



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GİNKGO BİLOBANIN ARTERİA KAROTİS KAN
AKIMI KESİLEN SIÇANLARIN BEYİN HACMİ
ÜZERİNE ETKİSİ**

Zeynep AKTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Ersan ODACI

TRABZON – 2012

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Ersan ODACI

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Zeynep AKTÜRK'ün hazırladığı “Ginkgo Bilobanın Arteria Karotis Kan Akımı Kesilen Sıçanların Beyin Hacmi Üzerine Etkisi” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ersan ODACI

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ersan ODACI

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Doç. Dr.Sinan CANPOLAT

Tarih:20/06/2012

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve ...sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ahmet KALKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 29.05.2012

Zeynep AKTÜRK

TEŞEKKÜR

"Ginkgo Bilobanın arteria karotis kan akımı kesilen sıçanların beyin hacmi üzerine etkisi" isimli çalışma K.T.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır. Yüksek lisans eğitimim süresince tez konumun belirlenmesi, planlanması, yürütülmesi ve kontrolleri sürecinde bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen, bana histoloji ve embriyolojiyi sevdiren ve kendisini her zaman saygıyla anacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Ersan ODACI'ya çok teşekkür ederim. Aynı şekilde yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım esnasında bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e ve Doç. Dr. Esin YULUĞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım ve stereolojik analizlerin yapılmasında her türlü desteğini benden esirgemeyen Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Orhan BAŞ'a, sıçanlara uygulanan cerrahi girişimlerde büyük yardımlarını gördüğüm K.T.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Sinan CANPOLAT'a ve Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzm. Dr. Hasan ÜÇÜNCÜ'ye, çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan K.T.Ü. Orman Fakültesi Yaban Hayatı Ekolojisi ve Yönetim Bölümü Öğretim Üyesi Yard. Dr. Mehmet KOCABAŞ'a ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Hamdi ÖĞÜT'e teşekkür ederim. Ayrıca aynı dönemlerde yüksek lisans yaptığım ve çalışmalarımda bana her türlü desteği sağlayan sevgili arkadaşım Ayşe İKİNCİ'ye sıçanların bakımı, takibi ve uygulamalarında yardımlarını esirgemeyen K.T.Ü. Tıp Fakültesi, Cerrahi Araştırma Merkez'i çalışanlarına da teşekkür ederim. Benim bugünlere gelmemi sağlayan ve benden hiçbir maddi ve manevi desteğini esirgemeyen çok değerli aileme bu zorlu günlerimde bana sabır gösteren ve hiçbir desteğini benden esirgemeyen değerli eşim Hasan AKTÜRK'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

İç Kapak	
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vvi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	xii
2. SUMMARY	xiii
3. GİRİŞ ve AMAÇ	1
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Beyin Morfolojisi	4
4.1.1. İnsan Beyninin Anatomisi	4
4.1.1.1. Rhombensefalon	4
4.1.1.2. Mesensefalon	5
4.1.1.3. Prosensefalon	6
4.1.2. İnsan Beyninin Histolojisi	7
4.1.2.1. Stratum Molekölare	7
4.1.2.2. Stratum Granölare Eksterna	7
4.1.2.3. Stratum Piramidale Eksterna	7
4.1.2.4. Stratum Granölare İnterna	8
4.1.2.5. Stratum Ganglionaris	8
4.1.2.6. Stratum Multiforme	8
4.1.3. Sığanda Merkezi Sinir Sistemi	8
4.2. İskemi	9
4.2.1. İskeminin Patolojisi	10
4.2.2. İskemide Hücre Ölümü	11
4.2.3. İskemik Hücre Hasarının Patogenezi	12
4.2.3.1. Eksitoksisite	12

4.2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri	13
4.2.3.4. İnflamasyon	14
4.2.3.5. Endotelinler	14
4.2.5. İskemik Beyin Hasarına Kalsiyumun Etkisi	16
4.2.6. İskemide Gelişen Fizyopatolojik Değişiklikler	16
4.2.7. İskemi Sonrası Reperfüzyon Zedelenmesi Mekanizmaları	17
4.2.7.1. ATP'nin Azalması	17
4.2.7.2. Sitozol ve Mitokondride Kalsiyumun Aşırı Artması	18
4.2.7.3. Serbest Radikal Birikimi	18
4.3. Ginkgo Biloba	18
4.3.1. Ginkgo Biloba'nın Etki Mekanizması	18
4.3.2. Ginkgo Biloba'nın Beyin Üzerine Etkisi	19
4.3.3. Ginkgo Biloba'nın Farmakolojik Özellikleri	20
4.4. Hacim Hesaplama Yöntemleri	20
4.4.1. Arşimet Prensibi	20
4.4.2. Planimetrik Yöntemlerle Hacim Hesabı	21
4.4.3. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesabı	22
4.4.4. Stereoloji Analiz Sisteminde Hacim Hesabı	26
4.4.4.1. Stereoloji Analiz Sisteminde Cavalieri Yöntemine Göre Hacim Hesabı	26
4.4.4.2. Stereoloji Analiz Sisteminde Alan Hesabı Yöntemine Göre Hacim Hesabı	27
5. GEREÇ VE YÖNTEM	29
5.1.1. Hayvanların Temini	29
5.1.2. Hayvanların Bakımı ve Takibi	29
5.1.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	29
5.1.4. Cerrahi Girişim ve Sıçanların Takibi	30
5.2. Histolojik İşlemler	32
5.2.1. Dokuların Elde Edilmesi	32
5.2.2. Doku Takibi	32
5.2.3. Kesitlerin Alınması	33
5.2.4. Kesitlerin Boyanması	34
5.3. Analizler	35
5.3.1. Stereoloji Analiz Sistemi	35
5.3.2. Analizlerin Detayları	37

6.	BULGULAR	42
6.1.	Sıçanların Davranış Yönünden Değerlendirilmesi	42
6.2.	Beyin Nöronlarının Morfolojik Değerlendirilmesi.....	42
6.3.	Sıçanların Vücut Ağırlık Bulguları.....	42
6.4.	Beyin Hacmi Bulguları.....	45
7.	TARTIŞMA.....	49
8.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
9.	KAYNAKLAR.....	54
10.	ETİK KURUL ONAYI	66
11.	ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER.....	67

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikleri	31
Tablo 2. Çalışma Öncesi ve Sonrasında Grupların Ağırlık Ortalamalarının Karşılaştırılması Dağılımı (SS= Standart sapma)	45
Tablo 3. Çalışma Gruplarına ait Her Bir Sıçanın Hacim Hesaplamasında Kullanılan Kesit Sayısı ve Ortalama Hacim Değerleri (OHD) (SS= Standart Sapma)	47
Tablo 4. Tüm Grupların Beyin Ağırlıkları Ortalamaları (SS=Standart Sapma)	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. İskeminin Oluşturduğu Nekrotik Hasar (73).	15
Şekil 2. Arşimet Prensibine Göre Hacim Hesabı	21
Şekil 3. Cavalieri Yöntemine Göre Hacim Hesabı	23
Şekil 4. Noktalı Alan Ölçüm Cetveli.	25
Şekil 5. Sıçan Barınma Kafesi	30
Şekil 6. (A); Arteria Karotis Communisin Anevrizma Klempi ile Kapatılması (B); İnsizyon Bölgesinin Dikilmesi (C); Gavaj İğnesi ile Mideye Ginkgo Biloba Verilmesi	31
Şekil 7. Stereoloji Analiz Sistemi. (1) Kontrol Ünitesi, (2) Mikroskop, (3) Kamera, (4) Otomatik Tabla, (5) Monitor, (6) Bilgisayar Kasası, (7) Güç kaynağı.	36
Şekil 8. Stereoinvestigatör Programında Alan Netliğinin Sağlanması	38
Şekil 9. Stereoinvestigatör Programında Alanı Hesaplanacak Bölgenin Etrafının Çevrelenmesi	38
Şekil 10. Stereoinvestigatör Programında Alanın Hesaplanması	39
Şekil 11. Stereoinvestigatör Programında Etrafı Çevrelenen Alan Otomatik Olarak Hesaplanmaktadır.....	39
Şekil 12. Stereoinvestigatör Programında Mikrokatör Yardımıyla Üst Yüzeyin Belirlenmesi.....	40
Şekil 13. Stereoinvestigatör Programında Mikrokatör Yardımıyla Alt Yüzeyin Belirlenmesi.....	40
Şekil 14. Kontrol Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).....	43
Şekil 15. Sham Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).....	43
Şekil 16. İskemi Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).....	44
Şekil 17. İskemi+GB Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).	44
Şekil 18. Tüm Grupların Hacim Değerlerinin Dağılımı	46
Şekil 19. Tüm Grupların Beyin Ağırlıklarının Dağılımı.....	48

SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ

ANOVA	: Analysis of variance
AÖO	: Alan örnekleme oranı
ATP	: Adenozin trifosfat
Ca	: Kalsiyum
CAM	: Cerrahi Araştırmalar Merkezi
Cl	: Klorür
DNA	: Deoksiribonükleik asit
GB	: Ginkgo biloba
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂ O	: Su
KÖO	: Kesit örnekleme oranını
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
MDA	: Malondialdehit
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na	: Sodyum
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NMDA	: N-metil-D-aspartat
OH	: Hidroksil
OHD	: Ortalama hacim değeri
O₂	: Oksijen
P	: Potasyum
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SRÖ	: Sistematik rasgele örnekleme

1. ÖZET

Ginkgo Bilobanın Arteria Karotis Kan Akımı Kesilen Sıçanların Beyin Hacmi Üzerine Etkisi

İçeriğinde bulunan flavanoidler sayesinde kuvvetli serbest radikal tutucu özelliğine sahip Ginkgo Biloba (GB) hipoksi sonucu azalan kan akımı ve oluşan serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği hasarların düzeltilmesinde kullanılabilecek geçici bir antioksidandır. Son yıllarda bu özellikleri nedeniyle deneysel ve klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan GB ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Ancak GB'nın beyin iskemisi üzerine olabilecek muhtemel etkilerini araştıran yeterli çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, karotid arter kan akımı kesilerek oluşturulan beyin iskemisinde, GB'nın beyin hacmi üzerine olabilecek etkilerini araştırmak için bu çalışma planlanmıştır.

Çalışmada toplam 24 erişkin sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6 sıçandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Birinci gruba herhangi bir işlem yapılmadı. İkinci ve üçüncü grup sıçanlara 30 dakika süreyle sağ ve sol arteria karotis communis klemplenerek iskemi uygulandı. İkinci grup sıçanlara iskemi yapıldığı günden itibaren 14 gün boyunca ağız yoluyla her gün aynı saatte GB yapraklarının kuru ekstresini içeren damla (Tebokan Fort Damla, Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş. İstanbul, Türkiye) (100 mg/kg) verildi. Dördüncü grup sıçanlara ise sadece cerrahi stres uygulandı. Hayvanlar 14. günde perfüze edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Beyinler rutin histolojik doku takibinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Daha sonra 30 mikron kalınlığında 1/10 oranında örneklenen kesitler, Cresyl fast violet ile boyandı ve hacim hesaplaması yapıldı.

Çalışma sonucuna göre sham ve kontrol grubu arasında beyin hacmi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu gözlemlendi ($p<0,05$). Bu sonuçlar, cerrahi stresin beyin hacmini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir. 30 dakika uygulanan iskemi sonrası iskemi ve kontrol grubu arasında hacim bakımından bir farklılığın olmaması iskemi sonucu oluşabilecek muhtemel hacim artışının 14 gün içinde ortadan kalktığını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin, Sıçan, İskemi, Ginkgo Biloba, Stereoloji

2. SUMMARY

Effect of Ginkgo Biloba on Brain Volume After Carotid Artery Occlusion in Rats

Ginkgo Biloba (GB) is a temporary antioxidant, which can be used for correcting the damages formed by decreased blood stream and occurred free oxygen radicals as a result of GB hypoxia that has the qualification of strong free radical scavenger due to flavanoids found its content. Lots of studies carried out related to GB, which is commonly used in experimental and clinical studies based on its qualifications in recent years. However, no sufficient study, which makes researches about the possible effects of GB on brain ischemia, is found. Because of this reason, a study is started to make research about the possible effects of GB in brain volume related to cerebral ischemia occurred by stopping the carotid artery blood stream.

In total 24 adult rats are used in the study. The rates are divided in 4 groups, consisting of 6 rats. No operation is applied to the first group. Ischemia is applied by clamping right and left arteria carotid communis to second and third group rates for 30 minutes. Since the day ischemia is applied to the second group rats, a (100 mg/kg) drop (Tebokan Fort Damla, Abdi İbrahim İlaç Sanayi ve Tic A.Ş. Istanbul, Turkey) involves dry extract of GB leaves given to them orally for 14 days everyday at the same time. Related to forth group rates, only surgical stress is applied. Animals are perfused on 14th day and their brain tissues are removed. Brains are passed through routine histological tissue proceeding and they are absorbed in paraffine blocks. After that, cross sections from samples at the rate of 1/10 and in 30 micron thickness are painted with Cresyl fast violet and volume calculation is performed.

According to the study result, it is observed that there is no significant differences in statistic with respect to brain volume ($p<0,05$). The fact that there is no differences between 30 minutes of ischemia and surgical stress groups and between control groups with respect to volume, shows that possible volume increase that can be occurred as a result of ischemia result, disappears within 14 days.

Key Words: Brain, Rat, Ischemia, Ginkgo Biloba, Stereology

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bir dokuya giden kan akımının belli bir süre azalması veya tamamen kesilmesi olarak tanımlanan iskemi, klinikte son derece önemli patolojik olayların ve geri dönüşümsüz birçok bulgunun ortaya çıkmasına yol açan bir durumdur (1). İskemi arteriyel kan akımının olduğu her doku ve organda değişik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir. Örneğin damar sisteminde meydana gelen kesik veya basılar gibi mekanik ve veya fiziksel etkilerle iskemi oluşabileceği gibi, zaman içerisinde değişik etkenlerle damarlarda meydana gelen yapısal farklılıklar da iskemiye yol açabilir. Özellikle kalp-damar hastalıkları sonucunda ortaya çıkan iskeminin beyinde önemli sonuçları ortaya çıkmaktadır. Beyin hasarı ve buna bağlı olarak ortaya çıkan ciddi nörolojik fonksiyon bozukluklar beyin iskemisinin en önemli sonuçlarındandır (2).

Beyin, beyincik, omurilik gibi merkezi sinir sistemi (MSS) dokularının diğer dokulara göre iskemiye çok daha duyarlı olduğu bilinmektedir. Örneğin beyin yüksek bir metabolik hıza karşın, düşük oranda oksijen ve yüksek enerjili fosfat ya da karbonhidrat rezervine sahiptir ve bu nedenle iskemiye oldukça duyarlıdır (3). Aynı şekilde hipokampus ve talamusun bazı bölümleri ve beyincik de iskemiye karşı oldukça hassas olan MSS dokularıdır. Bu hassasiyet beraberinde insan hayatını doğrudan etkileyen, ölümlü sonuçlanabilen veya yaşam kalitesini oldukça düşüren ciddi nörolojik, patolojik ve psikolojik olayların meydana gelmesine de neden olmaktadır. Bu nedenle konu araştırmacılar tarafından oldukça ilgi görmektedir.

Günümüzde iskemik hasarın mekanizması önemli derecede ortaya konmuştur (4). İskemik hasarın mekanizmasının ortaya konması, iskeminin olası sonuçlarının ortadan kaldırılmasına veya azaltılmasına yönelik çalışmaların artmasına neden olmuştur. Bu artışın diğer önemli nedenlerinden bir tanesi de, hayvanlarda deneysel iskemi modellerinin oluşturularak elde edilen sonuçların klinikte de uyarlanabilirliğinin gösterilmesidir (4, 5, 6, 7). Bu çalışmaların sonuçlarının uygulanabilirliği iskemi sonucu ortaya çıkan patolojik bulguların yıkıcı etkilerini azaltacağı muhakkaktır (4).

İskemi veya herhangi bir başka nedenle yeterince oksijenlenemeyen dokularda aşırı ATP yıkımı sonucu serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşur. SOR ortaklanmamış elektronlar nedeniyle oldukça reaktiftir ve hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi önemli biyolojik yapıları ile tepkimeye girer. Bu nedenle SOR'un, dokudaki hasarlanmaların ana kaynağı olabileceğine dair ciddi deliller mevcuttur (8). Konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde, çalışmaların önemli bir kısmının, iskemi sonucu oluşan SOR'un oluşumunu azaltmak veya engellemek üzerine kurgulandığı görülmektedir. Bu amaç için iskemi tedavisinde kullanılan mevcut ilaçların kimyasal yapılarında değişikliklerin yapıldığı veya yeni geliştirilmeye çalışılan ilaçlarla ilgili çalışmalar yapılmakla birlikte, doğada bulunan bir kısım bitki özleri ile yapılan çalışmalara da rastlanmaktadır. Bu bitkilerin en önemlilerinden bir tanesi de Ginkgo Biloba (GB)'dir.

Ginkgo Biloba'nın anavatanı Asya'dır ve uzun yıllar boyunca bu bölgelerde birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Japon Eriği adıyla da bilinen GB'nin özellikle Çin'in değişik bölgelerinde yetiştiği bilinmektedir (9). Geleneksel Çin tıbbında yaklaşık 5000 yıl önce GB'nin yaprak ve tohumlarının astım, öksürük, bronşit ve inkontinans tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (10). Ginkgo Biloba, serebral ve periferik kan akışı bozukluklarında yararı kanıtlanmış bir bitkidir. İçeriğindeki flavanoidler sayesinde kuvvetli serbest radikal tutucu özelliğe sahip olan GB ekstraktları, iskemi sonucu azalan kan akımı ve oluşan SOR'un oluşturduğu hasarların düzeltilmesinde kullanılabilecek geçici bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (8). Ancak kaynaklarda iskeminin beyinde oluşturduğu hasar üzerine GB'nin etkisini araştıran yeterince araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda GB'nin arteria karotis kan akımı kesilerek oluşturulan beyin iskemisinde, sıçanların beyin hacmi üzerine etkisi'nin araştırılması amaçlanmıştır.

Stereoloji, yapılardan elde edilen makroskobik veya mikroskobik kesit görüntülerinden yola çıkarak, o yapılar hakkında güvenilir sayısal veriler elde etmek için kullanılan bir dizi yöntemler bütünüdür. Başka bir ifadeyle, stereoloji yapıların iki boyutlu görüntüleri kullanılarak, onların üç boyutlu özellikleri hakkında bilgi edinilmesini sağlayan bir yöntem bilimidir. Bilindiği üzere kesitlerde iki boyutlu olarak

gözlenen ve sayısal verisi elde edilmek istenen yapılar, ebatları ne olursa olsun, gerçekte üç boyutlu yapılardır. Bu durumda gerçeğe en yakın sayısal verilere ulaşmak günümüzde ancak stereolojik yöntemlerle mümkündür (4, 11, 12, 13, 14).

Buraya kadar verilen bilgilerden de anlaşılacağı üzere sıçan beyni iskemisinde GB kullanımının etkisinin gösterildiği çalışmalar yok denecek kadar azdır. Üstelik bu çalışmalar etkin (az zamanda güvenilir sonuç elde edilmesini sağlayan) ve tarafsız (gerçek değerden sistematik bir biçimde sapma göstermeyen) olarak tanımlanan stereolojik metotlarla yapılmamıştır. Sonuçlar kantitatif değil kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma günümüzde morfometrik çalışmalarda bir standart oluşturmaya başlayan ve kantitatif sonuçlardan yola çıkılarak değerlendirme yapılan stereolojik yöntemlerden faydalanılarak yapılmıştır. Çalışma gruplarının beyin hacimleri alan hesabı yöntemine göre hacim hesaplamasıyla hesaplanarak, elde edilen veriler istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Beyin Morfolojisi

Beyin, canlıların mental ve motor fonksiyonlarının oluşmasında temel ve fonksiyonel önemi olan bir organdır (15). Erişkin bir insan beyni yaklaşık 1400-1500 gram ağırlığındadır ve total vücut ağırlığının %2'sini oluşturur. İnsan beyni $1,2 \times 10^{10}$ nöron ile bunun 8 katı kadar glial hücre içerir (16, 17). Beyin dokusunun metabolizması için gerekli oksijen ve glukoz beyine kan yoluyla gelir. Beyinde gerektiğinde kullanılmak üzere oksijen ve glukoz rezervi bulunmaz. Bu nedenle beyine kesintisiz kan gelmesi çok önemlidir. Beyin dokusunun bütünlüğünün ve fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için, kalbin dakikadaki atım volümünün yaklaşık %15'i kadar kan alabilmesi gerekir. Beyine gelen kanın 350–400 ml'si her iki karotis arterden, geri kalan 200–300 ml'si ise vertebral arterlerden beyine taşınır. Her 100 gr beyin dokusu için dakikada 50 ml kana gereksinim gösteren beyin, dakikada 750-1000 ml kan alır. İstirahat halindeki normal erişkin insan beyni, her 100 gr doku için dakikada 3,35 ml oksijen tüketir (18, 19).

