

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
SUALTI HEKİMLİĞİ VE HİPERBARİK TIP  
ANABİLİM DALI**

**Hiperbarik Ortamda Solunan Hava ve Oksijenin Kan-Beyin Bariyeri  
Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması**

**Dr. Nihal GÜNEŞ ÇEVİK**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU**

**UZMANLIK TEZİ**

**İSTANBUL  
2012**

## TEŞEKKÜR

Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nın kurulmasına ve gelişmesine yoğun emek veren, Prof. Dr. Maide ÇİMŞİT'e, uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince, mesleki bilgi ve tecrübesini aynı zamanda desteğini esirgemeyen, anlayışlı tavrı ile her konuda yardımcı olan değerli hocam Prof. Dr. Şamil AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Eğitimime ve tez çalışmama, bilgi ve görüşleri ile destek veren, bilimsel çevre oluşturmamda yardımcı olan, tez danışmanım Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU'ya teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan, Prof. Dr. Salih AYDIN'a teşekkür ederim.

Tez projeme destek veren İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet KAYA'ya, ayrıca tez çalışmamda büyük emekleri olan,

Adli Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nadir ARICAN'a,

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent AHISHALI'ya

Sinirbilim Doktora Öğrencisi Nurcan ORHAN'a,

Uzman biyolog Afife KAYA'ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimin büyük bölümünü beraber geçirdiğim Dr. Hayriye MUTLU'ya bilgisi, deneyimi, her konudaki desteği, sabrı ve arkadaşlığı için teşekkür ederim. Eğitimim süresince yine beraber çalıştığım diğer asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tecrübesi ve yardımseverliği ile görevimde bana yardımcı olan, Fizyoterapist Ali ÇELİK'e, Anabilim Dalı Sorumlu Hemşiresi Vildan ERDEM'e ve diğer hemşire arkadaşlara, Basınç Odası Operatörü Cengiz ŞİMŞEK'e göstermiş oldukları destek, sevgi ve yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Asistanlığım süresince yaptığım çalışmalarda ve araştırmalarda bana yardımcı olan, Anabilim Dalı Sekreteri Sevgi MEYDAN'a, Kayıt Sorumlusu Aslı AKYÜZ'e teşekkür ederim.

Ve bugüne kadar yanımda olan aileme, eşim Niyazi ÇEVİK'e ve biricik kızım ASYA'ya sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Dr. Nihal GÜNEŞ ÇEVİK**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>ÖZET</b>                                                                                 | <b>1</b>  |
| <b>ABSTRACT</b>                                                                             | <b>2</b>  |
| <b>I- GİRİŞ</b>                                                                             | <b>3</b>  |
| <b>II- GENEL BİLGİLER</b>                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>A- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ</b>                                                       | <b>5</b>  |
| <b>1. Tanım</b>                                                                             | <b>5</b>  |
| <b>2. Tarihçe</b>                                                                           | <b>6</b>  |
| <b>3. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Etki Mekanizmaları</b>                                 | <b>8</b>  |
| <b>a. Fiziksel Temel</b>                                                                    | <b>8</b>  |
| <b>(1). İdeal Gaz Kanunu</b>                                                                | <b>8</b>  |
| <b>(2). Boyle Gaz Kanunu</b>                                                                | <b>8</b>  |
| <b>(3). Charles ve Gay Lussac Gaz Kanunları</b>                                             | <b>9</b>  |
| <b>(4). Henry Gaz Kanunu</b>                                                                | <b>9</b>  |
| <b>(5). Dalton Gaz Kanunu</b>                                                               | <b>9</b>  |
| <b>b. Fizyolojik Etkileri</b>                                                               | <b>10</b> |
| <b>(1). Basıncın Mekanik Etkisi</b>                                                         | <b>10</b> |
| <b>(2). Yüksek Parsiyel Oksijen Basıncının Etkileri</b>                                     | <b>11</b> |
| <b>4. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları</b>                                        | <b>13</b> |
| <b>5. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komplikasyonları, Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları</b> | <b>16</b> |
| <b>a. Komplikasyonlar ve Yan Etkiler</b>                                                    | <b>16</b> |
| <b>b. Kontrendikasyonlar</b>                                                                | <b>17</b> |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| <b>B- KAN-BEYİN BARIYERİ</b>              | <b>18</b> |
| 1. Tanım                                  | 18        |
| 2. Tarihçe                                | 18        |
| 3. Kan-Beyin Bariyeri Genel Özellikleri   | 19        |
| 4. Kan-Beyin Bariyeri Hücresel Elemanları | 23        |
| a. Beyin Kapiller Endotel Hücreleri       | 23        |
| b. Kan-Beyin Bariyeri Destek Hücreleri    | 25        |
| (1). Astrositler                          | 25        |
| (2). Perisitler                           | 25        |
| (3). Mikroglial Hücreler ve Nöronlar      | 26        |
| 5. Kan-Beyin Bariyeri Sıkı Bağlantıları   | 26        |
| a. Sıkı Bağlantılar                       | 26        |
| (1). İntegral Proteinler                  | 27        |
| (2). Sitoplazmik Proteinler               | 28        |
| b. Adheran Bağlantılar                    | 28        |
| 6. Kan-Beyin Bariyeri Fonksiyonları       | 29        |
| a. İyon Regülasyonu                       | 29        |
| b. Nörotransmitterler                     | 29        |
| c. Nörotoksinler                          | 30        |
| d. Makromoleküller                        | 30        |
| e. Beynin Beslenmesi                      | 30        |
| 7. Kan-Beyin Bariyerinden Madde Geçişi    | 30        |
| 8. Kan-Beyin Bariyerinin Gelişimi         | 32        |

