term object memory in the rat. Doctoral dissertation. George Washington University, 1999.

17) Deshaies EM. Neuroprotection in a model of acute global ischemia/reperfusion of the rodent brain. *Perdrizet* 2000; 4: 1-14.

18) Cotran RS, Kumar V, Robbins S, Çev. edit. Çevikbaş U. Robbins Temel Patoloji 6. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2000.

19) Calapai G, Marciano MC, Corica F, Allegra A, Parisi A, Frisina N, Caputi AP, Buemi M. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Europ J Pharmacol* 2000; 401: 349–356.

20) Katzung BG. Basic & clinical pharmacology 9th ed. New York: Lange, 2003: 752-754.

21) Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics. New York: McGraw-Hill, 2005.

22) Jelkmann W. Recombinant erythropoietins – the role of glycosilation in receptor binding, action and degradation. *Business Briefing: European Kidney & Urological Disease* 2006. [http://www.touchgenitourinarydisease.com/articles.cfm?article\\_id=1274&level=2](http://www.touchgenitourinarydisease.com/articles.cfm?article_id=1274&level=2) adresinden 10 Nisan 2006 tarihinde ulaşılmıştır.

23) Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 643-651.

24) Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3233-3242.

25) Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2000; 97:10526-10531.

26) Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 26-32.

27) Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer C. Neuroprotection and angiogenesis: a dual role of erythropoietin in brain ischemia. *News Physiol. Sci* 2000; 15: 225-229.

28) Bartesaghi S, Marinovich M, Corsini E, Gali CL, Viviani B. Erythropoietin: A Novel Neuroprotective Cytokine. *NeuroToxicol* 2005; 26: 923–928.

29) Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF- $\kappa$ B signalling cascades. *Nature* 2001; 412: 641-647.

30) Dawson TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin?. *The Lancet* 2002; 359: 96-97.

31) Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95: 4635-4640.

32) Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M, Fadiloglu S, Yorukoglu K, Fadiloglu M, Gure A. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett* 2001; 298: 139-141.

33) Üzümlü G, Diler AS, Bahçekapılı N, Ziyilan YZ. Erythropoietin prevents the increase in blood-brain barrier permeability during pentylentetrazol induced seizures. *Life Sci* 2006; 78: 2571-2576.

34) Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 6741-6746.

35) Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8: 495-505.

36) Iwasaki K, Kitamura Y, Ohgami Y, Mishima K, Fujiwara M. The disruption of spatial cognition and changes in brain amino acid, monoamine and acetylcholine in rats with transient cerebral ischemia. *Brain Res* 1996; 709: 163-172.

37) Pulsinelli WA, Brierly JB. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 1979; 10: 267-272.

38) Okhawa H, Ohishi N, Yag K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.

39) Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Hatip-Al-Khatib I, Mishima K, Egawa T, Irie K, Fujiwara M. Non-NMDA mechanism in the inhibition of cellular apoptosis and memory impairment induced by repeated ischemia in rats. *Brain Res* 2004; 995: 131-139.

40) Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Chung EH, Egashira N, Mishima K, Fujiwara M. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase and caspase-3, but not caspase-1, prevents apoptosis and improves spatial memory of rats with twice-repeated cerebral ischemia. *Life Sci* 2004; 75: 1967-1978.

41) Maia FD, Pitombeira BSS, Araújo DT, Cunha GMA, Viana GSB, I-deprenyl prevents lipid peroxidation and memory deficits produced by cerebral ischemia in rats. *Cell Mol Neurobiol* 2004; 24: 87-94.

42) Pu F, Mishima K, Egashira N, Akiyoshi Y, Liu AX, Sano K, Irie K, Ishibashi D, Hatip-Al-Khatib I, Iwasaki K, Kurauchi K, Iwasaki K, Fujiwara M. Post-ischemic treatment with toki-shakuyaku-san (tang-gui-shao-yao-san) prevents the impairment of spatial memory induced by repeated cerebral ischemia in rats. *Am J Chin Med* 2005; 33: 475-489.

43) Solaroğlu I, Solaroğlu A, Kaptanoğlu E, Dede S, Haberal A, Beşkonaklı E, Kılınç K. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Child Nerv Syst* 2002; 19: 19-22.

44) Catania MA, Marciano MC, Parisi A, Sturiale A, Buemi M, Grasso G, Squadrito F, Caputi AP, Calapai G. Erythropoietin prevents cognition

impairment induced by transient brain ischemia in gerbils. *Europ J Pharmacol* 2002; 437: 147-150.

45) Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan Ö, Surucu HS, Akbiyik F, Beşkonaklı E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev* 2004; 27: 113-120.

46) Zhang F, Signore AP, Zhou Z, Wang S, Cao G, Chen J. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: Potential signalling mechanisms. *J Neurosci Res* 2006; 83: 1241-1251.

47) Sirén AL, Fratelli M, Brines M, et al. Erythropoietin prevents neural apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2001; 98: 4044-4049.

48) Aydın A, Genç K, Akhisaroğlu M, Yörükoğlu K, Gökmen N, Gönüllü E. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev* 2003; 27: 494-498.