4.1.1. İnsan Beyninin Anatomisi

Beyin, beyin kavitesi içerisinde yer alır ve dura mater, araknoid mater ve pia mater zarları ile çevrilidir. Anatomik olarak beyin üç temel bölüme ayrılır. Bunlar omurilikten yukarıya doğru olmak üzere rhombensefalon, mesensefalon ve prosensefalon'dır (20).

4.1.1.1. Rhombensefalon

Rhombensefalon (arka beyin) medulla oblongata, pons ve beyincikden oluşur. Her üç yapının anatomik özellikleri aşağıda verilmiştir.

a. Medulla oblongata (omurilik soğanı): Beyin sapının en alt kısmında bulunan medulla oblongata koni şeklinde olup yukarıda pons'a aşağıda medulla spinalise bağlanır (21). Medulla oblongata'nın ventral yüzeyinde kortikospinal yolları içeren pyramis, nukleus olivaris inferior'u içeren oliva ile 9., 10., 11. ve 12. kranial sinirler bulunur. Dorsal yüzeyinde ise tuberkulum gracile, tuberkulum kuneatum ve fossa rhomboidea bulunmaktadır (22).

b. Pons: Medulla oblongata'nın üst, mesensefalon'un ise alt kısmında yer alır. Pons iki bölümden oluşur. Birinci bölümü, bazı kranial sinir nükleuslarını formatio retikülaris'in bir bölümünü ve inen-çıkan yolları içeren tegmentum pontisi meydana getirir. İkinci bölüm, nüclei pontis, fibrae pontis transversae ve fibrae pontis longitudinales'i içeren pars pasillaris pontistir (21). Bazı kranial sinir nükleuslarının ve inen-çıkan yolların burada bulunması pons'un önemli bir fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (23).

c. Beyincik: Beyincik, rhombensefalon'un metensefalon kısmından gelişir ve fossa krani posterior'da yer alır. Yukarıda tentorium serebelli aracılığıyla lobus occipitalis, önde ventrikulus quartus aracılığıyla pons ve medulla oblongata ile komşudur (24). Beyincik, beynin ikinci büyük kısmıdır. Beyincik isteğimiz dışında iskelet kaslarının tonusunu kontrol ve sinerjik hareketlerini koordine eder. Böylece kasların işbirliği içinde çalışmasını sağlayarak dengenin korunmasında önemli bir rol oynar (23).

4.1.1.2. Mesensefalon

Pons'un üzerinde beynin altında yer alan mesensefalon (orta beyin) beyin sapının en küçük bölümü olup yaklaşık 2 cm'dir. Motor sistemin bileşenleri arasında özellikle beyincik, bazal ganglionlar ve beyin yarım küreleri arasında önemli bağlantılar yapar (24).

4.1.1.3. Prosensefalon

Ön beyin kesesinden gelişen prosensefalon (ön beyin) iki kısma ayrılır.

a. Telensefalon (beyin hemisferleri; frontal, occipital, parietal ve temporal loblar): Beynin en geniş kısmıdır ve iki hemisferden oluşur. Beyin hemisferleri, fissura longitudinalis serebri ile birbirinden ve fissura transversa serebri ile de beyincikten ayrılır. Bu iki hemisferi birbirine ortada korpus kallosum bağlar. Her bir beyin hemisferi, beyin korteksi denilen milyarca aktif nöron içeren gri maddeden, nöron uzantılarının bulunduğu beyaz cevherden ve beyaz cevher içine yerleşmiş bazal ganglionlardan oluşur (25).

b. Diensefalon: MSS’de ventrikulus tertius’un her iki yanında simetrik olarak yerleşmiştir. Diensefalon’un epitalamus, talamus, hipotalamus ve subtalamus olmak üzere dört kısmı vardır.

- **Epitalamus:** Diensefalon’un üst kısmının arka tarafında bulunur.

- **Talamus:** Beyin korteksinin derinindeki substantia alba içerisinde yerleşmiş, yumurta şeklinde bir nukleus grubudur (24). Birçok çekirdekten oluşur ve diensefalonun en büyük kısmını meydana getirir. Koku duyusu impulsları hariç tüm duyu impulslarının kortekse gitmeden toplandığı önemli bir merkezdir (23).

- **Hipotalamus:** Ventrikulus tertius’un her iki duvarının sulkus hipotalamus’un altında kalan kısmı ile ventrikulus tertius’un tabanında yer alır (24). Otonom sistem ile endokrin sistemi kontrol eder ve bütünleşme sağlar (23).

- **Subtalamus (ventral talamus):** Talamus’un ventralinde, kapsula interna’nın medialinde ve hipotalamus’un kaudal kısmının lateralinde yer alır (24). Motor yolları ara istasyonu olup extrapiramidal sistemde görev yapar (23).

4.1.2. İnsan Beyninin Histolojisi

Beyin, iç kısmında beyaz cevher ve dışta bunu saran gri cevherden oluşur (20). Histolojik olarak beyin, yüzeye paralel 6 tabakadan meydana gelir. Tabaka kalınlıkları, hücre sayıları hemisferlerin değişik kısımlarında farklılık gösterir. Kesit alındığında beyin, beyincik ve omirilikte beyaz ve gri alanlar görülür (26). Beyinde gri madde korteks olarak adlandırılır ve dışta yer alır. Merkezde yer alan beyaz madde ise medulla olarak tanımlanır. Beynin farklı bölgelerindeki hücrelerin dizilişleri birbirine benzememekle birlikte esas olarak altı temel tabaka tanımlamak mümkündür. Beyin korteksi'nin tabakaları şu şekildedir (27, 28).

4.1.2.1. Stratum Molekölare

Az sayıda horizontal hücre ve çok sayıda horizontal seyirli nöron uzantısı bulunur. Bu sinir fibrilleri arasında nadiren Cajal'ın yassı horizontal hücreleri bulunur. Korteksin bu en yüzeysel tabakası, farklı nöronlar arasında çok sayıda sinapsın olduğu yerdir.

4.1.2.2. Stratum Granölare Eksterna

Burada küçük piramidal nöronlar ile küçük granüler nöronlar bulunur. Komşu tabakalardan gelen akson ve dentritlerle bu tabakadaki akson ve dentritler yoğun bir ağ oluştururlar. 5 tabakadaki piramidal nöronların apikal dentritleri ile assendens afferent fibriller arasında çok sayıda sinaps vardır.

4.1.2.3. Stratum Piramidale Eksterna

Orta çapta piramidal hücreler ve iki tabakaya yakın yerleşmiş küçük piramidal nöronlar ile horizontal ve vertikal konumdaki fuziform nöronlar yer alır. Apikal dentritler moleküler tabakaya girerken, aksonlar; projeksiyon, assosiasyon veya komissural lifler olarak beyaz cevhere girerler.

4.1.2.4. Stratum Granulare Interna

Moleküler tabakadan sonra en ince tabakadır. Başlıca stellat nöronlar, nadiren küçük piramidal nöronlar bulunur. Hücreler yoğun yerleşimlidir. Horizontal seyirli fibrillerin yoğunlaşmasıyla Bailinge'in dış bandı diye bilinen fibriller alan ortaya çıkmıştır. Bunlar komşu tabakalarda, subkortikal bölgede, korteksin diğer kısımlarında yerleşik nöronların horizontal seyirli nöritleridir.

4.1.2.5. Stratum Ganglionaris

En büyük piramidal nöronlar ve az sayıda da stellat hücreler vardır. Piramidal nöronların büyüklüğü değişik alanlarda farklılık gösterir. Gyrus presentralisin motor korteksinde bu tabakanın piramidal hücreleri çok büyüktür ve Bentz hücreleri olarak adlandırılır. Bu hücreler traktus piramidalis veya traktus kortikospinalisin projeksiyon liflerinin yaklaşık %3'ünü teşkil eder. Bu tabakada da 4. tabakadaki gibi horizontal seyirli fibrillerin yoğunlaşmasıyla Bailinge'in iç bandı oluşmuştur.

4.1.2.6. Stratum Multiforme

Stratum Multiforme (polimorf tabaka) değişik nöron tipleri ve uzantılarında oluşan en derindeki tabakadır. Nöronlarda Martinotti nöronları en belirginleridir. Hücrelerin çoğu fuziform şekilde olduğu halde, birçoğunun hücre gövdeleri üçgen veya oval olan piramidal hücrelere değişmiştir. Alttaki beyaz cevhere giren veya çıkan çok sayıda sinir lifi bulunur (27, 29, 30).

4.1.3. Sıçanda Merkezi Sinir Sistemi

Sıçan, biyomedikal araştırmalarda, temel tıp, ilaç, gıda, davranış ve toksisite ile ilişkili deneysel çalışmalarda en çok kullanılan hayvandır. Sıçanlarda da MSS beyin ve omurilikten oluşur. Beyin; beyin ve beyincikten meydana gelir. Beyin, beyin zarları olarak adlandırılan üç tabaka tarafından çevrelenmiştir. Bunlar; dura mater, araknoid ve pia materdir. Dura mater diğer iki meninksin dış kısmında bulunan sağlam bir fibröz

yapıdır. Araknoid, dura ve pia mater arasında yer alır. Piamaterin yapısı ise dura materden daha ince ve narindir.

Beyin ve omurilik, beyin omurilik sıvısı (BOS) içinde yüzerler. Ventriküller beyin içinde BOS için kanal görevi görür. Sıçanlarda iki lateral ventrikül, interventriküler foramen yoluyla üçüncü tekil ventrikülü besler. Üçüncü ve dördüncü ventrikülün bağlantısı da serebral akuduktus yoluyla olur Sıçanlarda subaraknoid aralıkta bağlantıyı sağlayan açıklık olmasa da iki lateral açıklık vardır (31).

4.2. İskemi

Beyin kan akımı, beyin arter basıncı ve beyin damarlarının direncine bağlıdır. Tüm beyindeki kan akımı 50–54 ml/100 gr/dakikadır. Bu akım gri cevherde 80 ml/100 gr/dakika, beyaz cevherde ise 20 ml/ 100 gr/dakikadır. Beyindeki kan akımı 20 ml/100 gr/dakikanın altına düştüğünde iskemi, 10 ml/100 gr/dakikanın altına düştüğünde ise hücre ölümü görülmektedir (32).

İskemi, serebrovasküler hastalıkların önemli bir kısmının nedenini oluşturur. Klinik anlamda serebrovasküler hastalık, aniden veya kısa sürede gelişen fokal nörolojik bozukluklar olarak tanımlanır (33). Patolojik anlamda ise beyin damarlarından herhangi birinde meydana gelen problem sonucunda ortaya çıkan bir tablodur. Örneğin damar tıkanması ya da bir damarın yırtılıp kanaması sonucunda beyin dokusunda iskemi meydana gelebilir. İskemiye karşı her dokunun duyarlılığı farklıdır. MSS metabolik yönden aktif olduğundan iskemiye karşı oldukça duyarlıdır (34, 35).

Batı ülkelerinde serebrovasküler hastalıklar, görülme sıklığı açısından karşılaştırıldığında iskemi, kalp hastalıkları ve kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Serebrovasküler hastalıkların hemen hemen yarısında klinik tabloyu iskemik değişikliklerin belirlediği bilinmektedir. Klinikte iskeminin etkisi fonksiyonel ve geçici olabildiği gibi iskeminin süresine, derecesine bağlı olarak yapısal ve kalıcıda olabilir (36, 37). Beyin iskemisi, beyin kan akımının azalması ve enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayıp, nöron hasarı ile sonuçlanan olayları ifade etmektedir (38, 39).

İskemi etkilenen alana göre dört farklı şekilde isimlendirilebilir.

- **Global İskemi.** Global iskemide tüm beyin alanları etkilenmiştir.
- **Fokal serebral iskemi:** Fokal serebral iskemide beyin sadece bir bölgesi etkilenmiştir.
- **İnkomplet serebral iskemi:** İnkomplet serebral iskemide beyin kan akımı tam kesilmemiştir. İskemik alanda sadece hipoksi etkisi vardır.
- **Komplet serebral iskemi:** Komplet serebral iskemide beyin kan akımının tam kesilmesine bağlı beyin oksijensiz kalması mevcuttur (40, 41).

4.2.1. İskeminin Patolojisi

Beyin oksijen, kan akımı ve enerji gereksinimi arasında hassas bir denge vardır. Beyin dinlenme halinde vücudun kullandığı oksijenin %20'sini tüketir. Enerji metabolizmasının hemen hemen tamamı glukoz metabolizması tarafından karşılanır. Oksijen ve glukoz rezervi bulunmayan beyin dokusunun, fonksiyonlarının devamı ve parankimasının fizyolojik koşullarda bütünlüğünün korunması için kalp dakika atım hacminin yaklaşık %15'i oranında kan akımına gereksinimi vardır. Beyinde glukoz ve oksijen şeklinde depolanan enerji kaynakları beyinin gereksinimini yaklaşık 1 dakika süreyle karşılamaya yeterlidir. İskemiyi izleyen birkaç dakika içinde nörolojik fonksiyonlar bozulmakla birlikte başlangıçta bu bozukluklar kalıcı değildir (42).

Dinlenme halinde insan beyni her 100 gr doku için dakikada 3.35 ml oksijen tüketir. Bu oksijen kaynağının kesilmesi halinde hasta 10 saniye içinde bilincini yitirir, 20 saniyede EEG izoelektrik hale gelir. 5 dakika içinde ise beyindeki tüm yüksek enerjili fosfat depoları tükenerek, geri dönüşü olmayan hasar yani hücre ölümü meydana gelir (18, 42).

Beyin kan akımının 22 ml/100 gr/dakika düzeylerine düşmesi ile nöronal disfonksiyon oluşmaya başlar ve 12 ml/100 gr/dk'nın altına düşmesi durumunda nöronal ölüm meydana gelir (43). Beyin kan akımındaki azalmanın en fazla olduğu çekirdek bölgesindeki hücreler dakikalar içinde geri dönüşüz olarak zedelenir. Ancak

iskemik bölgenin periferinde kollaterallerce sağlanan rezidüel kan akımının olması, nöronların kısa bir süre için de olsa morfolojik ve biyokimyasal bütünlüğünü korur. Orta veya hafif derecede iskemik kalmış beyin dokusundaki nöronlar akut dönemde elektriksel olarak sessiz olmakla birlikte yapısal bütünlüğünü sürdürürler (44, 45). İskemik beyin hasarı rezidüel kan akımının miktarına bağlı olarak dakikalardan saatlere kadar uzanan bir sürede gerçekleşir. Beyin kan akımının 2–3 saat süreyle normalin %18-20'nin altına düşmesi infarkt oluşumuna neden olmaktadır (46).

4.2.2. İskemide Hücre Ölümü

Hücre, değişen ortam şartlarına göre yapısını ve işlevini sürekli olarak değiştirebilir ve uyarı belli bir dereceye çıkana kadar normal dengesini koruyacak uyumu gösterebilmektedir. İskemiye son derece duyarlı olan beyin dokusu iskemi sırasında, hücre düzeyinde giderek artan enerji eksikliği, hücre içi oksidatif fosforilasyon kaybı ve Adenin Trifosfat (ATP) düşüşünün eşlik ettiği asidoza neden olur. Bunun sonucunda da proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin sentezi durur. Hücre membranındaki iyon pompalarının çalışmaması sonucu hücre içi ve dışı iyon dengesi bozulur. Böylece hipoksantin ve ksantin gibi ATP yıkım ürünleri hücre içinde birikir. Bu süreçlerin sonunda da ortaya çıkan SOR hücrenin makromoleküllerini zedeleyerek hücre ölümüne neden olur (47, 48). Hücre ölümü nekroz ve apoptozis olmak üzere iki tiptir.

Nekroz, hücresel zedelenme sonucu en sık görülen kontrolsüz ölüm tipidir. Ölü hücre çevreye zararlı toksik maddeler ve sindirici enzimler yayar. Nekroz gerçekleştiğinde iskemi ışık mikroskobu düzeyinde bile tarif edilebilir. Nekroz iki farklı şekilde gerçekleşir ve buna göre isimlendirilir. Hücrenin enzimatik harabiyeti sonucu likefaksiyon nekrozu gelişirken, hücredeki proteinlerin denatürasyonu sonucu koagülasyon nekrozu gelişir. Bu olaylar için saatler gerekir. Koagülasyon nekrozu, beyin hariç, diğer dokuların hipoksik hücre ölümünden sorumludur. Merkezi sinir sisteminin hipoksisinde ise likefaksiyon nekrozu görülür (49, 50, 51). Bu iki tip nekrozdan başka iskemi dışı sebeplerle daha nadir görülen nekroz tipleri de vardır. Nekroz en yoğun olarak etkisini çekirdekte gösterir. Hücre ölümüyle birlikte çekirdeğin

bazofilisi artabilir (karyolizis), çekirdeğin büzüşmesiyle birlikte bazofili sözkonusu olabilir (piknoz) ya da piknotik çekirdek parçalara ayrılabilir (karyoreksis). İskemik nöronlar normal nöron yapısından farklı görünümde olduklarından, dokuda düşük sayıda nöronun izlenmesine neden olur. Çünkü iskemik nöronların tanımlanmaları zordur ve bu nöronlar “gost” hücreler olarak tarif edilirler (50, 51, 52).

Apoptozis ise hücre içi kontrol mekanizmaları ile hücrenin programlı ölümü gerçekleşir ve çevreye zarar vermez. Apoptozis kısaca programlanmış hücresel ölüm olarak da adlandırılır. Apoptozis iskemide meydana gelen hücre ölümlerinin yarından fazlasından sorumludur (53, 54).

4.2.3. İskemik Hücre Hasarının Patogenezi

İskeminin başlaması ile birlikte oksijen ve glukoz sağlanması durur, ATP süratle azalır (32, 55, 56). Enerji kaynaklarındaki yetmezlik nöronun geri dönüşü olmayan hasarına yol açar (57, 58). İskemi bölgesindeki hücrelerin ölümü değişik patolojik mekanizmalarla gerçekleşir. Bu mekanizmalar sadece iskemi bölgesinde değil, bu bölgenin yakınındaki hücrelerde de ölümlere neden olur. Bu mekanizmaların başlıcaları şunlardır (51).

4.2.3.1. Eksitoksisite

İskemi sırasında ATP azalması sonucu Na-P pompası gibi enerjiyle çalışan sistemler bozulmaktadır. Bu da membran potansiyelinin bozulmasına ve nöronlarla glia hücrelerinin depolarize olmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda presinaptik uçtan ekstrasellüler aralığa aşırı bir glutamat salınımı olur (59, 60). Ekstrasellüler glutamat artışı N-metil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna yol açar. Eksitoksisiteden esas sorumlu olan NMDA reseptör aktivasyonudur. NMDA reseptör kanalı normalde magnezyum ile bloke durumdadır ve iskemik dokuda nöronal membran depolarizasyonu oluşunca voltaja bağımlı bu kanal açılarak nöron içine Na^+ , Cl^- ve H_2O 'nun girmesine neden olur ve hücrede şişme meydana gelir (43, 61). Aktivasyonun daha uzun sürmesi durumunda ise nöron içine Ca^{++} girerek, Ca^{++} 'a

bağımlı enzimlerin aktive olmasına ve gecikmiş hücre ölümüne neden olur (43, 62).

4.2.3.2. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), dokularda yaygın olarak bulunan gaz yapısında bir mediatördür. Vasküler endoteliumda kan akımı ve kan basıncının regülasyonunda, geçirgenlik ve sinaptik transmisyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda rol oynamaktadır. Esansiyel bir aminoasit olan L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığı ile sentezlenir ve difüzyon ile çevre hücrelere yayılır (63). NO'nin süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitrit anyonu, NO'e bağlı hücre ölümünün de ana mekanizma olabilir (64). Fazla nöronal NO üretimi nörotoksik iken, endotelial NO bölgesel kan akımını arttırarak ve diğer hemodinamik faktörler üzerine etki ederek beyin dokusu üzerinde koruyucu rol oynamaktadır. Beyin iskemi/reperfüzyonu sonrası ortaya çıkan NO ile süperoksitin ve bunların reaksiyona girmesiyle oluşan peroksinitritin kan beyin bariyerini yıkımındaki esas faktörlerden olduğu gösterilmiştir (65).

4.2.3.3. Reaktif Oksijen Türleri

O₂, H₂O₂ ve OH⁻ gibi reaktif oksijen türleri (ROS) hücrelere yüksek derecede toksiktir. Hücresel antioksidan enzimler ve serbest radikal toplayıcılar genellikle bir hücreyi ROS'un toksik etkilerinden korur. Bununla birlikte ROS'un üretimi hücrelerin antioksidan savunmasını meşgul eder. ROS bağımlı lipid peroksidasyon, proteinlerin antioksidasyonu ve DNA hasarı hücresel patolojiye yol açar ve hücre ölümüne sebep olan oksijen kaynaklı serbest radikaller çok iyi bilinen sonuçlarıdır. Lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın ROS aracılı oksidatif hasarının mekanizması ileri derecede çalışılmıştır. Proteinlerin bazı hassas aminoasitlerinin bölgeye has oksidatif hasarı şimdilerde progenez boyunca metabolik disfonksiyonun ana sebebi olarak anılmaktadır. ROS ayrıca doku hasarından sorumlu proteinleri kodlayan çeşitli genlerin ekspresyonunda önemli bir rol oynayan en az iki iyi tanımlanmış transkripsiyon faktörünün regülasyonuna katılmıştır. ROS hakkındaki çalışmaların kayda değer faydalarından biri belki de ROS aracılı oksidatif hasar ve hastalık ilerleyişini kontrol etmek için uygun bir antioksidan terapinin tasarlanacak olmasıdır (3, 66).