|                                                                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>9. Kan-Beyin Bariyeri Patofizyolojisi</b>                                                                      | <b>32</b> |
| <b>III- AMAÇLAR</b>                                                                                               | <b>34</b> |
| <b>IV- GEREÇ VE YÖNTEM</b>                                                                                        | <b>35</b> |
| <b>A- ÇALIŞMA GRUPLARI</b>                                                                                        | <b>35</b> |
| <b>B- DENEYSEL PROSEDÜR</b>                                                                                       | <b>35</b> |
| <b>1. Hiperbarik Oksijen Solunması</b>                                                                            | <b>35</b> |
| <b>2. Hiperbarik Ortamda Hava Solunması</b>                                                                       | <b>36</b> |
| <b>3. Kateterizasyon ve Dekapitasyon</b>                                                                          | <b>36</b> |
| <b>4. Kan-Beyin Bariyerinin Kantitatif Değerlendirmesi</b>                                                        | <b>36</b> |
| <b>5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme</b>                                                                       | <b>37</b> |
| <b>6. Horseradish Peroksidaz Traserinin Makroskopik İncelenmesi ve Elektron<br/>Mikroskopik Değerlendirilmesi</b> | <b>38</b> |
| <b>C- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME</b>                                                                             | <b>39</b> |
| <b>V- BULGULAR</b>                                                                                                | <b>40</b> |
| <b>A- EVANS BLUE BOYASININ BEYİN DOKUSUNDAKİ KANTİTATİF<br/>DEĞİŞİKLİKLERİ</b>                                    | <b>40</b> |
| <b>B- İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA DEĞİŞİKLİKLERİ</b>                                                              | <b>41</b> |
| <b>C- HRP TRASERİNİN MAKROSKOPİK GÖRÜNÜMÜ</b>                                                                     | <b>44</b> |
| <b>D- ELEKTRON MİKROSKOPİ BULGULARI</b>                                                                           | <b>45</b> |
| <b>VI- TARTIŞMA</b>                                                                                               | <b>46</b> |
| <b>VII- SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>                                                                                  | <b>51</b> |
| <b>VIII- KAYNAKLAR</b>                                                                                            | <b>52</b> |
| <b>IX- EKLER</b>                                                                                                  | <b>58</b> |
| <b>X- ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ</b>                                                                          | <b>59</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 1.** Tek kişilik basınç odası
- Şekil 2.** Çok kişilik basınç odası
- Şekil 3.** Beyindeki bariyerler
- Şekil 4.** KBOSB ve araknoid bariyer
- Şekil 5.** KBB hücresel elemanları
- Şekil 6.** Endotel hücreleri arasındaki bağlantı kompleksi
- Şekil 7.** KBB'den madde geçişi
- Şekil 8.** EB boyası enjeksiyonundan sonra alınan beyin örnekleri
- Şekil 9.** AQP-4 immün boyanması
- Şekil 10.** Okludin immün boyanması
- Şekil 11.** Kaveolin-1 immün boyanması
- Şekil 12.** Beyin dokusu koronal kesitlerinde HRP reaksiyonu
- Şekil 13.** Elektron mikroskopi görüntüleri

**TABLolar DİZİNİ**

- Tablo 1.** UHMS tarafından belirlenmiş HBOT endikasyonları
- Tablo 2.** ECHM 2004, HBOT endikasyonları
- Tablo 3.** Sağlık Bakanlığı HBOT endikasyon listesi
- Tablo 4.** HBOT rölâtif kontrendikasyonları
- Tablo 5.** KBB geçirgenliğinin değerlendirilmesinde kullanılan traserler
- Tablo 6.** Beyin dokusuna geçen EB boyası miktarının kantitatif değerleri

**GRAFİKLER DİZİNİ**

- Grafik 1.** EB boyasının standart eğrisi
- Grafik 2.** Beyin dokusuna geçen EB boyası miktarının kantitatif değerleri
- Grafik 3.** AQP-4 rölatif boyanma yoğunluğu
- Grafik 4.** Okludin rölatif boyanma yoğunluğu
- Grafik 5.** Kaveolin-1 rölatif boyanma yoğunluğu



## KISALTMALAR

|                       |                                                               |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|
| <b>ABC</b>            | ATP-binding cassette transporters                             |
| <b>AJ</b>             | Adherens junction "Aderan bağlantı"                           |
| <b>ALP</b>            | Alkalen fosfataz                                              |
| <b>AQP-4</b>          | Aquaporin-4                                                   |
| <b>ATA</b>            | Atmosphere Absolute "Mutlak atmosfer basıncı, 1 ATA=760 mmHg" |
| <b>ATP</b>            | Adenozin trifosfat                                            |
| <b>BOS</b>            | Beyin omurilik sıvısı                                         |
| <b>CO</b>             | Karbonmonoksit                                                |
| <b>CO<sub>2</sub></b> | Karbondioksit                                                 |
| <b>CRT</b>            | Kreatin taşıyıcısı                                            |
| <b>EB</b>             | Evans blue                                                    |
| <b>ECHM</b>           | European Committee for Hyperbaric Medicine                    |
| <b>EUBS</b>           | European Underwater and Baromedical Society                   |
| <b>GFAP</b>           | Glial fibrilik asit proteini                                  |
| <b>G-HBH</b>          | Hiperbarik hava soluyan grup                                  |
| <b>G-HBO</b>          | Hiperbarik oksijen soluyan grup                               |
| <b>GLUT-1</b>         | Glukoz taşıyıcısı-1                                           |
| <b>HADYЕК</b>         | Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, İstanbul Üniversitesi     |
| <b>HBH</b>            | Hiperbarik hava                                               |
| <b>HBO</b>            | Hiperbarik oksijen                                            |

|                                |                                                          |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <b>HBOT</b>                    | Hiperbarik oksijen tedavisi                              |
| <b>HRP</b>                     | Horseradish peroksidaz                                   |
| <b>JAM</b>                     | Junctional adhesion molecule "Bağlantı adezyon molekülü" |
| <b>KBB</b>                     | Kan-beyin bariyeri                                       |
| <b>KBOSB</b>                   | Kan-beyin-omurilik sıvısı bariyeri                       |
| <b>MMP</b>                     | Matriks metalloproteinaz                                 |
| <b>MSS</b>                     | Merkezi sinir sistemi                                    |
| <b>PBS</b>                     | Fosfat tampon sıvısı                                     |
| <b>PECAM</b>                   | Trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü              |
| <b>P-gp</b>                    | P-glukoprotein                                           |
| <b>TJ</b>                      | Tight junction "Sıkı bağlantı"                           |
| <b>UHMS</b>                    | Undersea and Hyperbaric Medicine Society                 |
| <b>ZO-1,2,3</b>                | Zonula okludens-1,2,3                                    |
| <b><math>\gamma</math>-GTP</b> | Gama glutamil transpeptidaz                              |

## ÖZET

**Amaçlar:** Bu deneysel çalışmada, hiperbarik ortamda oksijen ve hava solumanın, sıçanların kan-beyin bariyeri (KBB) geçirgenliği üzerine etkileri araştırılmıştır.