4.2.3.4. İnflamasyon

Hücre zedelemesine yol açan çeşitli ekzojen ve endojen uyarılar, vaskülarize bağ dokularında inflamasyon adı verilen kompleks bir reaksiyona da yol açabilirler. İnflamasyon, hücre hasarına yol açan etken olduğu kadar, yıkım sonucunda ortaya çıkan nekrotik doku ve hücreleri de ortadan kaldırmayı amaçlayan bir seri moleküler ve hücresel olayı kapsar (50). İskemik ve travmatik bölge etrafında inflamatuvar hücrelerin olması hücresel hasarı attırabilir. Polimorfonükleer hücreler, hücre zarlarına daha da zarar verebilecek miyeloperoksidaz gibi toksik enzimlerin etkisiyle doku hasarına neden olur. TNF α , IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin iskemik ve travmatik hasarlardan sonraki bir saat kadar erken bir sürede yoğun olarak etkin olup salgılandığı görülür. Bu sitokinler inflamatuvar bir reaksiyona neden olur. Hatta lökositler için kemoatraktantlar olarak hareket ederler. İnterselüler adhezyon molekülü (ICAM) ve endotelial lökosit adhezyon molekülü (ELAM) gibi adhezyon molekülleri ile doku metalloproteinazları kan beyin bariyeri yoluyla lökositlerin penetrasyonunu kolaylaştırdıktan hemen sonra açığa çıkarlar (35, 67). Lökositlerin infiltrasyonunun geç iskemik hasarın ilerlemesinde rolü olduğu ve nörolojik gelişmeyi olumsuz etkilediği bildirilmiştir (68).

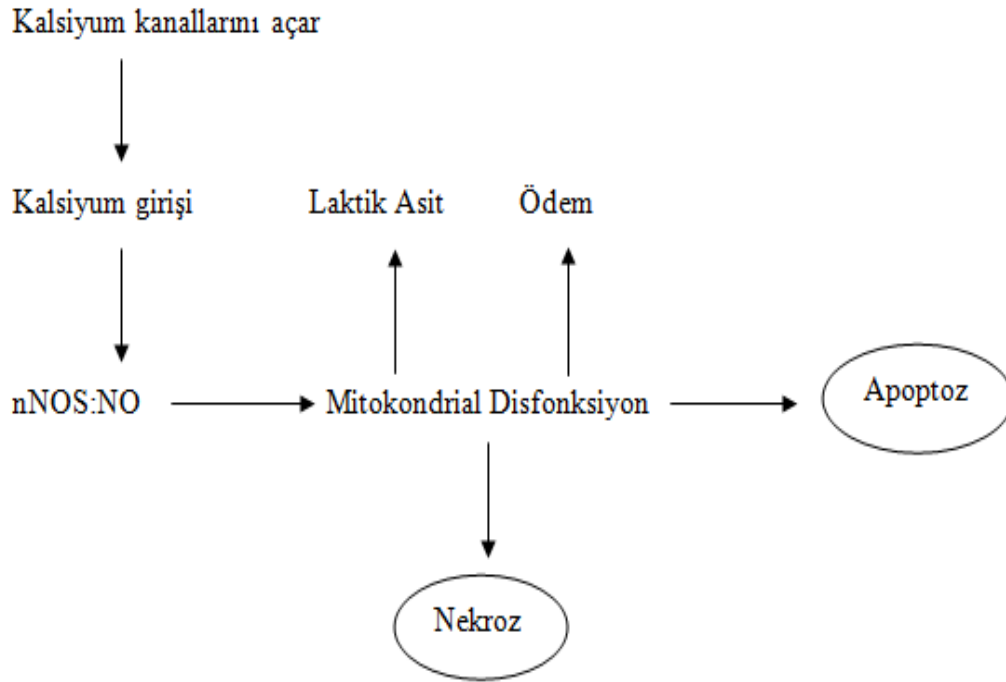
4.2.3.5. Endotelinler

Endotelinler de iskemiye arttırabilecek vazokonstriktör etkileri nedeniyle doku hasarını açığa çıkarmada önemlidir. İskeminin başlaması ve önemli bir süre devam etmesinin ardından endotelin seviyesinde yukarı doğru bir regülasyon gözlemlenir (35). Son dönemlerde kafa travması sonrasında endotelin seviyelerinde güçlü bir artış olduğu görüldü. İskemi ve kafa travma modelleri ile yapılan çalışmalarda seçici ETA reseptörünün belirgin ve önemli bir nöroproteksiyon sağladığı, bu reseptörlere ait diferensiyel antagonizmanın İskemi ve kafa travmasında önemli bir tedavi fırsatı doğurabileceği de bildirilmektedir (35).

4.2.4. İskeminin Doku Hacmi Üzerine Etkisi

İskemi, kan akımının hücresel fonksiyonlarını karşılamak için gerekli olan düzeyin altında olması durumu olarak da tanımlanmaktadır. Aerobik koşullarda yaşayan

biyolojik organizmalar, ortamda temel yaşam kaynakları olan oksijen ve metabolik ürünler bulunmadığı zaman canlılıklarını belli bir süre devam ettirebilmektedirler. MSS, vücutta kısıtlı anaerobik metabolizma ve glikojen depoları nedeniyle iskemiye en duyarlı dokulardan birisidir. İskemi bölgesinin çevresindeki kollaterallerce sağlanan kan, nöronların kısa bir süre içinde olsa morfolojik ve biyokimyasal bütünlüğünü korur. İskemi sonucunu belirleyen en önemli iki faktör iskeminin derinliği ve süresidir (69). İskemik dönemi takiben gelişen beyin hasarı, uzun dönemde geriye dönüşsüz bir durumdur (70). İskeminin başlangıçta oluşturduğu nekrotik hasarın yanı sıra reperfüzyonun, glutamat ve nitrik oksit nörotoksitesinin, serbest radikal oluşumunun, hücre içinde kalsiyum (Ca^{+2}) birikiminin ve nihayetinde gelişen nekroz ve apoptozun beyinde geri dönüşümsüz hasara yol açtığı bilinmektedir (71, 72). İskemik beyin hasarında başta glutamat olmak üzere diğer pek çok faktör uyarılarak, hücre içine N-Metil D Aspartat reseptörleri aracılığıyla Ca^{+2} girişi artar (73) (Şekil 1). İskemik beyin hasarında hücre ölüm, nekroz veya apoptoz ile olur (74). Bu iki mekanizmada en belirgin fark apoptozda inflamasyon olmamasıdır.



Şekil 1. İskeminin Oluşturduğu Nekrotik Hasar (73).

4.2.5. İskemik Beyin Hasarına Kalsiyumun Etkisi

Kalsiyum iyonları iyon dengesinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynarlar. İskemik nöronlarda ölümü başlatıcı faktör ATP yokluğudur. ATP yokluğu hücre membranında ve hücre içi organel membranlarında iyon transportunun bozulmasına neden olur. İskeminin başlangıcında ekstrasellüler K^+ iyonu artmaya başlar ve nöron içine Na^+ iyonu akışı başlar. Bu aşamada K^+ hücre dışına Na^+ , Ca^{++} ve Cl^- hücre içine girer. Membran geçirgenliğindeki bu ani artışın presinaptik membranlardan salınan glutamatın etkisiyle olduğu düşünülmüştür. Glutamat salınımına bağlı olan depolarizasyon aynı zamanda voltaja bağımlı Ca^{++} kanallarını da açmakta ve global etki sonucu hücre içine kontrolsüz bir Na^+ , Ca^{++} ve Cl^- girişi olmaktadır (75). Nöronal mebranda iyon dengesinin bozulması sonucu ortaya çıkan intrasellüler Ca^{++} artışı hücrede lipolizis ve proteolizise yol açmakta ve protein fibrilasyonu bozulmaktadır. Ca^{++} varlığında aktive olan fosfolipaz A ve C enzimleri araşidonik asit oluşumuna yol açarlar. Araşidonik asitten prostoglandin ve lökotrienlerin sentezi başlar. Bu sentez sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatarak, hücre organel mebranlarının bütünlüğünü bozarlar (19, 75, 76). Özetle iskemi oluştuğunda bazı hücreler eksitotoksik şişme, osmotik parçalanma ve nekroz ile hızla ölürken bazıları apopitotik mekanizmalarla daha yavaş ölmekte, bazıları da apopitoz ve nekroz karışımı özellikler göstermektedir (77, 78).

4.2.6. İskemide Gelişen Fizyopatolojik Değişiklikler

İskemide ATP sentezi ile ilgili iyon pompaları azalır, ATP/ADP oranı düşer, voltaja bağlı kalsiyum kanalları açılır, eksitator transmitterlerin salgılanması hızlanarak anaerobik solunum ve hücre içi asidoz gelişir, NMDA reseptörlerine bağlı olarak Ca^{++} kanalları açılır. Hücrede membran depolarizasyonu oluşur, hücre içine Na^+ , Cl^- girişinde ve K^+ çıkışında artış olur. Na^+ ve Cl^- nin içeri alımıyla oluşan osmotik gradiyenti takiben nöronlarda su birikmeye başlar. Bu da nöronal şişme veya sitotoksik ödem ile sonuçlanır (69, 79, 80).

Hücrel ödem olarak da adlandırılan sitotoksik ödem, hücrel metabolizmanın bozulması ile meydana gelir ve başlıca sebebi beyin iskemisidir (81, 82, 83, 84). İskemi sonrası gelişen bir dizi olay hücre içinde sıvı birikmesine ve hücrenin şişmesine neden olmaktadır. İskemi neticesinde eksitator aminoasit reseptörleri glutamatın sinaptik aralıkta birikmesi sonucu aşırı derecede uyarılır. Böylece önce Na^+ sonra Ca^{2+} fazla miktarda hücre içine girer. Na^+ ile birlikte suyun hücre içine girmesi sonucu hücre şişer. bu durum beyin hacminde artışa sebep olur. Ca^{2+} fosfolipazları uyarmasıyla hücre membranı parçalanır. Membranı oluşturan yağ asitlerinin metabolize olmasıyla ortaya çıkan serbest radikaller ve lipid peroksidleri kısır bir döngüyle membran hasarını arttırmırlar (82). Hücrel ATP düzeyi normalin %10'unda bile Na^+/K^+ pompası %50 kapasiteyle çalışabilir. İskemi sonrası başlayan reperfüzyon dönemi ağır hasarın olduğu evredir (85).

İskemik dokulara kan akımının tekrar sağlanması, geri dönüşümlü zedelenmeye uğramış hücrelerin iyileşmesi ile sonuçlanırken geri dönüşümsüz zedelenmeye uğramış olanları etkilemez. Bununla birlikte iskeminin şiddetine ve süresine bağlı olarak çeşitli hücreler kan akımının yeniden başlamasına bağlı olarak ölüme gidebilir (52, 86).

4.2.7. İskemi Sonrası Reperfüzyon Zedelenmesi Mekanizmaları

İskemi sonrası reperfüzyon zedelenmesi bazı mekanizmalarla izah edilmeye çalışılmıştır. Bu mekanizmaların başlıcaları ATP'nin azalması, sitozol ve mitokondride kalsiyumun aşırı artması ve serbest radikal birikimidir (52, 54, 86, 87).

4.2.7.1. ATP'nin Azalması

ATP sentezinin azalması, iskemi ve toksik zedelenmenin temel sebebidir. Reperfüzyon sırasında ATP üretimi yetersiz kalır.

4.2.7.2. Sitozol ve Mitokondride Kalsiyumun Aşırı Artması

Artmış olan kalsiyum potansiyel olarak hücre için zararlı enzimleri aktive eder. Kalsiyum ile aktive olduğu bilinen enzimler fosfolipazlar, proteazlar, ATPaz'lar ve endonükleazlardır. Fosfolipazlar, membranların zedelenmesine yol açar. Proteazlar, hem membranı hem de iskelet yapıdaki proteinleri yıkar. ATPaz'lar, ATP yıkımını arttırır. Endonükleazlar ise kromatini parçalar (52, 86, 87).

4.2.7.3. Serbest Radikal Birikimi

Reperfüzyon hasarının en önemli mekanizmalarından biri de oksijen radikallerinin birikimidir. SOR, lipid peroksidasyonu ile hücre membranında zedelenme oluşturur. Reoksijenasyon sırasında parankimal ve endotelyal hücrelerden, bölgeye gelen lökositlerin ortaya çıkardığı SOR'larının artması ile zedelenme daha da artabilir. Mitokondri permeabilitesi artar ve mitokondride enerji üretimi engellenir. Dolaşımdaki lökositler reperfüze dokuda toplanır ve sitokin üretirler. Bu inflamasyon daha fazla zedelenmeye neden olur (54).

4.3. Ginkgo Biloba

Anavatanı Asya olan GB, sağlık koruyucu özelliği nedeniyle uzun yıllar boyunca bu bölgelerde birçok hastalıkta kullanılmıştır. Ginkgo ağacı genellikle 20–35 metre yüksekliğinde yaprak döken bir ağaçtır. Ginkgoiae sınıfının üyesi olup Japon Eriği adıyla da bilinen GB'nin Çin'in değişik bölgelerinde yetiştigi bilinmektedir (9). Geleneksel Çin tıbbında yaklaşık 5000 yıl önce GB'nin yaprak ve tohumlarının astım, öksürük, bronşit ve inkontinans tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (10).

4.3.1. Ginkgo Biloba'nın Etki Mekanizması

GB'nin tıbbi etkilerinden sorumlu aktif bileşenlerinin iki ana grubunun olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar; Ginkgo ağacı yaprağında çeşitli yoğunluklarda bulunan terpen laktonlar ile ginkgo flavon glikozitlerdir (88). Ginkgo yaprağının ekstresi flavanoid glikozitleri, ginkgolid ve bilobalid içermektedir. Ayrıca GB yaprakları

antioksidan özelliklere de sahiptir (89). GB çeşitli biyoaktif özellikler içermektedir. Bunların başlıcalarını GB nörotransmisyonunu değiştirip somatosensoriyel süreç ile beyin bölgelerindeki azalan glikoz kullanımını da içeren bir takım nörolojik koruma sağladığı, kortikosteroid salgılanmasını değiştirerek periferik böbreküstü benzodiyazepin reseptörlerinin sayısını azalttığı, sıçan hipokampusundaki yaşa bağlı değişikliklere karşı koruma sağladığı ve GB'nin geri dönüşümlü olarak A ve B monoamin oksidazı engellediği şeklinde sıralayabiliriz (90, 91, 92).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar terpen laktonlarının, trombosit aktive edici faktörünün membran reseptörüne bağlanmasını engellediği gösterilmiştir (93). Yapılan çalışmalar, GB'nin polimorfonükleer hücrelerde azalan süperoksit salınımı ile sonuçlanan gama radyasyonla uyarılmış tavşanlarda antioksidan özelliği olduğunu göstermektedir. Bu nedenle hipoksik hasara karşı beyin dokusunu koruduğu ve beyin metabolizmasını düzelttiği düşünülmektedir (88, 94).

4.3.2. Ginkgo Biloba'nın Beyin Üzerine Etkisi

Beyin oksijen ve glikoz enerji gereksinimi arasında önemli bir bağ vardır. Bu anlamda nöron kaybı ve nörotransmisyonlu dejenerasyona bağlı olarak düşünsel fonksiyonun gerilemesi oksijen ve glikozdaki bozukluklarla ilişkilidir (95, 96). Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu salınımı gibi durumlarda zararlı sonuçlar oluşturabilir. Beyin hücreleri membranlarında yüksek miktarda doymamış yağ asidi içerdiği için serbest radikal hasarına son derece duyarlıdır. Membranlardaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, membran akışkanlığı ile membran yapı ve işlevinin bozulmasında bir düşüşe yol açar (97). Bu hücrel hasar, yaşa bağlı işlevsel düşüşün de önemli bir mekanizmasıdır. Beyin hücresi hipoksiye son derece duyarlıdır. Bu nedenle azaltılmış dolaşım, membran fonksiyonu ve enerji üretimini bozup hücre ölümüne yol açan bir zincir reaksiyonunu başlatır.

Ginkgo Biloba'da bulunan çeşitli bileşikler birkaç etki mekanizmasıyla, düşünsel fonksiyonun gerilemesinin farklı aşamalarında koruyucu rol oynayabilir. Bunları şöyle sıralayabiliriz (95, 98).

- Arterler, kılcal damarlar ve venlerin vazoregülasyon faaliyetleri PAF antagonizmi
- İnflamasyon hemeostazı ve oksidatif stres
- Serbest radikallerin neden olduğu hücre membran hasarının önlenmesi
- Nörotansmisyon modülasyonu

4.3.3. Ginkgo Biloba'nın Farmakolojik Özellikleri

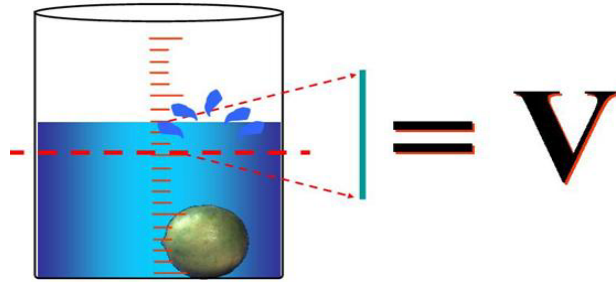
Ginkgo Biloba çok eski yıllardan beri Çin'de kullanılmasına rağmen bu bitki üzerindeki sistematik çalışmalar Avrupa'da 1960 yılında başlamış ve ilk olarak 1965 yılında Almanya'da tedavide kullanılmıştır (99). Yapılan çalışmalarda GB'nin flavanoid glikozitlerden türediği, bu bileşenlerin peroksid radikal temizleyiciler olup bir dizi farmakolojik faaliyetler gösterdiği (100), trombosit aktive edici faktörü etkisiz hale getirdiği ve iskemi dönemlerinde toksinlerin temizlenmesini hızlandırdığı, kolinerjik nörotransmisyonu geliştirdiği ileri sürülmektedir. GB'nin damar ve dokuyu koruyucu etkileri de vardır. Sinaptik durumlarda kan damarlarını gevşetici etkisi, alerji, travma veya toksik nedenlerle oluşan beyin ödemeine karşı inhibisyon ve regresyonun hızlanmasına yol açması (101), kapiller permeabilitenin artmasına karşın koruyucu etkisi, damar ve dokuyu koruyucu etkileri bunların başlıcalarıdır. Beyin seviyesinde endotel kökenli gevşetici faktör mekanizmasını koruması, davranış üzerine etkili bazı peptitlerin metabolizmasının düzenlenmesi ve nörotransmitterlerin salınımını (102) arttırması ise GB'nin algılamayı arttırıcı etkisinin olduğunu da düşündürmektedir. Ayrıca GB'nin, iskemi sırasında ksantin oksidaz sistemiyle oluşan superoksit anyonlarını da ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (103).

4.4. Hacim Hesaplama Yöntemleri

4.4.1. Arşimet Prensibi

Düzensiz şekilli nesnelerin hacimlerini hesaplamak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan en çok bilineni de Arşimet Prensibi (Archimedean Principle) olarak bilinir. Eskiçağın en büyük matematikçilerinden birisi olan Arşimet, Sicilya

Adası'nda bir Yunan kenti olan Siracusa'da doğdu. Arşimet prensibinde hacmi hesaplanacak nesne içi su dolu bir dereceli silindire daldırılır ve bu prensibe göre nesnenin taşırdığı ya da yükselttiği su miktarı nesnenin hacmine eşittir (104, 105) (Şekil 2). Ancak, çoğu zaman biyolojik nesneler için bu yöntemi kullanmak mümkün olmayabilir. Özellikle canlılarda herhangi bir yapı ya da organın hacmi hesaplanmak istendiğinde daha değişik yöntemler kullanılmak zorundadır.



Şekil 2. Arşimet Prensibine Göre Hacim Hesabı

4.4.2. Planimetrik Yöntemlerle Hacim Hesabı

Bazı yarı otomatik makineler ve programları, ilgilenilen objenin sınırlarının çizilmesi suretiyle yapının izdüşüm alanlarını ya da bir mesafenin uzunluğunu verir. Bu yöntemle planimetri denilir. Günümüzde planimetrik ölçümler yapmak için kullanılan birçok program ücretsiz olarak elde edilebilmektedir. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından geliştirilen ImageJ© adlı program <http://rsb.info.nih.gov/ij/> adresinden ücretsiz olarak elde edilebilmektedir. Hacim hesaplamalarında da bu ve benzer programlar kullanılabilir. Bu durumda, dijital ortama aktarılan film ya da resimler üzerinden program yardımı ile uzunluk ve alan değerleri hesaplanabilir (106, 107).