**Gereç ve yöntemler:** Çalışmada 72 adet Wistar albino, sağlıklı, genç erişkin dişi sıçan kullanıldı. Hayvanlar; kontrol grubu, hiperbarik oksijen soluyan grup (G-HBO) ve hiperbarik hava (G-HBH) soluyan gruplar olmak üzere üçe ayrıldı. Hiperbarik oksijen (HBO) ve hiperbarik hava (HBH) seansları, 15 dakika kompresyon, 2,5 ATA'da 60 dakika %100 oksijen ya da hava soluma, 15 dakika rekompresyon olarak uygulandı. Deney gruplarına 4,5 saat aralarla 24 saatte 4 kez HBO veya HBH seansları uygulandı. Dördüncü seanstan yaklaşık 4 saat sonra, alt gruplara bölünen sıçanlar kateterize edilerek, Evans blue (EB) boyası enjeksiyonu, horseradish peroksidaz (HRP) traseri enjeksiyonu ve immünohistokimyasal değerlendirme için fiksasyon işlemleri yapıldı ve dekapitasyon uygulandı. KBB geçirgenliği, EB boyası ile kantitatif ölçümle, HRP traseri ile elektron mikroskopik düzeyde değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirme, sıkı bağlantı proteini olan okludin, endotel plazma membranında bulunan kaveolin-1 ve astrositik ayak sonlanmalarında bulunan ve bir su kanalı proteini olan aquaporin-4 (AQP-4)'ün rölatif boyanma yoğunluklarının, imaj analizi kullanılarak tespiti ile yapıldı.

**Bulgular:** Kontrol ve G-HBH grubu ile karşılaştırıldığında, G-HBO grubunda beyin dokusuna anlamlı ölçüde EB boyası geçtiği saptandı ( $p<0,05$ ). Elektron mikroskopisi düzeyinde, normal şartlar altında KBB'yi geçemeyen HRP'nin, G-HBO ve G-HBH gruplarında, KBB'yi geçtiği gözlemlendi. İmmünohistokimyasal olarak imaj analiziyle, okludin ve kaveolin-1'in rölatif boyanma yoğunluklarında gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. AQP-4'ün rölatif boyanma yoğunluğunun, kontrol ve G-HBH grubu ile karşılaştırıldığında, G-HBO grubunda anlamlı olarak arttığı saptandı ( $p<0,01$ ).

**Sonuç:** Sağlıklı sıçanlara uygulanan HBO, KBB'de EB boyasına karşı geçirgenliği arttırmıştır. Solunum gazındaki oksijenin kısmi basıncının artışı, sağlıklı sıçanların KBB'sinden HRP traserinin geçişine neden olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Hiperbarik oksijen, kan-beyin bariyeri, evans blue, horseradish peroksidaz, AQP-4, okludin, kaveolin-1

## ABSTRACT

**Objective:** In this experimental study, the effects of breathing 100 % oxygen or air under hyperbaric condition, on blood-brain barrier (BBB) permeability were investigated in rats.

**Materials and methods:** Seventy two healthy young female Wistar albino rats were divided into three groups as, control, hyperbaric oxygen breathing (G-HBO) and hyperbaric air breathing (G-HBA) groups. Hyperbaric oxygen (HBO) and hyperbaric air (HBA) sessions were set as, compression in 15 min, 100 % oxygen or air breathing for 60 min at 2,5 ATA and decompression in 15 min. Four hyperbaric sessions on 100 % oxygen or air were applied to G-HBO and G-HBA groups in 24 hours with 4,5 hours intervals. The rats were catheterized about 4 hours after the last hyperbaric sessions to inject Evans blue (EB) dye and horseradish peroxidase (HRP), and to make the fixation for immunohistochemical evaluation and decapitation. BBB permeability was examined quantitatively and electron microscopically by using EB and HRP tracers respectively. In immunohistochemical evaluation, relative staining intensity was detected by image analysis for a tight junction protein occludin, caveolin-1 which is located on endothelial plasma membrane, and aquaporin-4 (AQP-4) that is known as water channel protein.

**Results:** Significant increase was detected in the BBB permeability for EB tracer in G-HBO group ( $p < 0,05$ ) comparing to control and G-HBA groups. In the electron microscopy, HRP crossed the BBB was detected in the samples from both G-HBO and G-HBA groups. There was no significant difference in the relative staining intensity of occludin and caveolin-1 between the groups. The relative staining intensity for AQP-4 increased significantly in G-HBO group ( $p < 0,01$ ) comparing G-HBA and control groups.

**Conclusions:** The HBO administration to healthy rats increased BBB permeability to EB dye. The increase of partial oxygen pressure in breathing gas caused the passing of the HRP tracer across the BBB in rats.

**Key Words:** Hyperbaric oxygen, blood-brain barrier, evans blue, horseradish peroxidase, AQP-4, occludin, caveolin-1

## I- GİRİŞ

Organizmadaki diğer sistemlerden farklı olarak, merkezi sinir sistemi (MSS) optimal aktivitesini sürdürebilmesi için mükemmel bir şekilde korunmaktadır. MSS'nin homeostatik bir ortamda çalışması için bu koruma işini kan-beyin bariyeri (KBB) üstlenir. KBB, spesifik transport sistemleri ile nöronal fonksiyonlar için gerekli maddelerin geçişine izin veren, beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden koruyan, özelleşmiş, karmaşık hücrel bir sistemdir. KBB, madde geçişini hem fiziksel hem de metabolik bariyerler sayesinde kontrol eder (1).

KBB yıkımı ve fonksiyon bozuklukları, MSS patolojilerinde anahtar rol oynamaktadır. KBB yetmezliğine yol açan veya KBB yetmezliği nedeniyle ortaya çıkan hastalıklara her geçen gün yenileri eklenmektedir. KBB fonksiyon bozuklukları, değişken derecede geçici veya kronik olabilmektedir. İskemi, reperfüzyon, travma, akut hipertansiyon, epilepsi, Alzheimer hastalığı, multipl skleroz gibi hastalıklar dışında manyetik alanda da geçici KBB geçirgenlik değişiklikleri gözlenmektedir (1, 30).

Hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT), basınç odası içerisinde 1 atmosfer mutlak basınçtan (ATA) daha yüksek basınç altında %100 oksijen solunması temeline dayanan, medikal bir tedavi yöntemidir (30). HBOT ile oksijenin plazmada çözünürlüğü ve taşınması hemoglobinden bağımsız olarak artırılmaktadır. HBOT günümüzde arteriyel gaz embolisi, karbonmonoksit (CO) zehirlenmeleri, dekompresyon hastalığı, diyabetik ayak gibi iyileşmeyen problemlili yaralarda, radyasyon nekrozu, nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonları, gazlı gangren ve dirençli osteomyelitlerde ana veya yardımcı tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (32). Ancak HBOT'nin, serbest radikal üretiminde artışa yol açarak MSS'de toksisiteye neden olduğu ve bu etkinin özellikle 3 ATA ve üzerindeki basınçlarda uygulandığında meydana geldiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra basınç değişiklikleri nedeniyle akut olarak başta orta kulak barotravması olmak üzere, sinüs barotravmaları ve uzun süreli tedavilerde geçici miyopi gibi istenmeyen yan etkileri ortaya çıkabilmektedir (30).

Hiperbarik oksijenin (HBO), sağlıklı canlıların hasar görmemiş KBB üzerine etkileri ile ilgili çalışmalar sınırlı sayıda ve yetersizdir. Çalışma sayısının azlığının yanı sıra, sonuçlarının da farklı olması dikkat çekmektedir. Sağlıklı sıçan ve kedilerde yapılan bir çalışmada HBO'nun, beyin damar geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (44). Buna karşın yapılan başka

bir çalışmada, HBO benzer koşullarda uygulanmış, ancak beyin damar geçirgenliğinde herhangi bir değişiklik gözlenmediği bildirilmiştir (26).

Beyin ödemi tedavisinde, HBO kullanımı ile yapılan deneysel çalışmaların sonuçları da olumlu görünmektedir. HBO'nun, sıçan ve farelerde oluşturulan fokal serebral iskemi sonrası ortaya çıkan beyin demini ve KBB geçirgenliğini azalttığı bildirilmiştir (71). Tavşanlarda oluşturulan global serebral iskemi sonrası uygulanan HBO'nun, beyin kan akımını azalttığını, KBB geçirgenliğini azalttığı gösterilmiştir (47). Bu çalışmalarda da, HBO'nun hasar gören KBB zerine onarıcı etkilerinden söz edilmektedir.

Bu deneysel çalışma, sağlıklı sıçanlarda, hiperbarik ortamda solunan hava ve oksijenin, MSS'nin ana savunma hattı olan KBB zerine etkilerini aydınlatmayı amaçlamaktadır. Elde edilecek verilerin, HBO ve hiperbarik ortam maruziyetinin MSS zerindeki etkilerinin anlaşılmasında bir basamak olması beklenmektedir.

## II- GENEL BİLGİLER

### A- HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİ

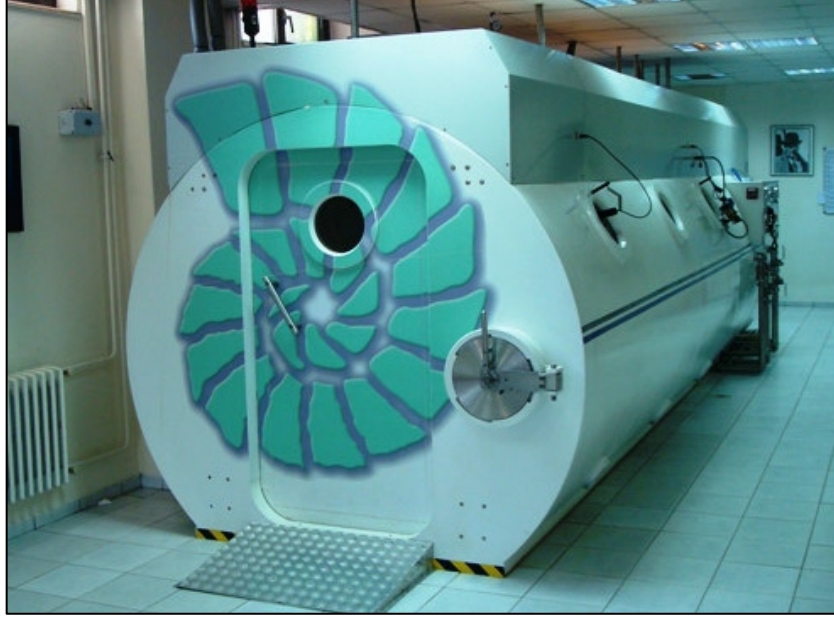
#### 1. Tanım

HBOT, hastalara veya deneklere 1 atmosfer mutlak basınçtan (1 ATA=760 mmHg=1 bar) daha yüksek basınçlarda, belirli sürelerle aralıklı veya sürekli %100 oksijen solutulması ile yapılan sistemik, medikal bir tedavi yöntemidir (30). 1 ATA ve altındaki basınç değerlerinde %100 oksijen uygulamaları, lokal uygulamalar HBOT olarak kabul edilmemektedir. Tedavinin uygulandığı basınç değeri 2-3 ATA arasında olup, tedavi süresi ve seans sayıları hastanın tanısına ve klinik durumuna göre belirlenmektedir.