Planimetrik ölçümler yapmak için en fazla kullanılan programlardan birisi olan ImageJ©, herkesin kullanımına açık internetten kolayca ve ücretsiz olarak indirilebilen Java tabanlı bir görüntü işleme yazılımıdır. Yazılım üzerinde Java Sanal Makinesi bulunduran herhangi bir bilgisayarda bir applet veya bir uygulama olarak çalıştırılabilir. Uygulama dağıtımları Windows, Mac OS, Mac OS X ve Linux işletim sistemleri için

mevcuttur (108, 109). Yazılım ile imajları görüntüleme, düzenleme, analiz, işleme, kayıt etme ve yazdırma işlemleri yapılabilir. Kullanıcı tarafından yazılmış eklentiler üç boyutlu canlı hücre görüntülemeden, radyolojik görüntü işlemeye kadar birçok görüntü işleme ve analiz sorunlarını çözmeyi mümkün kılar (110, 111, 112).

Yazılım kullanıcı tanımlı, alan ve piksel değerleri istatistiklerini hesaplayabilir; uzaklıkları ve açıları ölçebilir. Yoğunluk histogramları ve çizgi profil planları yaratabilir. Günümüzde standart olarak kullanılan kontrast, keskinlik, yumuşatma, kenar belirleme ve medyan filtreleme fonksiyonlarını destekler. Ölçeklendirme, döndürme gibi geometrik dönüşümleri yapabilir. İmajlar 32:1'e 1:32'e kadar yakınlaştırılabilir. Herhangi bir büyütme faktöründe tüm analiz ve işleme fonksiyonları kullanılabilir. Yazılım kullanılan hafıza ile limitli olarak sınırsız sayıda imajı eşzamanlı olarak destekler (111).

Image Java eklentileri ile geliştirilmeye yönelik olarak açık mimari yapıda dizayn edilmiştir. Image içinde bulunan editör ve Java derleyicisi kullanılarak kişisel edinti, analiz ve işleme eklentileri geliştirilebilir. Kullanıcı tarafından yazılan bu eklentiler görüntü işleme ve analiz problemlerini çözülebilir kılmaktadır (113).

Histolojik görüntülerden yola çıkarak ImageJ© programı ile hacim hesaplamalarında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta, kesit kalınlığının da hesaba katılmasıdır. Bu program ile kesitlerden çekilen görüntülerin yüzey alanları hesap edilebilmektedir. Hacim hesap edebilmek için ise alan değerlerinin kesit kalınlığı ile çarpılması gerekir (107).

4.4.3. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesabı

İnsan vücudundaki çeşitli yapı ve organların düzensiz şekillerinin hacim hesaplamaları çözümlenemeyen bazı sorunları da beraberinde getirdi. Örneğin insan beyin korteksi yüzeyinin kıvrımlı olması buna bir örnek teşkil eder. Bu ve buna benzer düzensiz şekle sahip nesnelerin hacmini hesaplamak için birçok yöntem denenmiş ve geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden en önemlisi İtalyan matematikçi Bonoventura

Cavalieri tarafından üç asır önce geliştirildi. Cavalieri, düzenli bir geometrik şekle sahip olmayan üç boyutlu nesnelerin hacimlerinin birbirine paralel dilimlere ayrılarak hesaplanabileceğini ortaya koydu. Daha sonraki yıllarda bu yöntem biyoloji, metalürji ve jeoloji gibi değişik alanlara uyarlandı (105, 107).

Yaklaşık 30 yıl önce stereolojik yöntemlerin yeniden tanımlanması ve bazı yeni tekniklerin geliştirilmesiyle birlikte biyolojik yapılardaki birçok sayısal parametreler tarafsız ve etkin bir şekilde elde edilmeye başlandı. Stereolojik yöntemlerin gelişmesi ve Cavalieri yönteminin stereolojinin temel prensiplerine göre uygulanmaya başlaması ile biyolojik yapılardan hacim verisinin elde edilmesi de çok kolay hale geldi (114). Bugün Stereoloji de en çok kullanılan hacim hesaplama yöntemlerden birisi Cavalieri yöntemidir. Bu yöntem kısaca eşit aralıklı ve paralel dilimlere ayrılmış bir yapının toplam hacmini hesaplama yöntemidir. Bu yöntem ilk olarak 1598'den 1647'ye kadar yaşayan İtalyan matematikçi Cavalieri tarafından geliştirilmesine rağmen (114), Cavalieri prensibinin esas fikir babası ünlü astronom Johannes Kepler'dir. Kepler 'Şarap Fıçılarına Dair Yeni Ölçümler' adlı teorik çalışmada, şarap fıçılarının hacmini hesaplamak için basit bir yol önermiştir. Buna göre fıçılar belli sayıda dilime ayrılıp, bu dilimlerin her birinin hacimlerinin ayrı ayrı hesaplanmasından sonra bu dilim hacimlerinin toplamalarının alınması, fıçının toplam hacim değerini verecektir (Şekil 3). Daha sonra İtalyan matematikçi Cavalieri bu prensibi genelleştirerek, bugün bildiğimiz matematiksel prensibi ortaya koymuştur (105, 107).



Şekil 3. Cavalieri Yöntemine Göre Hacim Hesabı

Cavalieri prensibi ile hacim hesabında sırasıyla aşağıdaki işlemler ve hesaplamalar yapılır.

- Hacmi hesaplanacak yapı birbirine paralel ve eşit aralıklarla başından sonuna kadar dilimlenir.
- Her bir dilimin aynı yöne bakan kesi yüzeylerinin alanları hesaplanır.
- Tüm dilimlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerden kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılır.

Böylece yapının toplam hacmi tarafsız bir hesaplama ile elde edilir. Yapılan hesaplamalar matematiksel bir denklem olarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir (13, 114, 115).

$$(Denklik 1) \quad V_{ref} = \sum a_i \cdot \bar{t}$$

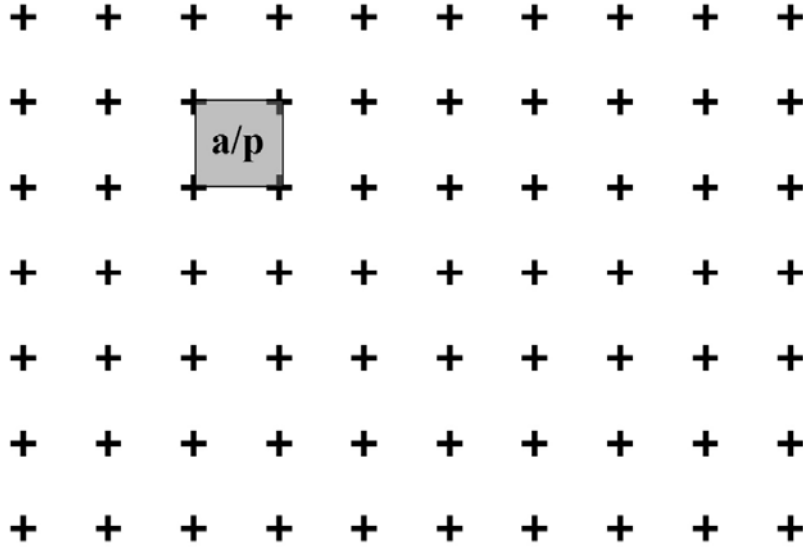
Denklik 1’de V_{ref} : İlgilenilen yapının toplam veya *referans* hacmini; a_i : i numaralı kesitteki yapı izdüşümünün veya izdüşümlerinin toplam yüzey alanını; $\bar{t}$: Ortalama kesit veya dilim kalınlığını ifade etmektedir.

Bu yöntemle, etrafındaki yapılarla ilişkilerine bakılmaksızın makroskobik olarak veya mikroskobik büyütmelelerde sınırları birbirinden ayırt edilebilen her türlü yapının hacmi hesaplanabilir (13, 116, 117).

Cavalieri hacim hesaplama yöntemi mikroskobik kesitler veya makroskobik dilimler üzerinde uygulanabilir. Bu hesaplama için ilk aşama, ilgilenilen bölgenin izdüşümlerinin veya kesitlerdeki görüntülerinin alanlarını hesaplamaktır (13). Noktalı alan ölçüm cetvelleri kullanarak kesit görüntülerinin alanlarını hesaplamak, stereolojide sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (118).

Noktalı alan ölçüm cetveli (Şekil 4) sistematik olarak birbirlerinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan oluşur. Böyle bir cetvelde, artıların kollarının kesişim yeri, cetveldeki bir noktayı temsil eder. Bu noktalardan her biri ise dört adet noktanın

arasında kalan bir birim cetvel alanına karşılık gelir ve bu alan a/p ile gösterilir. Bu şekilde oluşturulan noktalı alan ölçüm cetvelinde her bir nokta arasındaki sabit mesafe bilinmektedir (13, 107, 116).



Şekil 4. Noktalı Alan Ölçüm Cetveli.

Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile alan hesabı yapmak için cetvel, alanı hesaplanacak kesit görüntüsü üzerine rasgele biçimde atılır. Bu uygulama sonucunda yapının kesitteki izdüşümü üzerine isabet eden nokta sayısı, bu izdüşümün kesitte temsil ettiği alan miktarıyla doğru orantılı olacaktır. Başka bir ifadeyle izdüşüm yani kesit görüntüsü ne kadar büyük veya küçükse, kesit görüntüsünün büyüklük veya küçüklüğüne göre nokta sayısı fazla ya da az olacaktır. Bu noktaların her biri belli bir birim alanı (a/p) temsil etmektedir. İlgilenilen kesit görüntüsüne düşen toplam nokta sayısı (ΣP_i) bu birim alan değeriyle çarpıldığında, o kesite ait görüntünün toplam alanının (A_i) tarafsız bir hesabı elde edilir (Denklik 2). Bu şekilde elde edilen alan hesabı uygulamada basit olduğu kadar istatistiksel olarak da güvenilir (13, 105, 107, 116, 118, 119).

$$(Denklik 2) \quad A_i = \Sigma P_i \cdot a / p$$

Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile yapılan alan hesaplamalarında, uygun sıklıkta noktalar içeren cetveller kullanılmalıdır. Uygun sıklıkta noktalar içeren cetveller

kullanıldığında bilgisayar destekli görüntü analiz sistemleriyle yapılan hesaplamalar kadar güvenilir sonuçlar elde etmek mümkündür (12, 116). Bu yöntemin bir diğer avantajı da uygulamadaki kolaylıktır. Genellikle şeffaf bir asetat üzerine çizilmiş, aralarındaki mesafenin bilindiği ve sistematik olarak yerleştirilmiş noktaları temsil eden artılar bu işlem için yeterlidir (13, 105).

Kesitlerde ilgilenilen bölgenin izdüşümlerinin toplam alanını Denklik 2'yi kullanarak hesapladıktan sonra, toplam hacmi elde etmek için, toplam alan değeri denklik 1'de yerine yerleştirilir. Denklik 1'de toplam alan değeri, dilimleri veya kesitleri elde ederken kullandığımız ortalama kesit kalınlığı değeriyle çarpıldığında toplam hacim değeri elde edilir. Bu şekilde yapılan bir çalışmada, yapının toplam hacmi tarafsız ve etkin bir şekilde elde edilmiş olur (105, 119, 120, 121).

4.4.4. Stereoloji Analiz Sisteminde Hacim Hesabı

4.4.4.1. Stereoloji Analiz Sisteminde Cavalieri Yöntemine Göre Hacim Hesabı

Stereoloji analiz sisteminde Cavalieri yöntemine göre hacim hesabında ölçümler ve hesaplamalar, bilgisayar ortamında belirli komutlar verilerek yapılmaktadır. Genel prensip olarak çalışmaya başlamadan önce sistem her gün yeniden kalibre edilerek, sistemin en az hatayla çalışması sağlanmalıdır. Cavalieri yöntemi ile hacim hesabı için, sistematik rastgele örnekleme (SRÖ) ile seçilen kesitlerin her biri mikroskoba yerleştirilerek, hacmi incelenecek bölgeler görüntü alanına getirilir. Daha sonra ölçüm yapılacak alan büyütülerek çalışılacak objektif seçilir ve yazılımdan da seçilen objektif seçilir. Hacmi hesaplanacak alan yazılım aracılığıyla genel hatlarıyla sınırlandırılır. Sınırlandırmanın ardından gerekiyorsa alan, objektif büyütülerek tekrar büyütülür ve alan ölçümünde kullanılacak olan noktalı alan ölçüm cetvelleri yine yazılım aracılığıyla görüntüler üzerine yerleştirilir. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta objektif her değiştiğinde, yazılımdan ilgili objektifi seçmektir (4, 51, 107, 121).

Sistemde noktalı alan cetvelindeki nokta başına düşen birim alan (a/p) değerleri yazılım aracılığıyla otomatik olarak hesaplanmaktadır. Bu aşamada eğer incelenecek

bölgeler çok büyük ise, SRÖ olarak alan örnekleme yapılmalıdır. Bu işlem, yazılımda bulunan “meander sampling” komutu ile istenilen aralık değerleri verilerek otomatik olarak gerçekleştirilebilmektedir. Alan örnekleme için tüm kesitlerde ve hesaplamalarda X ve Y adım alanları sabit olarak uygulanmalıdır. Bu değerler sisteme girildikten sonra adım alanlarından oluşan bir örnekleme ızgarası doku görüntüsü üzerinde sınırlanan bölgeye yazılım tarafından rasgele olarak konuşlandırılır. Alan örnekleme yapıldıktan sonra her bir örnekleme alanında nokta sayım tekniğiyle alan hesaplaması yapılır. Nokta sayım tekniği ile elde edilen sonuçlar, alan örnekleme oranının da (AÖO) hesaba katılmasıyla toplam hacim değerinin hesaplanmasında kullanılır (4, 51, 107, 121).

4.4.4.2. Stereoloji Analiz Sisteminde Alan Hesabı Yöntemine Göre Hacim Hesabı

Stereoloji analiz sisteminde Cavalieri yönteminin temel prensipleri kullanılarak alan hesabı yöntemine göre de hacim hesaplaması yapılabilir. bu yöntemde de ölçümler ve hesaplamalar, yine bilgisayar ortamında belirli komutlar verilerek yapılmaktadır. Burada da genel prensip olarak çalışmaya başlamadan önce sistem her gün yeniden kalibre edilerek, sistemin en az hatayla çalışması sağlanmalıdır. Bu yöntem ile hacim hesabı için, SRÖ ile seçilen kesitlerin her biri mikroskoba yerleştirilerek hacmi incelenecek bölgeler görüntü alanına getirilir. Hacmi incelenecek alanın etrafı bilgisayar ortamında çizilir. Alanın tamamı çizildiğinde sistem otomatik olarak, çevrilen alanı μm^2 olarak alan değerini vermektedir. Bir hayvana ait kesitlerin tamamının alanı aynı şekilde çizildiğinde ve tüm alanlar toplandığında, örneklenen kesitlerin tamamının alanı belirlenmiş olur.

Bu aşamadan sonra alan hesabı yapılan kesitlerin kalınlıkları da yine örneklenen kesitler üzerinde belirlenerek ortalamaları alınır ve böylece ortalama bir kesit kalınlığı bulunur. Daha sonra örneklenen kesit alanları ile ortalama kesit kalınlığı çarpılarak, örneklenen kesitlerin hacmi bulunur. Bulunan hacim örnekleme oranı ile çarpılarak bir bireydeki toplam hacim hesaplanabilir. Bu yöntem kısaca aşağıdaki formülle hesap edilebilir.

$$V_{top} = \sum a_i \cdot \bar{t} \cdot 1 / K\ddot{O}O$$

Burada V_{top} , bir bireydeki toplam hacmi; $\sum a_i$ örneklenen kesitlerde hesaplanan toplam alan; $\bar{t}$, örneklenen kesit kalınlıklarının ortalaması; KÖO; kesit örnekleme oranını ifade etmektedir.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1.1. Hayvanların Temini

Çalışmanın deneysel bölümü Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırmalar Merkezi'nde (KTÜ CAM), histolojik çalışmalar ise Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce KTÜ Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 26.10.2010 tarihinde Etik Kurul onayı alındı. Çalışma süresince deney hayvanları çalışma etiğine uyuldu. Çalışma için KTÜ CAM'dan temin edilen toplam 24 adet 16 haftalık Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı.

5.1.2. Hayvanların Bakımı ve Takibi

Çalışma süresince sıçanların takibi için KTÜ CAM'da sıçanların barınabileceği takip odası hazırlandı. Hayvanların bakımı ve uygun fiziki ortamların hazırlanması için KTÜ CAM'da görevli veteriner ve teknikerden yardım alındı. Tüm çalışma süresince sıçanlar, altı plastik ve talaşla kaplı, üstü tel olan özel kafeslerde izlendi. Bu kafesler çalışmada her grup sıçan için, her birinin içinde ayrı yemlik ve suluk bulunan ayrı bölmeler şeklinde hazırlandı (Şekil 5). Hayvanların tamamı çalışma süresince 22 ± 2 oda ısısında, 50 ± 5 nem oranında, 12 saatlik aydınlık-karanlık siklusu bulunan bir ortamda, çalışma süresi boyunca her 2–3 saatte bir ısı, yem, su ve ışık kontrolleri yapılarak takip edildi.

5.1.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmanın başlangıcında sıçanların, her biri 6 sıçandan oluşan 4 gruba ayrıldı. Birinci grup sıçanlara hiçbir işlem uygulanmadı. İkinci ve üçüncü gruba 30 dakika süreyle, sağ ve sol arteria karotis communis klemplenerek beyin iskemisi uygulandı. Üçüncü grup sıçanlara iskemi yapıldığı günden itibaren ondört gün boyunca ağız yoluyla her gün aynı saatte GB kuru ekstresini içeren damla (Tebokan Fort Damla, Abdi

İbrahim İlaç Sanayi ve Tic A.Ş. İstanbul, Türkiye) (100mg/kg) verildi. Bu girişim için gavaj iğnesi kullanıldı. Sıçan ense ve boyun derisinden tutuldu. Baş enseye doru çekilerek ekstansiyona getirildi. Dişler arasından gavaj iğnesi geçirildi. Özofagusa ve mideye girişini kolaylaştırmak için iğne hafifçe döndürülerek dil üzerinden itildi. Farinkse temas ettiğinde yutma refleksi nedeniyle gavaj iğnesi özofagusa girdi ve böylece GB içeren damla kolaylıkla mideye verildi (Şekil 6). Dördüncü grup sıçanlara ise sadece cilt kesisi yapıldı iskemi uygulanmadı (Tablo 1).



Şekil 5. Sıçan Barınma Kafesi

5.1.4. Cerrahi Girişim ve Sıçanların Takibi

Deney hayvanlarına ketamin 90 mg/kg (Ketalar® 50 mg Ampul, Pfrizer) ve ksilazin 10 mg/kg (Xylazin hydrochloride®, Rompun-Bayer) karışımı intraperitoneal olarak uygulanarak genel anestezi sağlandı. Ön boyun bölgesindeki tüyler traş edildi ve batikonla temizlendi. Sıçanlar cerrahi girişim tahtasına sırtüstü pozisyonda ve kafaları ekstansiyonda olacak şekilde yatırıldı. Boyun ön bölgesi, orta hattın yaklaşık 2 cm'lik vertikal insizyonla açıldı. Deri dikkatlice iki yana açıldı, sağ ve sol arteria karotis communise ulaşıldı. Daha sonra II. ve III. grupların her iki damarları birden anevrizma klemp (Yaşargil Anevrizma Klemp, BAO45) kullanılarak kapatıldı (Şekil 6). Böylece

planlanan süre (30 dakika) boyunca kan akımı kesilerek iskemi uygulandı. Süre bitiminde klempler çıkarılarak organların pozisyonu kontrol edilip insizyon bölgesi dikildi (Şekil 6). IV. grup sıçanlar yine genel anestezi altına alınarak boyun bölgesi açıldı ve hiçbir işlem yapılmadan insizyon bölgeleri dikildi. I. grup sıçanlara ise hiçbir cerrahi müdahale yapılmadı.

Tablo 1. Çalışma Grupları ve Özellikleri

Gruplar (n=6)	Grupların Özellikleri ve Yapılan Müdahaleler
I (Kontrol)	Herhangi bir müdahale yapılmayan kontrol grubu sıçanlar
II (İskemi)	30 dk iskemi uygulanan sıçanlar
III (İskemi+GB)	30 dk iskemi uygulanan ve iskemi sonrası 14 gün boyunca Ginkgo Biloba uygulanan sıçanlar
IV (Sham)	Sadece boynuna kesi yapıp dikilen sham grubu sıçanlar



Şekil 6. (A); Arteria Karotis Communisin Anevrizma Klempi ile Kapatılması (B); İnsizyon Bölgesinin Dikilmesi (C); Gavaj İğnesi ile Mideye Ginkgo Biloba Verilmesi

5.2. Histolojik İşlemler

5.2.1. Dokuların Elde Edilmesi

Çalışma sırasında gruplardan III. Gruba ait bir sıçan ilacı aspire etmesi sonucu öldü. Diğer sıçanlar 14. günde perfüze edilerek beyin dokuları çıkarıldı. Bu amaç için öncelikle sıçanlar ketamin 90 mg/kg ve ksilazin 10 mg/kg karışımı intraperitoneal olarak uygulanarak genel anestezi sağlandı. Beyin ve beyincik kemik makası (guj) kullanılarak çıkarıldı. Beyin ve beyincik kesilerek birbirinden ayrıldı, dokular numaralandırılarak kodlandı ve formaldehit içerisinde on gün süre ile tespit işlemine tabii tutuldu (122).