HBOT uygulamaları için temelde tek kişilik (Şekil 1) ve çok kişilik (Şekil 2) olmak üzere iki tip basınç odası sistemi kullanılır. Tek kişilik basınç odalarında hastalar hava veya oksijen ile basınç altına alınır. Bu sistem kullanıldığında, hasta oksijen ile basınç altına alınır, ortamdaki oksijeni sürekli olarak soluyarak, hava ile basınç altına alınır, maske ile oksijen soluyarak tedavi olmaktadır. Çok kişilik basınç odalarında ise hastalar hava ile basınç altına alınmakta, daha fazla hasta aynı anda maske, başlık veya endotrakeal tüp yoluyla oksijen alabilmektedir (16, 39).



**Şekil 1.** Tek kişilik basınç odası, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı



**Şekil 2.** Çok kişilik basınç odası, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı

## 2. Tarihçe

Hastaların basınç odasına alınarak tedavi edilmesi başlangıçta bilimsel temellere dayanmamıştır. İlk kez 1662 yılında İngiliz rahip Henshaw, sezgilerine dayanarak “Domicilium” adını verdiği basınç odasında akut hastalıkları yüksek, kronik hastalıkları ise düşük basınçta tedavi etmeye başlamıştır. 19. yy’da Avrupa’da birçok pnömotik enstitü kurulmuş ve hiperbarik tedaviler yapılmıştır, ancak hiçbir bilimsel sonuç elde edilememiştir. 1879 yılında Fransız bir cerrah olan Fountaine, mobil basınçlanabilir bir ameliyathane inşa etmiştir. Bu ameliyathane içerisinde nitroz oksit ile anestezi uygulayarak opere ettiği hastalarda, anestezi derinliğinin arttığını ve siyanozun olmadığını gözlemiştir. 1930’lu yılların sonuna kadar devam eden hiperbarik hava tedavileri içinde, Fountaine’nin çalışmalarının tek yarı bilimsel çalışmalar olduğu söylenebilir (33, 40). Kansas Üniversitesi’nde anestezi profesörü olarak çalışan Orville J. Cunningham, hipoksi krizlerinin basınç odasında tedavi edilebildiğini hastalar üzerinde göstermiştir. Cunningham, bir hastasının hediyesi olarak yapılan, 64 feet (19,5 m) çapında 72 odalı dev bir küre şeklinde ve bugüne kadar inşa edilmiş en büyük basınç odası (Steel Ball Hospital) içerisinde çeşitli hastaları tedavi etmiş, kültürde üretilemeyen bazı mikroorganizmaların basınç altında üremediğini gözlemiştir. Ancak



kendinden istenen bilimsel kanıtları sunmaması nedeniyle 1930 yılında Amerikan Tıp Birliği tarafından çalışmaları durdurulmuştur (33, 40).

Oksijen birbirinden bağımsız iki kişi tarafından yaklaşık aynı dönemlerde keşfedilmiştir. Carl Wilhelm Scheele 1772 yılında oksijeni keşfetmiş ancak ilk kez 1775 yılında Joseph Priestly oksijen ile ilgili çalışmalarını yayımlamıştır. Oksijenin hiperbarik tıp alanında kullanımı için 150 yıldan fazla zaman geçmesi gerekmiştir (33, 40).

Hiperbarik tıp alanındaki asıl gelişmeler, basınçlı tünel işçiliği ile 1845’de Fransa’da Loire nehri yatağının kazılarında, Triger’in işçilerde görülen disbarik yakınmaları tanımlaması ile başlamıştır (21, 33, 40). Tıpta ilk kez Behnke ve Shaw tarafından 1937’de dekompresyon hastalığında HBOT kullanılmıştır (18).

HBOT’nin dalış hastalıkları dışında kullanımı 1955’de başlamıştır. Churchill Davidson HBOT’yi kanserli hastalarda radyoterapinin etkisini arttırmak amacıyla kullanmıştır. 1960’da Boerema, hiperbarik oksijen ve volüm desteği ile tedavi ettiği, ölümcül derecede anemik olan domuzlarla ilgili makalesini “*Life Without Blood (kansız hayat)*” başlığıyla yayımlamış ve ardından HBOT kalp cerrahisinde kullanılmaya başlanmıştır. Aynı yıl Sharp ve Smith tarafından ilk CO zehirlenmesi vakası HBOT ile tedavi edilmiştir. 1961’de Boerema ve Brummelkamp gazlı gangren olgularını basınç odasında tedavi etmeye başlamışlardır. Kalp cerrahisinde yeni gelişmeler ile 1970 yıllarında bu alanda HBOT kullanımı terk edilmiştir (18, 33, 40).

HBOT ile ilgili ilk uluslararası toplantı 1963 yılında Amsterdam’da yapılmıştır. Bu dönemde HBOT bilimsel temeli olmayan birçok hastalıkta da kullanılmıştır. Bu nedenle Amerika Birleşik Devletlerinde kurulan Sualtı ve Hiperbarik Tıp Cemiyeti (UHMS; Undersea and Hyperbaric Medical Society ), 1970’lerin sonunda HBOT’nin temel kural ve prensiplerini yayımlamıştır. Daha sonraki yıllarda Avrupa’da kurulan diğer benzer örgütler (EUBS; European Underwater and Baromedical Society, ECHM; European Committee for Hyperbaric Medicine) her yıl düzenlenen toplantılarla, yeni çalışmalar ışığında HBOT ile ilgili ortak kararlar alınmasını sağlamıştır. HBOT endikasyonları ile ilgili ilk yazılı doküman ise 1994 yılında yayımlanmıştır (33).

Günümüzde HBOT uygulaması ile ilgili eğitim disiplinlerinin geliştirilmesi, bilimsel temeli olan birçok çalışmanın yapılması ve paylaşılması ile endikasyonlar ve HBOT’nin tıp alanındaki yeri net olarak belirlenmiştir.

### 3. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Etki Mekanizmaları

#### a. Fiziksel Temel

HBOT kapalı bir sistem içerisinde basıncın arttırılması ile oksijen solunarak yapılan bir tedavi yöntemi olduğundan, etkilerinin anlaşılabilmesi için bazı gaz kanunlarının hatırlanması gereklidir. Gaz kanunları, gazların sıcaklık, basınç ve hacim ilişkilerini açıklayan bazı kanunlardır.

#### (1). İdeal Gaz Kanunu

İdeal gaz kanunu; gazların hacim, termodinamik sıcaklık ve basınçları arasındaki ilişkiyi açıklayan kanundur. Boyle gaz kanunu (1662), Charles gaz kanunu (1787-1802) ve Gay-Lussac gaz kanunu (1809) birleşerek toplam gaz kanununu oluştururlar. Bu kanuna Avogadro yasası da (1811) eklenerek ideal gaz kanunu oluşturulmuştur. Avogadro yasası, eşit hacim, sıcaklık ve basınçtaki gazların aynı sayıda parçacık veya molekül içerdiğini savunur. Bu yasaya göre, ideal gaz sabitinin tüm gazlar için aynı olduğu sonucuna varılır. İdeal gaz kanunu aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$P.V = n.R.T$$

P: Basınç (paskal)

V: Hacim (m<sup>3</sup>)

n: Gazın mol sayısı

T: Sıcaklık (Kelvin: <sup>0</sup>K)

R: Gaz sabiti (8,3145 J/mol <sup>0</sup>K)

#### (2). Boyle Gaz Kanunu

Sabit sıcaklıkta, belli bir kütledeki gazın hacmi ile basıncı ters orantılıdır. Boyle gaz kanunu aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$P.V = k \text{ (T sabit)}$$

P: Basınç

V: Hacim

k: Sabit

Arteriyel gaz embolisi ve dekompresyon hastalığı gibi HBOT gerektiren bazı patolojilerin tedavisi bu kanuna dayanır. Artan basınç ile gaz kabarcıklarının hacminde

küçülme sağlanır. Ayrıca HBOT'nin yan etkilerinden biri olan barotravmalar, Boyle gaz kanunu ile açıklanır (42).

### **(3). Charles ve Gay-Lussac Gaz Kanunları**

Sabit hacimli bir gazın, basıncı ile sıcaklığı doğru orantılıdır (L. Gay-Lussac). Sabit basınç altında, gazların hacimleri, sıcaklıkları ile doğru orantılıdır (J. Charles). Her iki kanunda aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$P_1 / T_1 = P_2 / T_2 \text{ (V:sabit)}$$

P: Basınç

V: Hacim

T: Sıcaklık

Basınç odalarında, basınç hızlı bir şekilde arttırılırsa ortam sıcaklığı artar (36). Hacmi sabit olan basınç odalarında, sıcaklık artışı da basıncın artışına sebep olur. Bu nedenle hiperbarik sistemlerde sıcaklığın kontrol altında tutulması gerekmektedir.

### **(4). Henry Gaz Kanunu**

Sabit sıcaklıkta bir sıvı içerisinde çözünen gaz miktarı, o gazın parsiyel basıncı ile doğru orantılıdır. Her bir gazın, farklı sıvılar için çözünürlük kat sayısı farklıdır ve sıcaklıkla değişir (36).

Oksijen, normal koşullar altında, akciğerlerden %97'si hemoglobine bağlı, %3'ü ise plazmada çözünerek dokulara taşınır. Deniz seviyesinde arteriyel oksijen saturasyonu %97,5'dur. 1 gram hemoglobin 1,34 ml oksijen ile bağlanır. Hemoglobin değeri 15 gr/dl (100 ml) olan normal bir insanda, 100 ml kanda 19,5 ml oksijen taşınabilir. Kapiller seviyede oksijen saturasyonu %75'e, parsiyel oksijen basıncı 40 mmHg' ya düşer. Dolayısıyla taşınan oksijen miktarı 14,5 ml'ye düşer; 100 ml kan ile yaklaşık 5 ml oksijen dokulara transfer edilir (36). HBOT ile plazmada çözünen oksijen miktarı artar. 2,8 ATA'da %100 oksijen solunmasıyla, 100 ml kanda çözünen oksijen miktarı 6 ml olmaktadır. Bu değer, tek başına hemoglobinden bağımsız olarak dokuların oksijen ihtiyacını karşılamaya yetecek düzeydedir. Ayrıca Henry gaz kanunu, dekompresyon hastalığı oluşum mekanizmasını da açıklamaktadır.

### **(5). Dalton Gaz Kanunu**

Bir gaz karışımının basıncı, karışımdaki her bir gazın kısmi basınçlarının toplamına eşittir. Aşağıdaki formül ile ifade edilir.

$$P_T = P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n$$

$P_T$ : Gaz karışımının toplam basıncı

$P_1 + P_2 + P_3 + \dots + P_n$ : Karışımındaki gazların kısmi basınçları toplamı

Soluduğumuz havanın yaklaşık %21'ini oksijen, %78'ini nitrojen, kalan %1'ini diğer gazlar oluşturur. Yerküre ve tüm canlılar, atmosfer tarafından uygulanan bir basınç altındadır. Bu basınç değeri deniz seviyesinde  $1 \text{ kg/cm}^2$ ,  $760 \text{ mmHg}$  ve  $1 \text{ ATA}$ 'ya eşittir. Dalton gaz kanununa göre havadaki oksijenin parsiyel basıncı  $21/100 \times 760 \text{ mmHg} = 159,6 \text{ mmHg}$  (yaklaşık  $160 \text{ mmHg}$ ) veya  $0,2 \text{ ATA}$  olmaktadır. Örneğin ortam basıncı 2 katına çıkarıldığında oksijenin parsiyel basıncı da doğru orantılı olarak artar ve  $320 \text{ mmHg}$  veya  $0,4 \text{ ATA}$  olmaktadır (36).

## **b. Fizyolojik Etkileri**

HBOT'nin etkisi iki temel mekanizma üzerinden olmaktadır. Bunlar doğrudan basıncın mekanik etkisi ve parsiyel oksijen basıncında artış ile ortaya çıkan etkilerdir (30).