5.2.2. Doku Takibi

Tespit işleminden sonra dokular sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabii tutuldular.

1. Akar suda yıkama..... 1 gece
2. % 70'lik Alkol..... 1 gece
3. % 80'lik Alkol..... 1 saat
4. % 96'lık Alkol..... 1 saat
5. % 96'lık Alkol..... 1 saat
6. % 100'lük Alkol..... 1 saat
7. % 100'lük Alkol..... 1 saat
8. Ksilen..... ½ saat
9. Ksilen..... ½ saat
10. Erimiş Parafin..... 1 gece (oda sıcaklığı)
11. Parafin..... 2 saat (60 °C)
12. Parafin..... 3 saat (60 °C)
13. Bloklama

5.2.3. Kesitlerin Alınması

Çalışmanın bu aşamasında stereolojinin temel prensiplerine göre hareket edildi. Bu tip çalışmalarda kesit kalınlığı ve kesit örnekleme oranı önemli olduğundan, çalışma gruplarına ait kesitleri almaya başlamadan önce konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendi ve sunulan çalışmada kullanılacak kesit kalınlığı ve kesit örnekleme oranı tespit edildi. Yapılan literatür taraması sonucunda benzer çalışmalarda 1/10 oranında örnekleme yapıldığı ve 26–40 µm (mikrometre) kalınlığında kesitlerin kullanıldığı tespit edildi (4, 51, 121). Bu nedenle çalışmada 1/10 oranında örnekleme yapılarak 30 µm kalınlığında kesitlerin alınmasına karar verildi. Çalışma gruplarına ait kesitlerin elde edilmesi amacıyla, parafine gömülerek bloklanan beyinler sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutuldu.

- Çalışma için kesit alınmaya başlamadan önce üzerlerine kesit alınacak lamaların üzerlerine özel bir yapıştırıcı olan %10 luk jelâtin (100 ml saf suda 10gr jelâtinin çözündürülmesi ile elde edildi) ve %10'luk formaldehitin bire bir karıştırılarak hazırlanması ile elde edilen sıvı sürüldü. Üzeri yapıştırıcı ile kaplanan lamalar 1 saat süreyle 37 °C deki etüvde kurutuldu. Lamaların bu şekilde hazırlanması her kesit alınmasından önce tekrarlandı (121).

- Bloklar kesit elde etmek amacıyla, mikrotom (LEICA RM 2255) kullanılarak 30 µm kalınlığında kesildi.

- 1/10 oranında örnekleme ile elde edilen kesitler benmari içindeki 45-50⁰C'deki su üzerine bırakıldı ve düzleşmeleri sağlandı. Bu örnekleme sonucunda her bir hayvandan ortalama 40 kesit elde edildi.

- Önceden hazırlanmış lamalar üzerine kesitler alındı.

- Lam üzerindeki kesitlerin üzerlerine fırça ucu ile hafifçe bastırılarak kesitlerin altında hava ve suyun kalmaması sağlandı. Lamalar, zembillere yerleştirildi.

- Lam üzerindeki kesitlerin kurummasına izin vermeden kesitlerin lama daha iyi yapışmalarını sağlamak için zembiller, içinde 1:1 oranında 10–12 ml. su ve formol karışımı bulunan geniş şalelere yerleştirildi.

- Şalelerin kapakları kapatılarak 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi.

- Lamalar içinde bir miktar su bulunan cam şalelere alınıp parafinleri eriyinceye kadar 60 °C'lik etüvde tekrar bekletildi. Böylece lamlara kuvvetli bir biçimde yapışan kesitler boyanmaya hazır hale getirildi.

5.2.4. Kesitlerin Boyanması

Çalışma gruplarına ait kesitler alındıktan sonra boyama işlemine geçildi. Kesitler % 0,1'lik cresyl fast violet ile boyandı. Kesitlerin boyanması sırasında kullanılan boya ve solüsyonlar aşağıdaki şekilde hazırlandı (122).

% 0,1'lik cresyl fast violet: 1000 ml distile su + 0,1 gr cresyl fast violet + 15 damla %10 luk glacial asetik asit.

Cresyl fast violet ayrıştırıcısı: 60 ml kloroform + 44 ml % 96'lık alkol + 9 damla %10 luk glacial asetik asit.

% 0,1'lik cresyl fast violet, cresyl fast violet ayrıştırıcısı ve dereceli alkoller hazırlandıktan sonra kesitlerinin boyanması için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

1. Ksilen	30 dakika (4 X 7.5 dk.)
2. % 99,5'luk Alkol	10 dakika
3. % 96'luk Alkol	10 dakika
4. % 80'lik Alkol	10 dakika
5. % 70'lik Alkol	10 dakika
6. Distile Su	10 dakika
7. Cresyl Fast Violet	60 °C'de etüv içerisindeki boyada kesitin alt tabakaları boyanana kadar (yeni hazırlanan boyada yaklaşık 10 dakika)
8. Distile Su	1-2 dakika
9. % 96'luk Alkol	Boyanın çoğu uzaklaşınca kadar (8-10 dakika)
10. Cresyl Fast Violet Ayrıştırıcısı	Çekirdek ve Nissl farklılaşması sağlanıncaya kadar.
11. % 96'luk Alkol	5 dakika
12. % 99,5'luk Alkol	10 dakika
13. Ksilen	10 dakika
14. Ksilen	1 saat
15. Entellan® (SIGMA) ile kapama	

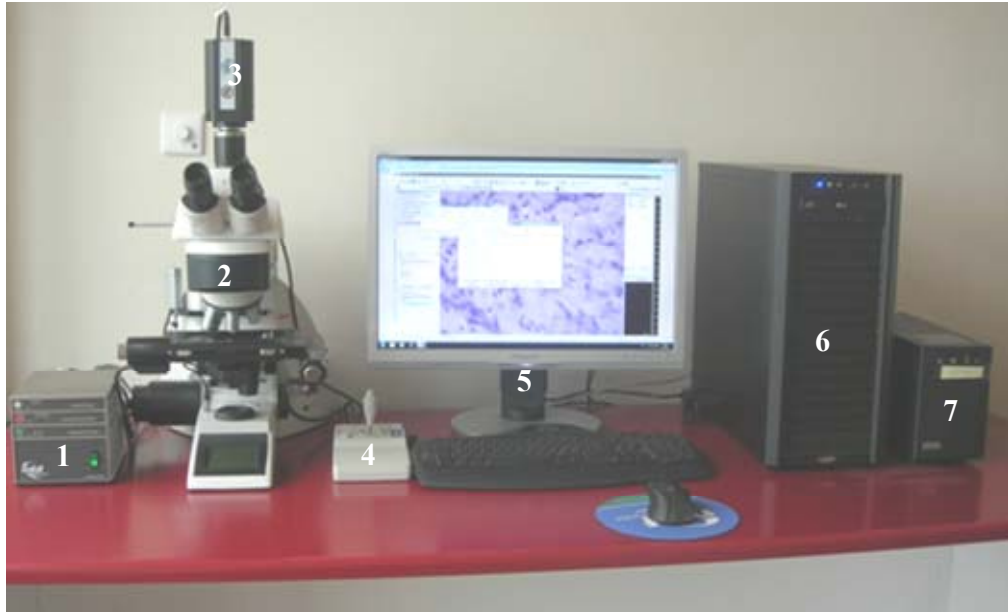
5.3. Analizler

Deney ve kontrol gruplarına ait sıçanların toplam beyin hacimleri, alan hesabı yöntemine göre hacim hesaplaması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan stereoloji analiz sisteminde elde edildi.

5.3.1. Stereoloji Analiz Sistemi

KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan stereoloji analiz sistemi Leica firmasının ürettiği olan stereoloji

analiz yazılımı ve donanımını içermektedir. Sistem, MicroBrightField (ABD) firmasının stereolojik araştırmalar için tasarlanmış stereoloji analiz yazılımı (Stereo Investigator 9, Computer Assisted Stereological Toolbox-Leica) içeren bir bilgisayar (Pentium PC, DELL OptiPlex, USA), araştırma mikroskobu (Leica, DM4000B-M, Germany), CCD kamera (JVC, Japan), Z ekseninde ölçüm yapan ölçüm çubuğu (Heidenhain LIP401 R, Germany), mikrakator göstergesi (Heidenhain ND 221 B, Germany), PC tarafından kontrol edilerek mikroskop tablasının *X* ve *Y* eksenlerinde hareketini bilgisayar kontrollü olarak yönetebilen bir tabla motorundan (Prior ProScan, USA) ve bir adet tabla kontrol çubuğundan (Prior, USA) ve bir adet güç kaynağından oluşmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7. Stereoloji Analiz Sistemi. (1) Kontrol Ünitesi, (2) Mikroskop, (3) Kamera, (4) Otomatik Tabla, (5) Monitor, (6) Bilgisayar Kasası, (7) Güç kaynağı.

Stereolojik çalışmalar birçok laboratuarda ışık mikroskobuna monte edilebilen basit araç ve gereçlerle yapılabilmektedir. Ancak bilgisayar destekli stereoloji analiz sistemleri ve yazılımlar sağladıkları hız ve nispeten yüksek güvenilirlik sebebiyle, stereoloji araştırmalarının yürütüldüğü merkezlerde gittikçe yaygın hale gelmektedir. Stereolojik analiz sistemlerinde çalışılan yapının sınırlarının ve alanının belirlenmesi, rasgele bir alan örnekleme yapılmaması, adımların sırayla taranarak sayımların

gerçekleştirilmesi kolaylıkla gerçekleştirilebilmektedir (4, 51, 121).

5.3.2. Analizlerin Detayları

Çalışma süresince stereoloji analiz sistemi her gün yeniden kalibre edilerek, sistemin en az hatayla çalışması sağlandı. Alan hesabı yöntemi ile hacim hesabı için, daha önce SRÖ ile seçilen her 10 kesitten biri (KÖO: 1/10) incelendi ve alan hesaplaması yapıldı.

Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı.

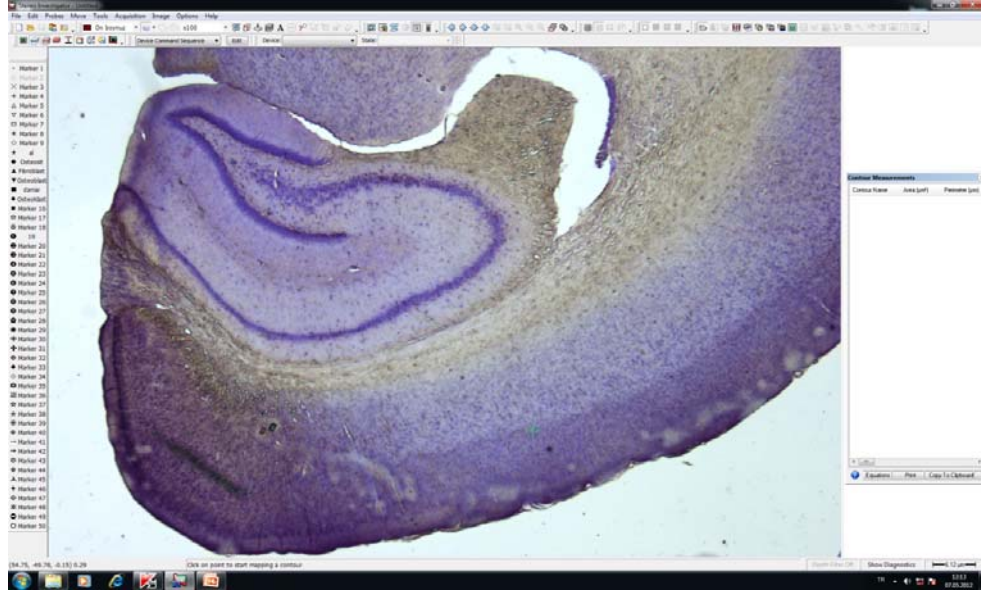
- KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan stereoloji analiz sisteminde bulunan Stereoinvestigatör programı açıldı. Beyin alanı hesaplanacak kesit mikroskoba yerleştirildi. Mikroskoptaki alan hesabı yapılırken kullanılacak objektife (X2,5) kullanılarak alan bulundu ve görüntü makrovida ve mikrovida yardımıyla netleştirildi (Şekil 8).

- Alanı ölçmek için fare dokunun üzerindeyken sağ tuşa basıldı ve çıkan menüden Continuous Talking programı seçilerek alanı hesaplanacak bölgenin tamamının etrafı çizildi (Şekil 9).

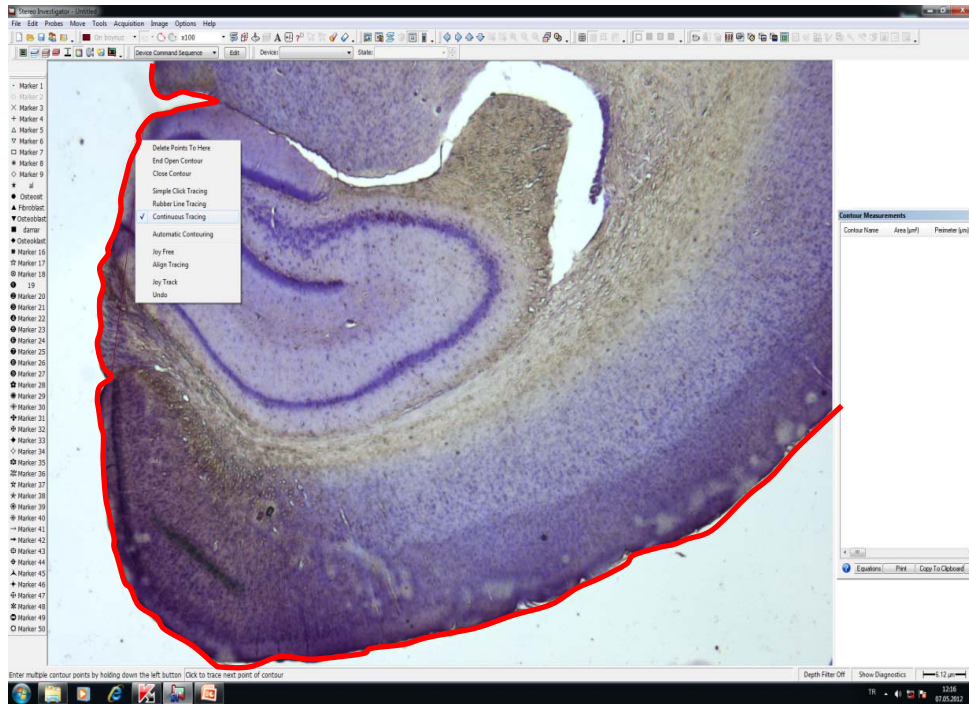
- Çizim bittiğinde yine fare'nin sağ tuşuna basıldı ve çıkan menüden Close Contour tıklanarak alan hesaplandı. Örneklenen her bir kesit için aynı şekilde alan hesaplandı. Tüm kesitlerdeki alanlar toplanarak, örneklenen kesitlerdeki toplam alan belirlendi (Şekil 10, 11).

- Daha sonra örneklenen kesitlerin kalınlığının ölçümüne geçildi. Kalınlık ölçerken hem sistemdeki ve hem de mikroskoptaki objektif büyütmesi X100'e getirildi, immersiyon yağı damlatılarak görüntünün netliği sağlandı. Görüntünün netliği sağlandığında burası kesitin üst yüzeyi olarak belirlendi ve bu aşamada mikrokatorun belirlediği değer bir yere kaydedildi. Daha sonra üst yüzeyden alt yüzeye doğru mikrovida yardımıyla ilerlendi. Netlik kaybolduğunda burası kesitin alt sınırına olarak kabul edildi ve yine bu aşamada mikrokatorün gösterdiği değer kaydedildi. Her iki

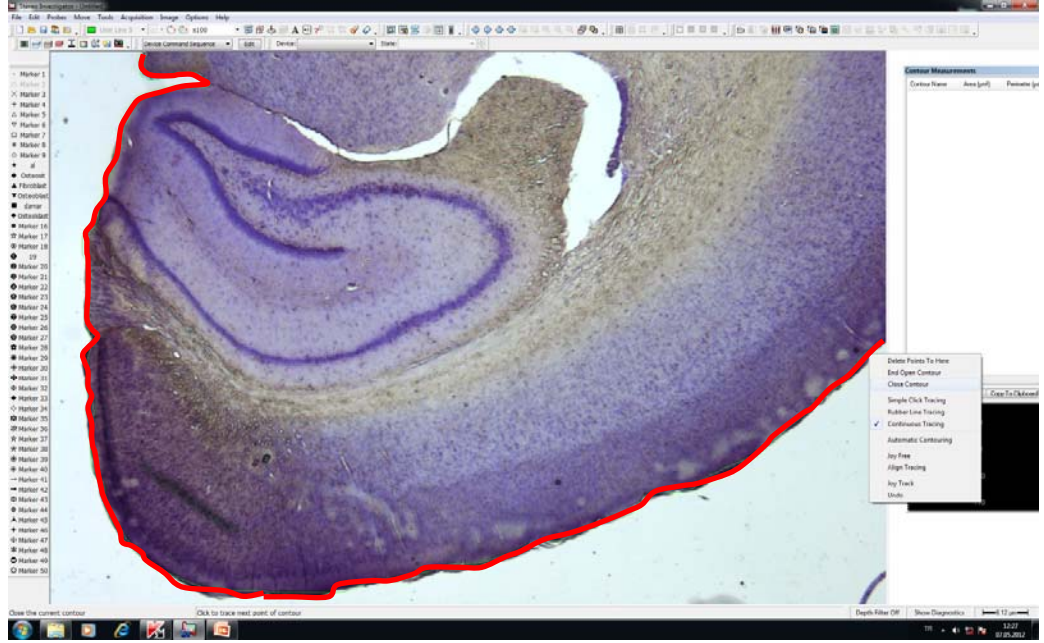
değer arasındaki fark bulunarak kesit kalınlığı elde edildi. Bu şekilde örneklenen kesitlerdeki kalınlıklar bulundu, ortalamaları alındı ve böylece o bireye ait kesitlerdeki ortalama kalınlık belirlendi (Şekil 12, 13).



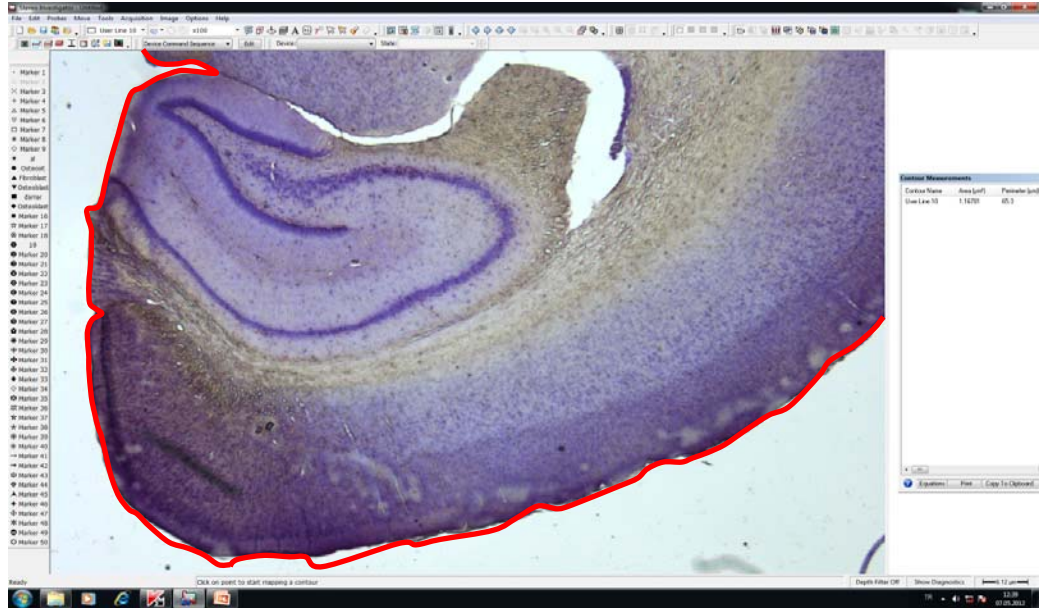
Şekil 8. Stereoinvestigator Programında Alan Netliğinin Sağlanması