### **(1). Basıncın Mekanik Etkisi**

Boyle gaz kanununa göre basınç arttığında gazların hacimleri küçülür. Dekompresyon hastalığı, gaz embolileri ve gazlı gangrende olduğu gibi doku içerisinde gaz kabarcıklarının olduğu patolojilerde, doğrudan basıncın etkisiyle kabarcıkların küçülmesi hedeflenir. Küçülen gaz kabarcığının yüzey gerilimi artar ve dengesizleşir, hızla kollabe olma eğilimindedir. Aynı zamanda kabarcık içerisindeki nitrojen, HBOT ile sağlanan yüksek gradiyentteki oksijen ile yer değiştirerek kabarcığın daha kolay elimine olmasını sağlar. Kabarcık tamamen yok edilemese de çevre dokuya yaptığı baskı ve dolaşım bozukluğu ortadan kaldırılır. Damar içinde özellikle silindirik yapıdaki gaz kabarcıkları, pıhtılaşma mekanizmalarını aktive etmektedir. Basıncı etkisi ile bu kabarcıklar daha küçük küresel formlara dönüşmektedir (30).

Vücutta fizyolojik olarak gaz içeren organ ve sistemlerde de benzer etkiler görülmektedir. Basınç arttırılması ve düşürülmesi sırasında oluşabilecek bazı yan etkiler de bu şekilde açıklanır.

## (2). Yüksek Parsiyel Oksijen Basıncının Etkileri

Hemoglobin normal şartlar altında oksijen ile %97 oranında satüre durumdadır. Bu nedenle normobarik ortamda oksijen solunması ile hemoglobinin oksijen ile en fazla %100 satüre olur, plazmada çözünen oksijen miktarında hafif bir artış gözlenir. HBOT yüksek parsiyel oksijen basıncı sağlayarak plazmada çözünen oksijen miktarını artırmaktadır. Örneğin 2,8 ATA' da oksijen solunması ile parsiyel oksijen basıncı 10-13 kat artmaktadır bu da yaklaşık 100 ml plazma ile 6 ml oksijen taşınmasını sağlar. CO zehirlenmesi gibi hemoglobinin oksijen taşıyamadığı durumlarda HBOT'nin bu etkisinden yararlanılır (30).

HBOT ile venöz kandaki hemoglobin de tamamen oksijen ile satüre durumdadır. Karbondioksitin ( $\text{CO}_2$ ) bir kısmı kanda hemoglobine bağlanarak taşınmaktadır. Hemoglobin ile taşınamayan  $\text{CO}_2$  plazmada çözünür, hafif bir asidoza yol açar. Ancak sağlıklı bir organizmada bu herhangi bir sorun oluşturmaz. Kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi  $\text{CO}_2$  atılımının yetersiz olduğu durumlarda ciddi retansiyon gelişebilir (30).

Plazmada yüksek oranda çözünen oksijenin, hastaların fizyolojik ve patofizyolojik durumlarına bağlı olarak, çeşitli organ, doku ve biyokimyasal reaksiyonlar üzerinde sayısız etkisi vardır. Gazlı gangrende alfa toksin üretiminin baskılanması, lökositlerin antimikrobiyal etkinliğinde artış, kapiller duvarlarda lökosit adezyonunda azalma, hipoksik olmayan bölgelerdeki damarlarda vazokonstriksiyon, kapiller proliferasyonda artış, fibroblast çoğalması ve kollajen üretiminin uyarılması, süperoksit dismutaz stimülasyonu, adenosin trifosfat (ATP) üretiminin sağlanmasıyla doku ödeminde gerileme, CO zehirlenmesinde lipid peroksidasyonunun engellenmesi, osteoklastik aktivite artışı, oküler lenste esnekliğin azalması, sürfaktan sentezinde azalma bunlardan bazılarıdır (30).

**Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkileri:** Hiperoksi, doku ve organlarda vazokonstriksiyon ve kardiyak after-load artışına neden olur. Kalp hızında yavaşlama ve kan basıncında artış tespit edilir. Kalbin dakika atım hacmi bir miktar düşer, ancak atım volümü ve kontraktilite değişmez (17, 30).

**Antiödem Etkisi:** HBOT ile oluşan hiperokside, birçok doku ve organda vazokonstriksiyon meydana gelir. Kompartman sendromunda, yanık olgularında ve serebral ödemde bu etkiden faydalanılarak ödemin azaltılması amaçlanır. Ancak bu vazokonstriktif etki kanlanmanın bozulduğu hipoksik bölgelerde gözlenmemektedir. HBOT, hipoksi ile bozulan kapiller geçirgenliği düzenleyici etki gösterir (17, 30).

**Antihipoksik Etkisi:** Plazmada çözünen oksijen miktarında artış, hemoglobinden bağımsız olarak doku ve hücrelere oksijen taşınması sağlamaktadır. Bu artış, oksijenin daha uzak mesafelere difüzyon ile ulaşmasını kolaylaştırır. Dolayısıyla HBOT periferik iskemilerde olduğu gibi doku oksijenlenmesinin bozulduğu durumlarda veya CO zehirlenmesi, derin anemide olduğu gibi, hemoglobin ile oksijen taşınmadığı durumlarda tedavi edici ajan olarak kullanılmaktadır (17, 30).

**Antibakteriyel ve Antitoksik Etkileri:** Dokuda oksijen konsantrasyonu arttığında mikroorganizmaların metabolik fonksiyonlarını yerine getirmesi ve çoğalması zorlaşır. HBOT ve hiperoksi, antioksidan sistemleri yetersiz olan anaerobik mikroorganizmalarda, oksijen radikalleri ile DNA, RNA hasarına ve protein fonksiyonlarında bozukluğa yol açarak bakteriyostatik veya bakterisidal etki göstermektedir. Ancak deneysel çalışmalarda 1,5 ATA ve altında HBOT, aerobik mikroorganizmalarda çoğalmayı artırmaktadır (17). Bu nedenle terapötik dozun belirlenmesi önem taşır. HBOT enfekte ve hipoksik bölgede yüksek oksijen konsantrasyonu sağlayarak, nötrofiller tarafından fagosite edilen bakterilerin oksijen radikalleri ile öldürülmesinde etkili olur. Ayrıca HBOT, bakteriyel ekzotoksin üretimini baskılaması nedeniyle (*Cl. perfringens* alfa ve teta toksini) gazlı gangren tedavisinde önemli bir yere sahiptir (34, 56).