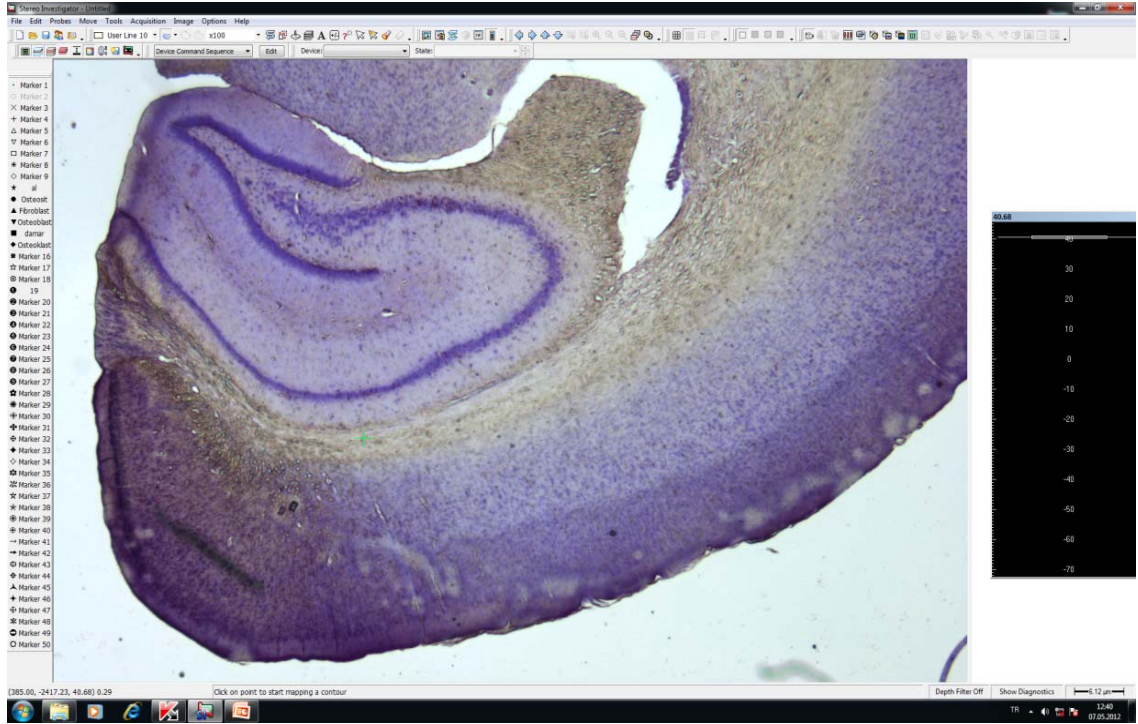
Şekil 9. Stereoinvestigator Programında Alanı Hesaplanacak Bölgenin Etrafının Çevrelenmesi



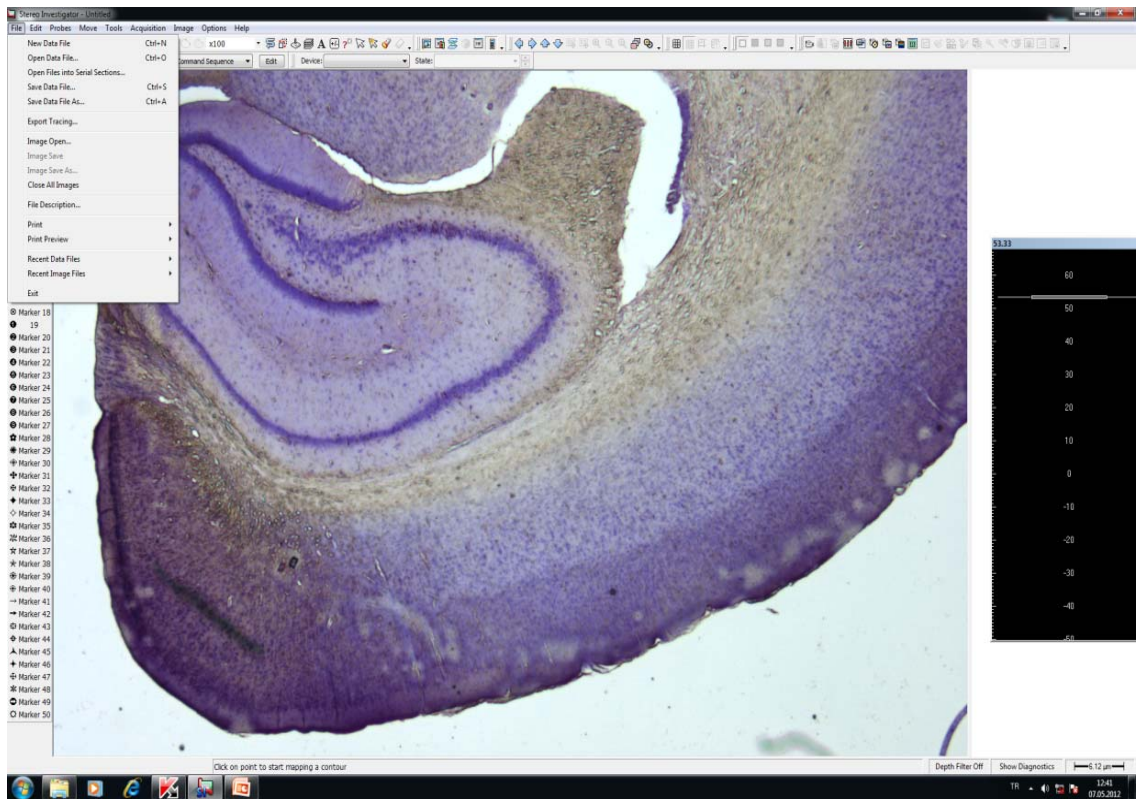
Şekil 10. Stereoinvestigatör Programında Alanın Hesaplanması



Şekil 11. Stereoinvestigatör Programında Etrafı Çevrelenen Alan Otomatik Olarak Hesaplanmaktadır



Şekil 12. Stereoinvestigatör Programında Mikrokatör Yardımıyla Üst Yüzeyin Belirlenmesi



Şekil 13. Stereoinvestigatör Programında Mikrokatör Yardımıyla Alt Yüzeyin Belirlenmesi

Stereoinvestigatör programında gerçekleştirilen tüm bu aşamalardan sonra aşağıdaki formül kullanılarak bir sıçandaki toplam beyin hacmi hesaplandı. Kısaca özetleyecek olursak burada örneklenen kesit alanların toplamı ile ortalama kesit kalınlığı çarpıldı ve örneklenen kesitlerin hacmi bulunur. Bulunan hacim, örnekleme oranı ile çarpılarak bir sıçandaki toplam beyin hacmi hesaplandı.

$$V_{top} = \sum a_i \cdot \bar{t} \cdot 1 / KÖO$$

Daha öncede ifade edildiği üzere burada V_{top} , bir bireydeki toplam hacmi; $\sum a_i$ örneklenen kesitlerde hesaplanan toplam alanı; $\bar{t}$, örneklenen kesit kalınlıklarının ortalamasını; KÖO; kesit örnekleme oranını ifade etmektedir. Bizim çalışmamızdaki KÖO = 1/10 olarak belirlenmiştir.

5.4. Verilerin Analizi

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) ve STATISTICA 7 programlarından yararlanılmıştır. Çalışma gruplarındaki sıçanların ağırlıkları, ANOVA (t testi) Tukey ile değerlendirilmiştir. Çalışma grupları Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tüm karşılaştırmalarda $p < 0,05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Sıçanların Davranış Yönünden Değerlendirilmesi

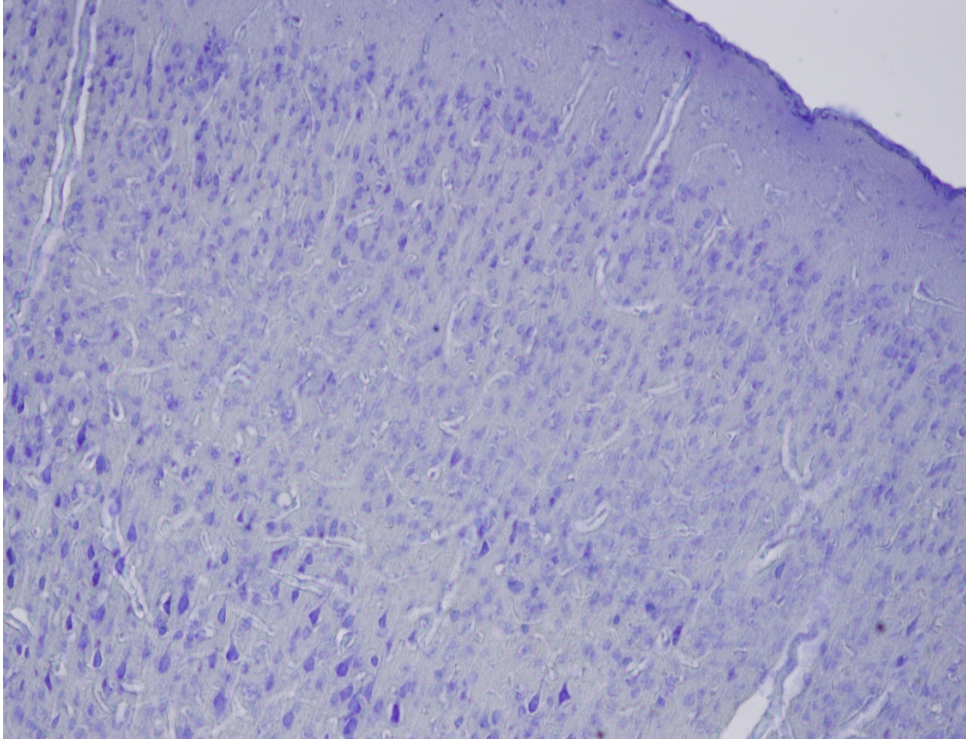
Cerrahi müdahale sonrasında davranış yönünden değerlendirilmeye başlanan sıçanlar anestezinin etkisinden 1 saat sonra çıktı ve ilk 3-4 saat boyunca hiç bir şey yiyip içmediler. Sıçanların daha sonraki saatlerde yeme ve içme davranışları normale dönmeye başladı. İlk 3 gün vücut ağırlığında azalma görüldü ve daha sonraki günlerde vücut ağırlığı tekrar artmaya başladı. Özellikle ilk 3 gün boyunca sıçanlarda işlemler sırasında aşırı sinirlilik ve saldırganlık davranışlar olduğu gözlemlendi. İlk günlerde görülen belirtiler dışında 14 gün boyunca sıçanlarda herhangi bir anormal davranış tepki veya beslenme bozukluğu görülmedi.

6.2. Beyin Nöronlarının Morfolojik Değerlendirilmesi

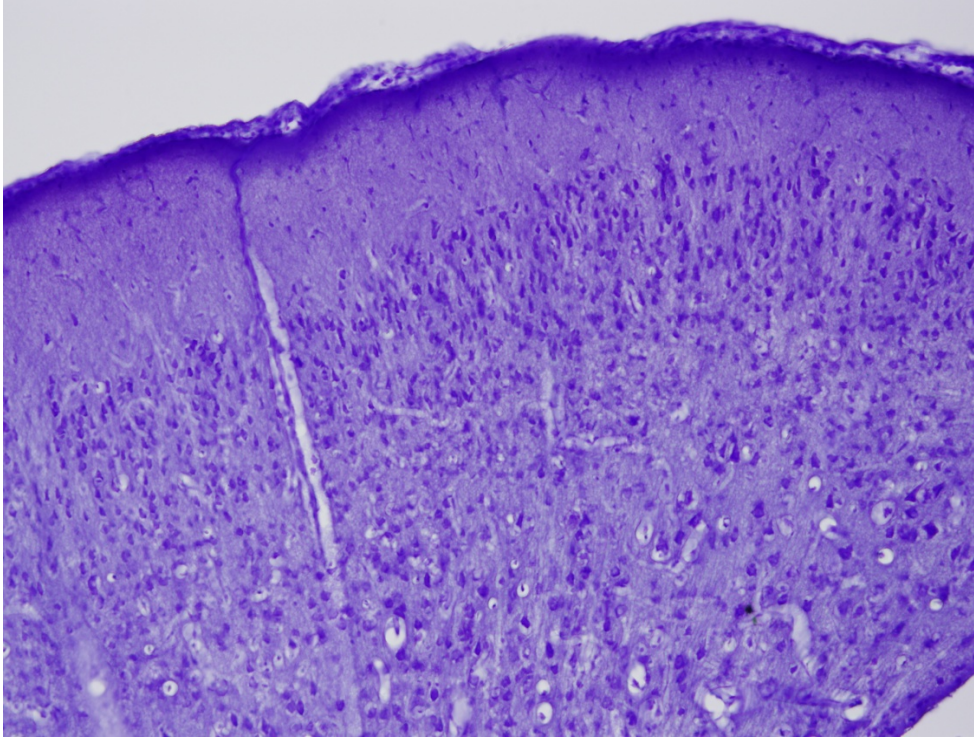
Sıçanların beyin nöronları morfolojik olarak değerlendirildiğinde I., II., III. ve IV. Gruplardaki sıçanlara ait nöronlar arasında belirgin bir morfolojik farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil. 14, 15, 16, 17).

6.3. Sıçanların Vücut Ağırlık Bulguları

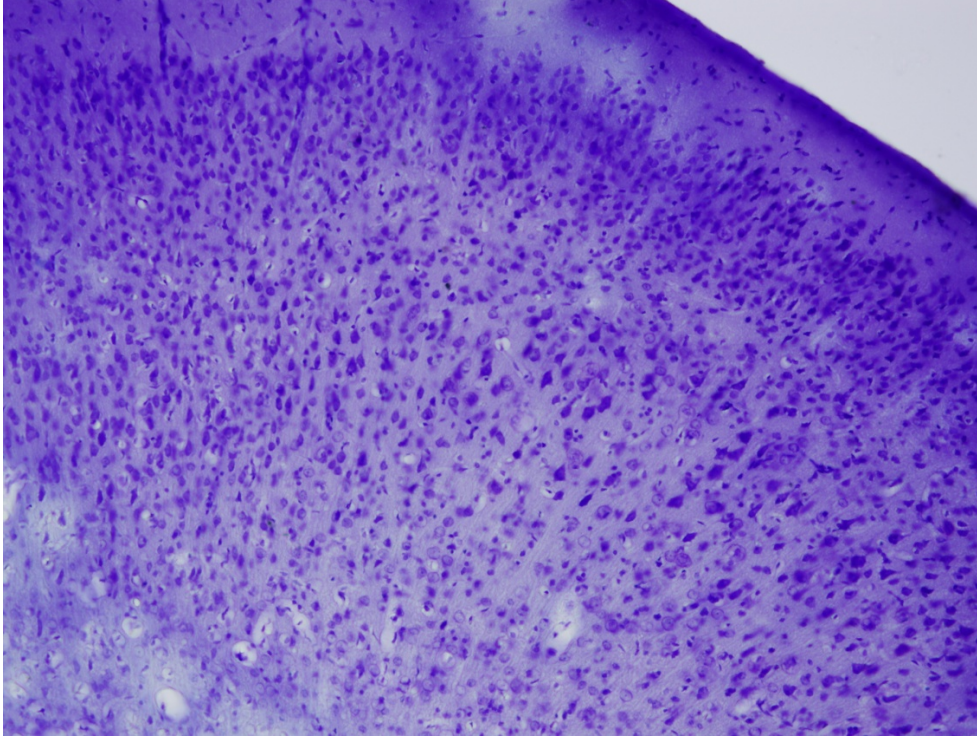
Çalışma öncesi ve sonrası grupların ağırlıklarına ait veriler Tablo 2’de verilmiş ve her bir gruba ait sıçan ağırlıklarının dağılımı Şekil 18’de gösterilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, çalışma öncesinde ANOVA (t testi) ile tüm gruplarda kullanılan sıçanların birbirine benzer olduğu ve Tukey testi ile de gruplar arasında farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde sıçanlar çalışma sonunda da ağırlıkları bakımından değerlendirilmiş ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür.



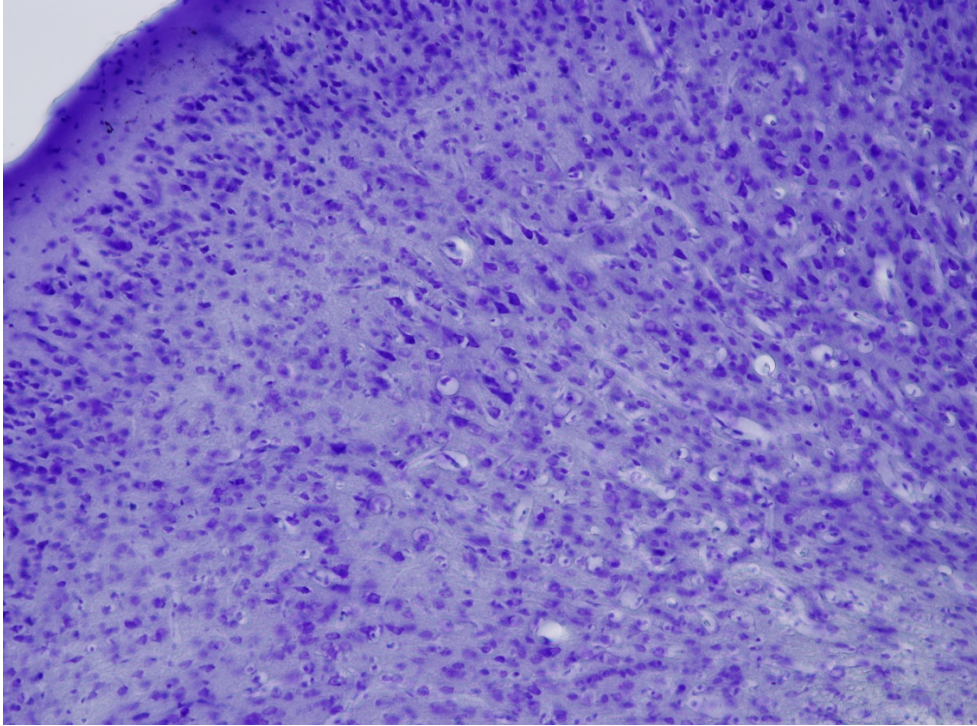
Şekil 14. Kontrol Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).



Şekil 15. Sham Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).



Şekil 16. İskemi Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).



Şekil 17. İskemi+GB Grubuna ait Sıçan Beyninin Morfolojik Görüntüsü (X20), (Cresyl Fast Violet).

Tablo 2. Çalışma Öncesi ve Sonrasında Grupların Ağırlık Ortalamalarının Karşılaştırılması Dağılımı (SS= Standart sapma)

Ortalama Ağırlık (gr) $\pm$ SS			
Grup No	Çalışma öncesi	Grup No	Çalışma sonrası
1 (n=6)	227,00 $\pm$ 19,49	1 (n=6)	241,83 $\pm$ 20,10
2 (n=6)	245,67 $\pm$ 36,33	2 (n=6)	240,33 $\pm$ 31,05
3 (n=6)	236,40 $\pm$ 20,23	3 (n=5)	226,00 $\pm$ 21,65
4 (n=6)	225,00 $\pm$ 38,34	4 (n=6)	235,67 $\pm$ 37,31
Grup ortalaması	233,39 $\pm$ 29,47		236,39 $\pm$ 27,38

6.4. Beyin Hacmi Bulguları

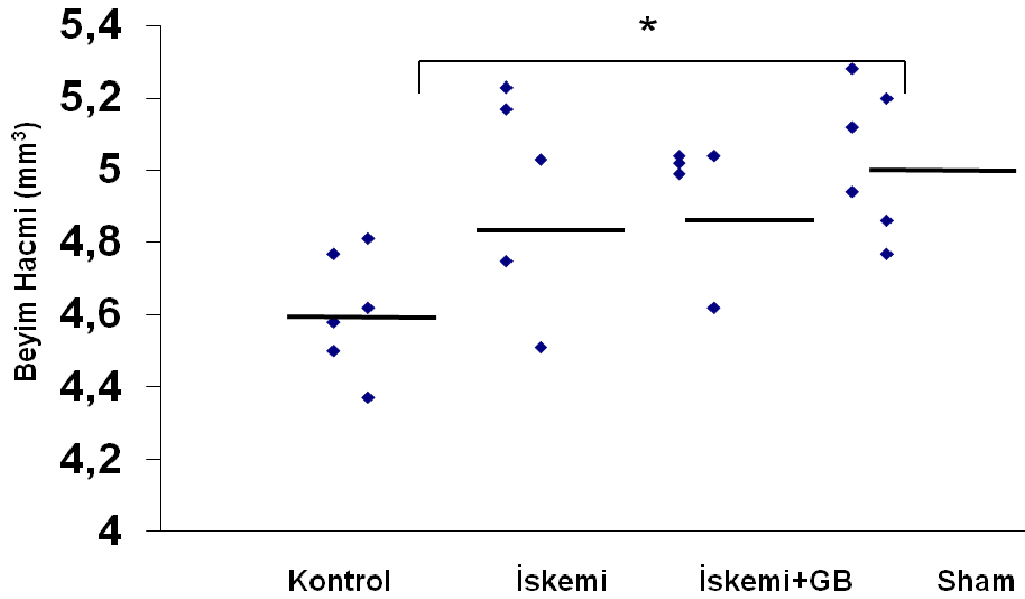
Sıçan beyin hacimleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu, iskemi grubu, iskemi+GB grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı yalnız kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir farklılığın olduğu saptandı ($p=0,009$).

Kontrol grubu, iskemi grubu, iskemi+GB grubu ve sham grubu hacim değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında aşağıdaki veriler elde edildi (Şekil 18).

- Kontrol ile iskemi gruplarındaki sıçanlar beyin hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında iskemi grubundaki sıçanların beyin hacim değerlerinde artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p=0,126$).
- Kontrol ile iskemi+GB gruplarındaki sıçanlar beyin hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında iskemi+GB grubundaki sıçanların beyin hacim değerlerinde artış olduğu fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p=0,170$).
- Kontrol ve sham gruplarındaki sıçanlar beyin hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında sham grubundaki sıçanların beyin hacim değerlerinde artış

olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,009$).

- İskemi ve sham gruplarındaki sıçanlar beyin hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında, sham grubundaki sıçanların beyin hacim değerinde artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p=0,662$).
- İskemi ve iskemi+GB gruplarındaki sıçanlar beyin hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında, iskemi+GB grubundaki sıçanların beyin hacim değerlerinde artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görüldü ($p=0,841$).
- Sham ve iskemi+GB grupları hacim değerleri bakımından karşılaştırıldığında, sham grubundaki sıçanların beyin hacim değerlerinde artış olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür ($p=0,584$).



Şekil 18. Tüm Grupların Hacim Değerlerinin Dağılımı

Tablo 3. Çalışma Gruplarına ait Her Bir Sıçanın Hacim Hesaplamasında Kullanılan Kesit Sayısı ve Ortalama Hacim Değerleri (OHD) (SS=Standart Sapma)

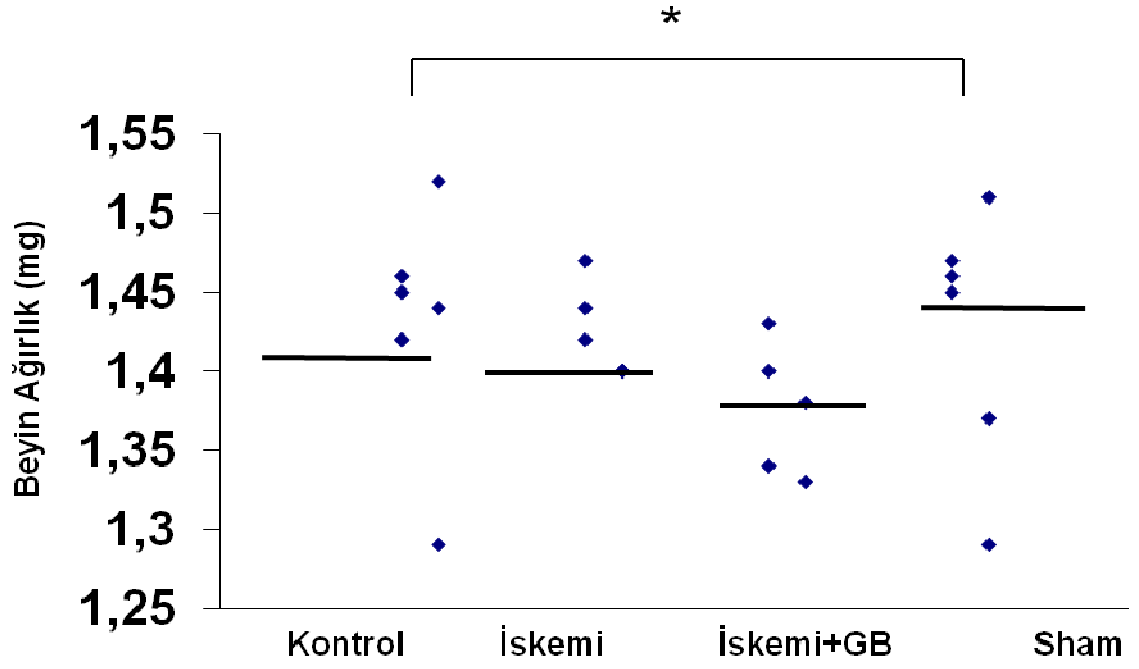
Gruplar	Hayvan No	Kesit Sayısı	Hacim (mm ³)	OHD±SS
Kontrol	1	41	4,5789	4,6061±0,1643
	2	47	4,4992	
	3	40	4,7691	
	4	41	4,3685	
	5	44	4,6154	
	6	46	4,8055	
İskemi	1	48	4,7538	4,9393±0,3043
	2	46	5,2330	
	3	45	5,1724	
	4	43	4,5067	
	5	41	5,0305	
	6	44	5,1401	
İskemi+GB	1	44	5,1401	4,9403±0,1805
	2	44	5,0172	
	3	43	4,9850	
	4	45	5,0395	
	5	41	4,6199	
	6	44	5,1401	
Sham	1	49	4,9378	5,0273±0,2046
	2	44	5,2835	
	3	46	5,1193	
	4	45	4,8564	
	5	41	5,2004	
	6	44	4,7665	

6.5. Beyin Ağırlık Bulguları

Sıçan beyin ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu, iskemi grubu, iskemi+GB ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4) (Şekil 19).

Tablo 4. Tüm Grupların Beyin Ağırlıkları Ortalamaları (SS=Standart Sapma)

Grup Adı	Beyin Ağırlık (mg)
Ortalama	
Kontrol (n=6)	1,4307± 0,07700
İskemi (n=5)	1,4045± 0,05582
İskemi+GB (n=5)	1,3766± 0,04233
Sham (n=6)	1,4260± 0,07901



Şekil 19. Tüm Grupların Beyin Ağırlıklarının Dağılımı

7. TARTIşMA

Beyin iskemisi, geniş bir nörolojik bozukluk spektrumu içinde hem çocukluk hem de erişkin dönemde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Beyin iskemisinde çeşitli etyolojik nedenlerle beyin kan akımının azalması veya tam olarak durması sonucu oksijen, ATP ve glukoz gibi enerji kaynaklarının tükenmesi ile başlayan ve nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan bir dizi olaylar zinciridir (39).

Beyin iskemisi patofizyolojisinde yer alan eksitoksisite, aşırı kalsiyum yüklenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi mekanizmalar birbirleriyle karmaşı içersindedirler. Bu nedenle iske mi sonrası reperfüzyon sonucu ortaya çıkan hasar oluşumunu engellemek ve oluşan hasarın ortadan kaldırılması amacıyla kalsiyum kanal blokerleri, serbest radikal gidericileri, antiödem tedavi ve glutamat reseptör antagonistleri gibi pek çok etken kullanılmıştır (3, 60, 123, 124, 125, ,126, 127).

Beyin iskemisi sırasında hücre kaybına neden olan mekanizmalar hala tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte son 20 yıldır bu konuda büyük ilerlemeler de kaydedilmiştir (128, 129, 130). Beyin iske mi modeli ile yapılan çalışmalarda histopatolojik olarak nöronlarda belirgin büzülmeler, hücre ve çekirdek sınırlarında düzensizlikler, perinöral ve perikapiller ödem saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda özellikle beyin korteksi ve hipokampusda nöron sayısının azaldığı ve iske miye bağlı infarkt alanları gözlenmiştir (131, 132, 133, 134).

GB'nin nöronlarda iske mi reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkisi olduğunu gösteren birçok çalışma vardır. Yapılan çalışmalarda GB'nin süperoksid dismutaz aktivitesi, peroksid radikal temizleyicisi ve superoksid anyonlarını ortadan kaldırarak ve nitrik oksid oluşumunu inhibe ederek antioksidan etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Kan akımını arttırarak beyin iskemisinde kortikal infarkt hacmini azalttıkları da saptanmıştır (101, 135, 136, 137).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar terpen laktonlarının trombosit aktive edici faktörünün membran reseptörüne bağlanmasını engellediği gösterilmiştir (93). Yapılan çalışmalar, GB'nin polimorfonükleer hücrelerde azalan süperoksit salınımı ile sonuçlanan gama radyasyonla uyarılmış tavşanlarda antioksidan özelliği olduğunu göstermektedir. Bu nedenle GB'nin hipoksik hasara karşı beyin dokusunu koruduğu ve beynin metabolizmasını düzelttiği düşünülmektedir (88, 94).

Ginkgo bileşenleri, Alzheimer hastalığında gözlenen lipid peroksidasyon ve hücre hasarının bağdaştırıcıları olan serbest radikal temizleyicileri gibi hareket edebilir. Yapılan bir çalışmada GB'nin, asetilkolinesteraz inhibisyonu yoluyla beyindeki kolinerjik iletimi arttırabileceği bunun Alzheimer hastalığını tedavi edici etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Vasküler ginkgo etkilerinin, gevşetici faktör ve prostasiklin salınımından elde edilen endotel uyarımı için ikincil bir vazodilatasyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan diğer çalışmalar GB'nin nitrik oksidi inhibe edebileceğini dolayısıyla da vasküler rahatlamaya neden olacağını belirtmektedir (138, 139, 140, 141, 142, 143, 144).

Yapılan bir diğer çalışmada GB'nin düşük basınçlı hipoksiye maruz kalan sıçanların sağ kalma sürelerini fazlasıyla uzatabildiğini göstermektedir. Ek olarak biyokimyasal sonuçlar; beynin enerji metabolizmasının bu ilaç tarafından etkilendiğinden göstermektedir (147). Özellikle çeşitli deneysel çalışmalarda, beynin glukoz seviyelerinde bir artış tespit edilmiştir. GB'nin kan glukoz seviyelerinde artış sağladığı benzer deneysel çalışmalarda da gösterilmiştir. GB'nin hipoksik sıçan beynindeki laktat/pirüvat oranı üzerindeki etkisinin laktat konsantrasyonu üzerindeki etkisinden daha belirgin olduğu görülmektedir. Bu orandaki belirgin düşüş, özellikle GB uygulanan beyinlerdeki pirüvat konsantrasyonundaki azalma sayesinde gerçekleştiği görülmüştür. Bütün aerobik hücrelerde, oksijenin tek değişikliğe indirgenmesi, lipid peroksidasyonu yoluyla membran hasarını başlatan güçlü serbest radikallerin oluşmasına yol açar (145, 146).

Çalışma sonuçlarına göre sıçanların total beyin hacimleri birbirleri ile karşılaştırıldığında kontrol grubu, iskemi grubu, iskemi GB grubu ve sham grupları

arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılığın olmadığı görüldü. Ancak kontrol grubu ile sham grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü. Bu durum cerrahi stresin beyin hacminde artışa sebep olduğunu ve bu artışın 14. günde de devam ettiğini göstermektedir. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, çalışma sonuçlarımızın kaynaklarla da desteklendiği görülmektedir. Çünkü kaynaklarda GB'nin sürekli ve geçici fokal beyin iskemisine karşı nöroprotektif bir etki ortaya koyduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda bu madde hipokampal nöronları, beta amiloid toksisitenin neden olduğu hücre ölümüne karşı da korumaktadır. Ek olarak GB'nin çeşitli nörodejeneratif bozukluklar ve periferik arteriyel tıkanıklık hastalıkları üzerinde de yararlı etkileri olduğu klinik çalışmalarda bildirilmiştir (147, 148, 149, 150).

GB, güçlü bir serbest radikal temizleme aktivitesine ve antioksidan etkiye sahiptir. Aynı zamanda, iskemik hasarın neden olduğu aşırı serbest radikal üretimi, protein oksidasyonu ve DNA hasarına neden olur. Yapılan bir çalışmada GB'nin aslında akt sinyal yolağında mediatör görevi gördüğü öne sürülüyor. Yapılan diğer bir çalışmada ise TTC boyası kullanılarak oluşturulan fokal beyin iskemisi sonrası oluşan beyin infarkt hacminin, GB uygulaması ile anlamlı bir şekilde azaldığını gösteriyor. Aynı zamanda, GB tedavisi, akt ve altyolakları arasındaki antiapoptotik sinyalleri artırarak da bu nöroprotektif etkiye aracılık etmektedir (150, 151, 152, 153, 154).

Yapılan çalışmalarda GB'nin MDA konsantrasyonunu azaltıp eş zamanlı olarak korteks dokusundaki SOD ve GSH-PX konsantrasyonunu arttırabileceği gösterilmiştir. Beyin dokusu büyük miktarda çoklu doymamış yağ asidinden zengin fosfolipit içerir ki bu çoklu doymamış yağ asitleri serbest yağ asitleri tarafından peroksidasyona çok açıktır. Bu lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA çok reaktiftir ve sitotoksik etkilerden nöronal ölümden sorumludur. SOD ve GSH-PX'in peroksidasyon reaksiyonlarının neden olduğu hasardan dokuyu koruyan serbest radikal temizleyici görevi gören iki önemli enzim olduğu düşünülmektedir. Bu da GB'nin antiserbest radikal etkisi ile nöroprotektif olduğunu göstermektedir (155, 156).

Sıçanlar çalışma öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları bakımından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı

görülmüştür. Aynı şekilde çalışma grupları beyin ağırlıkları bakımından da değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Bu durum hem iskeminin hem GB'nin sıçanların ağırlıklarına herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

GB ve iskemi ilişkisini araştıran çalışmalar incelendiğinde, sıçanların davranışları yönünden değerlendirilmediği görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızın bu bulguları yeterince tartışılmamıştır. Ancak bazı çalışmalarda beyin iskemisi sonrasında yeme bozukluğu, kaçınma, agresiflik ve saldırganlık gibi davranışla ilgili problemler ortaya çıktığı (51) ve bu durumun iskeminin yemek yeme ve diğer davranışlar üzerine geçici bir süre olumsuz etkisinin olduğu şeklinde izah edilmektedir. Bu durum da iskemi bölgesinde zarar gören hücrelerin, GB'nin nöroenezisi başlatarak hücre sayısını normale döndürdüğünü düşündürebileceği gibi, iskeminin de nöroenezisi başlatması sonucu da olabileceği düşünülebilir. Zira iskeminin nöroenezis üzerinde etkisi olabileceği bilinmektedir (157, 158). Cıvcıvler üzerinde yapılan bir çalışmada, değişik sürelerde uygulanan iskeminin öğrenme davranışı üzerine olan etkilerine de bakıldı. Bu çalışmada iskemi sonrası erken dönemde motor fonksiyonlarda bozulmaların olabileceği, ancak bunun daha sonra düzelebileceği ileri sürülmektedir (4, 51). Bu çalışmada elde edilen davranış ile ilgili bulgular, bizim çalışmamızda iskemiden 3 gün sonra azalan kaçınma, agresiflik ve saldırganlık bulgularının normale dönmesini destekleyen bir bulgulardır.

Sonuç olarak tüm bulgular birlikte değerlendirildiğinde cerrahi stresin beyin hacmini arttırdığı, GB'nin arteria karotis kan akımı kesilen sıçanların beyin hacmi üzerine koruyucu etkisinin olduğu, iskemik beyinlerde GB'nin koruyucu olarak kullanılabileceği söylenebilir. Ancak bu çalışma bir hacim çalışmasıdır. Bu nedenle bu sonucun başka çalışmalarla özellikle hücresel seviye de yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmadan çıkarılabilecek sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1. İskemi sonrası erken dönemlerde sıçanlarda davranış bozuklukları olmaktadır. Ancak bu bozukluklar daha sonra düzelmektedir.
2. İskemi ve GB sıçan vücut ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır.
3. İskemi ve GB sıçan beyin ağırlıklarında da herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır.
4. GB iskemi sonrası oluşabilecek hasarı önleyebilir.
5. İskemi nöroenezisi başlatarak neden olduğu hasarı ortadan kaldırabilir.

Bu sonuçların ışığı altında konuyla ilgili araştırmacılara şu öneriler yapılabilir.

Çalışma sonuçlarına göre GB'nin arteria karotis kan akımı kesilen sıçanların beyin hacmi üzerine koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir. Bu sonuca göre GB iskemi sonrasında ortaya çıkabilecek patolojilerin tedavisinde kullanılmaya aday bir terapötik ajan olarak düşünülebilir. Ancak çalışmamız bir hacim çalışmasıdır. Sadece hacim çalışmasından yola çıkarak bunu kesin olarak söylemek mümkün değildir. Çünkü bilindiği üzere iskemi hücresel seviyedeki hasar mekanizmaları ile ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bu sonucun başka çalışmalarla özellikle hücresel seviye de immünohistokimyasal, biyokimyasal, otoradyografik ve ultrastruktürel yöntemlerle yapılan çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca klinik çalışmalara geçmeden önce iskemi ve GB ilişkisini inceleyen deneysel çalışmaların sayısının artırılması gerekmektedir. Çünkü bu ilişkiyi inceleyen çok az sayıda deneysel çalışma mevcuttur. Bu nedenle iskemi konusu ile ilgili çalışan araştırmacılar için iskemi ve GB ilişkisi özellikle de hücresel seviyede araştırılmaya değer bir konudur.

9. KAYNAKLAR

1. Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991). Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neurosci* 40: 599–636.
2. Kietzmann T, Knabe W, Schmidt-Kastner R (2001). Hypoxia and hypoxia-inducible factor modulated gene expression in brain: involvement in neuroprotection and cell death. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 251: 170–178.
3. Lipton P (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79: 1431–1568.
4. Uçar Ş (2009). Cıvıclere değişik sürelerle uygulanan iskeminin beyincik purkinje ve granüler hücre sayısı ile öğrenme davranışı üzerine etkisinin araştırılması: stereolojik bir çalışma. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Samsun
5. Fiala JC, Spacek J, Harris KM (2002). Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev* 39: 29–54.
6. Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, Avendano C (1999). Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assessment. *Neurosci* 93(1): 71–80.
7. Sakashita Y, Kanai M, Sugimoto T, Taki S, Masaharu T (1997). Changes in cerebral blood flow and vasoreactivity in response to acetazolamide in patients with transient global amnesia. *J Neurol Neurosurg Psychia* 63: 605–610.
8. Uzun, D (2010). Gebelikte olaylanan deneysel hipokside ginkgo biloba'nın ovaryum dokusuna etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enst. Ankara
9. Schweizer U, Brauer AU, Körhle J (2004). Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain Research Reviews* 45: 164-178
10. Bensky D, Gamble A (1993). Chinese Herbal Medicine. *Materia Medica*. Washington: Eastland Press
11. Bartheld CS (2002). Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol Histopathol* 17: 639–648.
12. Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc* 193: 199–211.

13. Howard CV, Reed MG (1998). Unbiased Stereology: Three-dimensional measurement in microscopy. First edition, BIOS Scientific Publishers, UK.
14. Mayhew TM, Gundersen HJG (1996). 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. J Anat 188: 1-15.
15. Chan PH (2001). Reactive oksijen radikals in signaling and damage in the ischemic brain J Cereb Blood Flow Metab 21: 2-14.
16. Amacher AL, Oyesiku NM (1990). Cerebral metabolism and blood flow. In: Patient Çare in Neurosurgery, 3rd ed. Boston: Little Brown and Copp 3-23
17. İzdeş. M (1999). Deneysel intermittant serebral iskemi ve referfüzyon ile vitamininin enfarkt hacmi üzerine olan etkileri. Gazi Üniv. Uzmanlık tezi. Ankara
18. Renhcona S, Rosen E, Siesjö BK (1981) Brain lactic acid, acidosis and ischemic cell damage. Biochemistry and Neurophysiology. J Cereb Blood Flow Metab 1: 297-331
19. Dell Zoppo GJ, Zeumer H, Harker LA (1986). Trombolitic therapy in stroke: Possibilities and hazards. Stroke 17: 595-607,
20. Snell RS, MD PhD (2007). Clinical Neuroanatomy for Medical Students (8th.ed) 699-824
21. Taner D (2002). Fonsiyonel Nöroanatomî. Ankara Metu Pres,67-78
22. James D (1995). Neuroanatomy. United States of America. Williams & Wilkins,1-20
23. Arıncı K, Elhan A (2001). Anatomi- 2.cilt. Ankara. Güneş Kitabevi, 212-352
24. Taner D (2005). Fonsiyonel Nöroanatomî. Ankara Metu Pres,89-97
25. Kurt A (2003). Bölüm 16. Gökmen F.G. sistematik Anatomi. İzmir. İzmir Güven Kitabevi, 725-743
26. Junqueira LC, Carneiro J (2005). Basic Histology: Text& Atlas, 11 edition. McGraw-Hill Medical
27. Paker S (1990). Histoloji. 2. Baskı. Bursa, Uludağ Üniversitesi Basımevi,187-203,439-444
28. Gartner LP, Hiatt JL (2005). Color Atlas of Histology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins,170-210

29. Dan W. Fawcett (1986). Bloom and fawcett A text Book of Histology. 11th Edition, 333-385
30. Gartner LP, Hiatt JL (2001). Color Textbook of Histology. Second Edition: Philadelphia: WB Saunders Co, 183-217
31. Patrick E, Sharp (1998). The laboratory rat Patrick Sharp and Marie C, La regina, II. Title. III. Series.
32. Morgan GE, Mikhael MS, Murray MJ, (eds) (2002). Clinical Anesthesiology, thid edition. Lange Medical Books: The McGraw Hill Companies 552-566
33. Berkow R(Ed) (1986). The Merck Manual, 2. Cilt, Çeviri Editörü: Pekus M, Türkçe 1. Baskı. İstanbul, Merk Yayıncılık
34. Leker RR, Shohami E (2002). Cerebral Ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. Brain Research Reviews, 39: 55-73
35. Tamura A, Kawai K, Takagi K (1997). Animal madels used in cerebral ischemia and stroke research. Horst GJ, Korf J(Ed). Clinical Pharmacology of Cerebral Ischhemia Humana Press
36. Powers WJ, GRubb RL Raichle ME (1984). Physiological Responses to Focal Cerebral Ischemia in Humans. Ann Neurol, 16: 546-552
37. Adams RD, Yactor (1989). Principles of Neurology, pp. Singapore, McGraw Hill Company 617-624
38. Siesjo BK (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. J. Neurosurg 77: 169-84.
39. Korfalı E, Kahveci N (2005). Serebral iskeminin patofizyolojisi. İçinde: Aksoy K (ed). Temel Noroşirurji, Buluş Tasarım ve Matbacılık 387-7.
40. Molari GF, Laurent JP (1976). A classification of experimental models of brain ischemia. Stroke 7(1): 14-17
41. Garcia JH (1984). Experimental cerebral stroke: a reivew. Stroke, 15: 5-14
42. Hacke W, Hennerici M, Gelmers HJ, Kramer G (1991). Pathophysiology of cerebral ischemia: Cerebral İschemia. Hacke W, Hennerici M, Gelmers HJ, Kramer G(eds) Springer- Verlag, Berlin, S: 17-30
43. Balkan S (2002). Serebral vasküler antomi. İn: Klinik Nöroloji. Oğul E, 3-15

44. Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981). Thresholds in cerebral ischemia- the ischemic penumbra. *Stroke* 12: 723-5
45. Furlan M, Marchal G, Viader F, Deereon JM, Baron JC (1996). Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra. *Ann Neurol*, 40: 216-26
46. Heiss WD (1992). Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery. *Stroke* 23: 1668-72
47. Suguwara T, Fujimura M, Noshita N, Whan G, Saito A, Hayashi T, Narasimhan P, Maier CM, Chan PH (2004). Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *The American Society for Experimental Neuro Therapeutics*, 1: 17-25.
48. Xiong Li-ze (2006). Neuroanesthesia and neuroprotection: where are we now? *Chinese Medical Journal*, 883-886.
49. Willson RJ, Szekely AD, Stewart MG (1994). Transient cerebral ischemia disrupts performance on a one-trial passive avoidance task in the domestic chick and is associated with neuronal degeneration in the cerebral nervous system. *Neuroscience* 61(4): 975-81
50. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (2007). *Temel Patoloji Çev. Ed. Prof. Dr. Uğur Çevikbaş Türkçe 8. Baskı. Nobel Tıp Kitapları Ltd. Şti.*
51. İşgen A (2009). *Civcivlerde değişik sürelerle uygulanan iskeminin hipokampusun hacmi, toplam nöron sayısı ve öğrenme davranışı üzerine olan etkisinin stereolojik metotlarla araştırılması. Uzmanlık Tezi, Ondokuz Mayıs Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Samsun*
52. Hermann A, Maisel M, Liebau S, Gerlach M, Kleger A, Schwarz J, Kim KS, Antoniadis G, Lerche H, Storch A (2006). Mesodermal cell types induce neurogenesis from adult human hippocampal progenitor cells. *J Neurochem* 98: 629-40
53. Cotran RS, Kumar V, Robbins (2003). *Çev. Ed. Çevikbaş U. Robbins Temel Patoloji*
54. İşlekel H, İşlekel S, Güner G (2000). Biochemical mechanism and tissue injury of cerebral ischemia and reperfusion. *norol Bil D*, 17:2
55. Winn HR, Dacey JRG, Mayberg MR (1989). Cerebral circulation. In: *Pattan P(ed), Textbook of physiology, 21st.edition. saunders Company, 952-960*

56. Erdem AF (2003). Sevofluran ve desfluran ratlarda inkomplet serebral iskemide serebral koruyucu etkilerinin histopatolojik olarak karşılaştırılması. Atatürk Üniv. Tez. Erzurum
57. Astrup J (1982). Energy- requiring cell functions in the ischemic brain. J Neurosurg 56: 482-497
58. Osbome ELA, Shigeno T, Balarsky AM Ford I, McCulloch J, Teasdale GM, Graham Di (1987). Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 50: 402-410
59. Kutluk K (2004). İskemik İnme 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi,1-35
60. Liang D, Dawson TM, Dawson VL (2004). What have Genetically Engineered Mice Taught Us About Ischemic Injury? Current Molecular Medicine 4: 207-225
61. Dugan LL Choi DW (1994). Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. Ann Neurol 35: 17-21
62. Hartley DM, Kurth MC, Bjerkness L, Weiss JH, Choi DW (1993). Glutamate receptorinduced 45 Ca^{+2} accumulation in corcital cell culture correlates with subsequent neuronal degeneration. J Neurosci, 13: 1993-2000
63. Tamer L, Polat GE Skandari G (2000) et al. Serbest radikaller. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 1: 52-58
64. Backman JS (1991). The duble-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide- mediated injury. J Dev Physiol, 15: 53-9
65. Gürsoy-Özdemir Y, Bolay H, Sarıbaş O, Dalkara T (2000). The role of endothelial nitric oxide generation and peroxynnitrite formation in reperfusion injury after focal cerebral ischemia. Stroke 31: 1974-81.
66. Bandyopadhyay U, Das D, K Banerjee KR (1999). Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis, 658-664
67. Zheng Z Yenari MA (2004). Post-ischemic inflammation molecular mechanism and therapeutic implications. Neurol res, 26: 884-92
68. Yemişçi M, Güner G, Dalkara T (2004). İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar. İn: Türkiye Klinikleri Nöroloji, Serebr ovasküler Hastalıklar Özel Sayısı Nisan, 22-30
69. mcDonald RL, Stoodley M (1998). Pathophysiology of cerebral ischemia. Neurol Med Chir 381-11

70. Daval JL, Vert P (2004). Apoptosis and neurogenesis after transient hipoxia in the developing rat brain. *Semin Perinatol*, 28: 257-63
71. Koelfen W, Freund M, Varnholt V (1995). Neonatal stroke involving the middle cerebral artery in term infants: clinical presentation, EEG and imaging studies, and outcome. *Dev Med Child Neurol*, 37: 204-12
72. Delivoria-Papatopoulos M, Mishra P (1998). Mechanisms of cerebral injury in perinatal asphyxia and strategies for prevention. *J Pediatr* 132: 30-4
73. Johnson MV, Trescher WH, Ishida A and Nakajima W (2000). novel treatments after experimental brain injury. *Semin Neonatol*, 5: 75-86
74. Northington JF, Graham EM, Martin LJ (2005). Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res Rev*, 50: 244-57
75. Hacke W, Hennerici M, Gelmers HJ (1991). Kramer G: pathophysiology of cerebral ischemia: Cerebral Ischemia. Hacke W, Hennerici M, Gelmers HJ, Kramer G (eds) Springer-Verlag, Berlin S:17-30.
76. Walker V, Pickard JD (1985). Prostaglandins, thromboxane, leukotrienes and the cerebral circulation in health and disease: Advances and Technical Standards in Neurosurgery Symon L (ed). Springer-Verlag, Wien 3-90
77. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marza I, Geuskens M, Kroemer G (1997). The apoptosis- necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death *oncogene*, 15: 1573-81
78. Nicotera P, Leist M, Manzo L (1999). Neuronal cell death assumes with different shapes. *Trends Pharmacol Sci*. 20: 46-51
79. Raichle ME (1983). The Pathophysiology of brain ischemia. *Ann Neurol*, 12: 2-10
80. Pulsinelli W (1999). Pathophysiology of acute ischemic stroke. *The Lancet* 339:532-536
81. Pollary M (1994). Blood-brain barrier, cerebral edema, Rengachary SS, Wilkins RH (ed), in *Neurosurgery* second edition, McGraw Hill 340-342
82. Kırış T (2004). Kafa içi basınç artması sendromu, Emre Öge (editör), *Nöroloji*, 179-191
83. Marmarou A (2004). The pathophysiology of brain edema and elevated intracranial pressure, *Cleveland Clinic Journal Of Medicine* Volume 71 Supplement 1

84. Rabinstein (2006). Treatment of cerebral edema, *The neurologist* volume 12(2)
85. Bobek M, Hoff JT (2004). Brain edema and tumor host reactions. Winner(edt). *Youmans Neurological Surgery*. V.th. edition, 791-805
86. Van Wilk SJ, Hageman GJ (2000). Poly(ADP-ribose) polymerase -1 mediated caspase- independent cell death after ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 39: 81-90
87. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005). Endoplasmic reticulum species. Cell life and death decisions. *J Clin Invest* 115: 2656-2664
88. Brown D, Gaby A, Reichert R (1997) et al. Clinical Applications of Natural Medicine. Dementia and Age-Related Cognitive Decline, Natural Product Research Consultants, Seattle, 10
89. Newall CA, Anderson LA, Phillipson JD (1996). Ginkgo Biloba monograph. In: *Herbal Medicines: A Guide for Health-Care Professionals*, Pharmaceutical Press, London, 138
90. Marcilhac A, Dakine N, Bourhim N (1998) et al. Effect of chronic administration of Ginkgo Biloba extract or Ginkgolide on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Life Sci* 62: 2329
91. Barkads M, Venault P, Christen Y, Cohen –Salmon C (1995). Effect of long-term treatment with EGb 761 on age-dependent structural changes in the hippocampi of three inbred mouse strains. *Life Sci*, 62: 2329
92. White HL, Scates PW, Cooper BR (1996). Extracts of Ginkgo Biloba leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Sci*, 58: 1315
93. Pizzorno JE, Murray MT (1985). A textbook of natural medicine. John Bastyr College Publications, Seattle (looseleaf).
94. Wada K, Ishigaki S, Ueda K (1988) et al. Studies on the constitution of edible and medicinal plants. Isolation and identification of 4-O-methylpyridoxine, toxic principle from the seed of Ginkgo biloba L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 36: 1779
95. Kleijnen J, Knipschild P (1992). Ginkgo Biloba *Lancet* 340:1136-9
96. Rouse J (1998). Ginkgo Biloba: Mind, Mood, and Memory. Clinical Nutrition Insights. Adventec Nutrition Publication Inc, 6 (7): 1-2
97. Haraguchi H, Satio T, Okaonura N (1995) et al. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. *Planta Med* 61: 333-6.

98. Turan I, Martorano D (1995). Natural substances in psychiatry (Ginkgo biloba in dementia). *Pharmacol Bull* 31: 147-58
99. deFeudin FV (1998). Ginkgo biloba extract (EGb- 761) from chemistry to the clinic, Ullstein Medical Wiesbaden
100. Bridi R, Crossetti FP, Steffen VM, Henriques AT (2001). The Antioxidant Activity of Standardized Extract of Ginkgo biloba(EGb 761)in Rats. *Phytother. Res* 15: 449-451
101. deFeudes FV (2002). Bilobalide and Neuroprotection. *Pharmacological Research*, 46(6): 565-568
102. Smith P, MacIenna K, Darlington C (1996). The neuroprotective properties of the Ginkgo biloba leaf: a reivew of the possible relationship to platelet- activating factor(PAF) *J Ethnopharmacol*, 50: 131-139
103. Smith JV, Luo Y (2004). Studies on molecular mechanisms of Ginkgo biloba extract. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 465-472
104. Carroll, Bradley W (2007). ‘Archimedes Principle’. Weber State University. Retrieved
105. Canan S, Şahin B, Odacı E, Ünal B, Aslan H, Bilgiç S, Kaplan S (2002). Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri prensibi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, Stereolojide Temel Kavram ve Yöntemler (Özel Sayı) 22*, 7-14.
106. Acer N, Sahin B, Bas O, Ertekin T, Usanmaz M (2007). Comparison of three methods for the estimation of total intracranial volume: stereological, planimetric and anthropometric approaches. *Annals of Plastic Surgery* 58: 48-53.
107. Şahin B, Odacı E (2008). Radyolojik Görüntülerden Hacim-Hacim Oranı ve Yüzey Alanı Hesaplama Yöntemleri Kursu, Kurs Notları. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Türk Stereoloji Derneği. 19–20 Mart, Trabzon
108. Edizer E (2006) Sayısal görüntü işleme yöntemi ile tane boyut dağılımı analizi Çukurova Üni Yüksek Lisans Tezi
109. Rueden CT, Eliceiri KW (2007). Visualization approaches for multidimensional biological imae data. *bioTechniques* 43: 31, 33-6
110. Rajwa B, McNally H, Varadharajan P, Sturgis J Robinson J (2004). AFM/CLSM data visualization and comparasion using an open-source toolkit. *Microsc Res Teach* 64(2): 176-84

111. Barboriak D, Padua A, York G, Macfall J (2005). Creation of DICOM- Aware Applications Using ImageJ
112. Eliceiri K, Rueden C (2005). Tools for visualizing multidimensional images from living specimens. *Photochem Photobiol* 81(5): 1116-22
113. Collins TJ (2007). " ImageJ for microscopy". *BioTechniques* 43: 25-30
114. Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West M.J (1988a). Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 379-394.
115. Royet JP (1991). Stereology: a method for analysing images. *Progress Neurobiol* 37, 433-474.
116. Gundersen HJG, Jensen EB (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 147, 229-263.
117. Mayhew TM (1992). A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *J. Neurocytol.* 21, 313-328.
118. Russ JC Dehoff RT (1999). Practical stereology. Second edition. Plenum Press, New York.
119. Gundersen HJG (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. *J. Microsc.* 143, 3-45.
120. Sahin B, Aslan H. Ünal B, Canan, S. Bilgiç S, Kaplan S, Tümkaya L (2001). Brain volumes of the lamb rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study. *Image Anal. Stereol.* 20, 9-13.
121. İkinci A (2011). Beyin İskemisi Sonrasında Uygulanan Etil Piruvatın Sıçan Hipokampusunun Nöron Sayısı Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bilimleri Enst. Trabzon
122. Bancroft JD, Stevens A, Turner DR (1996). Theory and Practice of Histological Techniques. Fourth edition, Churchill Livingstone, USA.
123. Kontos HA (2001). Oxygen Radicals in Cerebral Ischemia: The 2001 Willis Lecture. *Stroke* 32: 2712-2716
124. Akins PT, Atkinson RP (2002). Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischemic stroke. *Current Medical Research and Opinion.* 18: 9-13

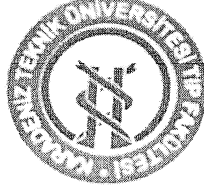
125. Love S (2003). Apoptosis and brain ischemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2):267-282 1568
126. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P (2003). Regulation of Cell Death: The Calcium-Apoptosis Link. *Molecular Cell Biology* 4: 552-565
127. Aarts MM, Tymianski M (2004). Molecular Mechanisms Underlying Specificity of Excitotoxic Signaling in Neurons. *Current Molecular Medicine* 4: 137-147
128. DeGracia DJ, Kumar R, Owen C, Krause, White BC (2002). Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22: 127-141
129. Crack PJ, Taylor JM (2005). Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology & Medicine* 38: 1433-1444
130. Christople M, Niolas S (2006). Mitochondria: A target for neuroprotective interventions in cerebral ischemia/reperfusion. *Current Pharmaceutical Design* 12: 739-75
131. Paterson IA, Barber AJ, Gelovitz DL, Voll C (1997). (-) Deprenyl reduces delayed neuronal death of hippocampal pyramidal cells. *Neurosci Biobehav Rev.* 21(2): 181-186
132. Clark WM, Rinker LG, Lessov NS, (2001) et al. Efficacy of Antioksidant Therapies in Transient Focal Ischemia in Mice. *Stroke.* 32: 1000-1004
133. Lee EJ, Chen HY, Wu :TS (2002) et al. Acute Administration of Ginkgo biloba Extract Affords Neuroprotection Against Permanent and Transient Focal Cerebral Ischemia in Sprague- Dawley Rats. *Journal of Neuroscience Research.* 68: 636-645
134. Özbal S (2010). Deneysel iskemi reperfüzyon hasarında İloba extresi(egb) ve selenyumun beyin dokusu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
135. Semkova I, Kriegstein J (1999). Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Research Reviews.* 30: 176-188
136. Ahlemeyer B, Junker V, Huhne R, Kriegstein J (2001). Neuroprotective effects of NV-31, a bilobalide-derived compound: evidence for an antioxidative mechanism. *Brain Research* 890: 338-342
137. MacLennan KM, Darlington CL, Smith PF (2001). The CNS effects of ginkgo biloba extracts and ginkgolide B. *Prog Neurobiol* 67: 235-257

138. deFeudis FV (1991). Ginkgo Biloba Extract (Egb 761) Pharmacological Act and Clinical Application. Ellsevier, Paris
139. Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubert D (1994). Hydrogen peroxide mediates amyloid beta protein toxicity. *Cell* 77: 817
140. Oyama Y, Fucchs PA, Katayama N, Noda K (1994). Myricetin and qercetin, the flavonoid constituents of Ginkgo biloba extract, greatly reduce oxidative metabolism in both resting and Ca(2+)-loaded brain neurons. *Brain Res* 635: 125
141. Benzi G, Moretti A (1995). Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16: 661
142. Chen X, Salwinski S, Lee TJ (1997). Extracts of Ginkgo biloba and ginsenosides exert cerebral vasorelaxation via a nitric oxide pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 24: 958
143. Kobuchi H, Droy-Lefaix MT, Christen Y, Packer L (1997). Ginkgo biloba extract: inhibitory effect on nitric oxide production in the machophage cell line RAW 264.7. *biochem Pharmacol* 53: 897
144. Murray M (1995). *The Healing Power of Herbs*, 2. Ed. Prima Publishing, Rocklin, CA, 147
145. Fridovich I (1979). Hypoxia and oxygen toxicity. *Adv Neurol* 26: 255-266
146. Kracher L, Zagermann P, and Krieglstein J (1984). Effects of an extract of Ginkgo biloba on rat brain metabolism in hypoxia. *Nauyn- Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327: 31-35
147. Pierre S, Jamme I Droy- Lefaix MT, Nouvelot A, Maixent JM (1999). Ginkgo Biloba Extract (Egb 761) protects Na, K- ATP ase activity during cerebral ischemia in mice. *Neuroreport* 10: 47-51
148. Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, Chirsten Y, Poirier J, Quirion R (2000). The Ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta- amyloid. *Eur. J. Neurosci* 12: 1882-1890
149. deFeudis FV, Drieu K (2000). Ginkgo Biloba Extract (Egb 761) and CNS functions: basic studies and clinical applications. *Curr. Drug Targets* 1: 25-58
150. Cho JH, Sung JH, Cho EH, Won CK, Lee HJ, Kim MO, Koh PO (2009). Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Prevents Ischemic Brain Injury by Activation of the Akt Signaling Pathway. *The American Journal of Chinese Medicine*, 3: 547-555

151. Droy-Lefaix MT, Cluzel J, Menerath JM, Bonhomme B, Doly M (1995). Antioxidant effect of a Ginkgo biloba extract(EGb 761) on the retina. *Int. tissue React.* 17: 93-100
152. Calapai G, Crupi A, Frenzuoli F, Marciona MC, Squardrito F, Inferrera G, Parisi A, Rizzo A, Crisafulli CFiore A, Caputi AP (2000). Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. *Life Sci* 67: 2673-2683
153. Koltermann A, Harktkorn A, Koch E, Fürst R, Vollmar AM, Zahler S (2007). Ginkgo biloba extract EGb 761 increases endothelial nitric oxide production in vitro and in vivo. *Cell Mol. Life Sci* 64: 1715-1722
154. Slemmer JE Shacka JJ, Sweeney MI, Weber JT (2008). Antioxidants and free radical scavengers for the treatment of stroke, traumatic brain injury and aging. *Curr. Med. Chem.* 15: 404-414
155. Pincemail J, Dupuis M (1987) et al. Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. *Experientia* 43: 181-184
156. Pincemail J, Dupuis M, Nasr C (1989) et al. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia* 45: 708-712
157. Allen E (1912).The cessation of mitosis in the cerebral nervous system of the albino rat. *J Comp Neurol* 19: 547-568
158. Altman J (1972). Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular Layer. *J Comp Neurol* 145: 399-464

10. ETİK KURUL ONAYI

T.C. KARADENİZ
TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI



KARADENİZ
TECHNICAL UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND ETHICS
COMMITTEE

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL ONAY BELGESİ

Çalışmasının Adı : “Ginkgo Bilobanın Arteria Karotis Kan Akımı Kesilen Sıçanların Beyin Hacmi Üzerine Etkisi” Çalışmacılar : Prof.Dr.Ersan ODACI, Yük.Lis.Öğr.Zeynep AKTÜRK Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji ABD.			
Etik Kurul Dosya No 2010/38	Etik Kurul Toplantı Tarihi 26.10.2010	Etik Kurul Toplantı No 2010/19	Etik Kurul Karar No 3
Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Salonu'nda Prof.Dr.Yavuz ÖZORAN'ın başkanlığında “Ginkgo Bilobanın Arteria Karotis Kan Akımı Kesilen Sıçanların Beyin Hacmi Üzerine Etkisi” başlığını taşıyan tez çalışmasının, Karadeniz Teknik Üniversitesi'nde yürütülmesinin mümkün olduğuna; çalışmacıların bu çalışmayı yürütülebilecek kalifikasyonda olduklarına; araştırmanın dosyada belirtilen haliyle tıbbi etik açıdan uygun olduğuna; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir. (26.10.2010) Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı			

11. ÖZGEÇMİŞ ve KİŞİSEL BİLGİLER

T.C. Kimlik/Pasaport No : 28646434232
Soyadı, Adı : AKTÜRK, Zeynep
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.04.1981
Medeni Hali : Evli
Telefon : (462) 2213488
Faks : -
E-Posta : zeynep_emir61@hotmail.com
Yazışma Adresi : KTÜ Farabi Hast. Pediatri Acil

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ Histoloji ve Embriyoloji	2012
Lisans	: A.Ü. ERZURUM	2003
Lise	: Trabzon Fatih Lisesi	1997

YABANCI DİL
İngilizce