Aminoglikozitlerin hipoksik durumlarda bakteriye penetrasyonu zayıftır. HBOT başta aminoglikozitler olmak üzere, trimetoprim-sulfometoksazol, siprofloksasin gibi antibakteriyel ajanların etkilerini de artırmaktadır (46, 56).

**Yara İyileşmesi Üzerine Etkileri:** Yara, doku veya organın anatomik bütünlüğünün bozulmasıdır. Organizma yaralanmayı takiben onarım faaliyetlerine başlar. Yara iyileşmesi birçok sistemin bir arada çalıştığı, iç içe geçmiş çok aşamalı bir süreçtir. Bu süreç içerisindeki bazı aşamalar ise oksijen bağımlıdır. Yara bölgesi, başta fibroblast ve makrofajlar olmak üzere, birçok hücre ve büyüme faktörünü barındıran, hipoksik, asidotik ve ödemli bir ortamdır (61). Yara bölgesindeki düşük oksijen basıncı, erken dönemde; büyüme faktörleri, sitokin sentezi ve salınımını, gen aktivasyonunu, angiogenezi ve rejenerasyonu uyarır (43). Oluşan yeni vasküler yapının olgunlaşabilmesi için doku oksijen basıncının normal olması gereklidir (66). Fibroblast ve endotel hücreleri en iyi replikasyonu, parsiyel oksijen basıncı 30-80 mmHg arasıdayken gösterir, maksimum kollajen sentezi ise 20-60 mmHg parsiyel oksijen basıncında olmaktadır (53). Kollajen sentezinin ana basamağı olan prolin hidroksilasyonu ve çapraz bağ oluşumunu sağlayan lizil oksijenaz enziminin hızı, oksijen konsantrasyonu ile

korelasyon göstermektedir. Epitelizasyon ise oksijen basıncına bağımlıdır ve vaskülarizasyonun yeterli olması gerekmektedir.

HBOT yara dokusunda; hipoksiyi giderir, yara bölgesine substrat desteği sağlar, fibroblast proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu uyarır, kollajen sentezini artırır ve stabilizasyonuna yardımcı olur, anjiogenezi hızlandırır, granülasyon dokusunun oluşumunu, epitelizasyonu ve yara gerimini artırır, kapiller permeabiliteyi düzenleyerek ödemi azaltır, antimikrobiyal etkiyi artırır, iskemi reperfüzyon hasarını azaltır (54).

HBOT bu etkileri nedeniyle, özellikle vasküler nedenli iyileşmenin sorun olduğu periferik arteriyel hastalıklar ve diyabetik ayak yaralarında, radyasyon hasarlarında, greft ve flep sağ kalımını arttırmada yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

**Merkezi Sinir Sistemi Üzerine Etkileri:** HBOT ile artan parsiyel oksijen basıncı, MSS kan akımlarında, elektriksel aktivitesinde ve metabolik süreçlerinde değişikliğe neden olur. Ancak tüm bunlar tam aydınlatılabilmiş değildir. Bu değişikliklerden biri aynı zamanda HBOT komplikasyonu olan MSS oksijen toksisitesi olarak karşımıza çıkmaktadır (36).

#### **4. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Endikasyonları**

UHMS tarafından 2003 yılında kesinleştirilmiş HBOT endikasyonları Tablo 1’de sunulmuştur (24).

ECHM tarafından 2004 yılında belirlenen HBOT endikasyonları ise 3 sınıfta toplanmıştır. Bunlar Tip 1 (HBOT kuvvetle önerilen), Tip 2 (HBOT önerilen) ve Tip 3 (opsiyonel) olmak üzere ayrılmıştır (Tablo 2). HBOT uygulanan durumlar ile ilgili çalışmalar incelenmiş ve kanıt düzeyine göre A ile F arasında derecelendirilmiştir. Kanıt seviyesi A, birbiriyle uyumlu en az iki tane tarafsız, geniş, randomize, çift kör çalışmayı tanımlamaktadır. Kanıt seviyesi F ise var olan kanıtlarla HBOT kullanılmaması gereken durumlardır (67).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı tarafından kabul edilen HBOT endikasyonları ise Tablo 3’de özetlenmiştir (31).

1. Hava veya gaz embolisi
2. Karbonmonoksit zehirlenmesi / Siyanür zehirlenmesi
3. Gazlı gangren
4. Akut travmatik iskemiler (crush yaralanması / kompartman sendromu)
5. Dekompresyon hastalığı
6. Seçilmiş problemli yaralarda yara iyileşmesine destek
7. Aşırı kan kaybı (anemi)
8. İntrakranial abse
9. Nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonları
10. Refrakter Osteomyelit
11. Geç radyasyon hasarı (yumuşak doku ve kemik nekrozu)
12. Tutması şüpheli greft ve flepler
13. Termal yanıklar

**Tablo 1.** UHMS tarafından belirlenmiş HBOT endikasyonları (24)



| DURUMLAR                                                           | KABUL EDİLEN   |   |   | KABUL EDİLMEYEN |   |   |
|--------------------------------------------------------------------|----------------|---|---|-----------------|---|---|
|                                                                    | Kanıt Seviyesi |   |   | Kanıt Seviyesi  |   |   |
| Tip 1 (Kuvvetle Önerilen)                                          | A              | B | C | D               | E | F |
| Karbonmonoksit zehirlenmesi                                        |                | X |   |                 |   |   |
| Crush yaralanması                                                  |                | X |   |                 |   |   |
| Diş çekimi sonrası osteoradyonekrozun önlenmesi                    |                | X |   |                 |   |   |
| Osteoradyonekroz (mandibula)                                       |                | X |   |                 |   |   |
| Yumuşak doku radyonekrozu (sistit)                                 |                | X |   |                 |   |   |
| Dekompresyon hastalığı                                             |                |   | X |                 |   |   |
| Gaz embolisi                                                       |                |   | X |                 |   |   |
| Anaerobik veya miks bakteriyel anaerobik enfeksiyonlar             |                |   | X |                 |   |   |
| Tip 2 (Önerilen)                                                   |                |   |   |                 |   |   |
| Diyabetik ayak lezyonları                                          |                | X |   |                 |   |   |
| Riskli deri grefti ve muskulokutan flep                            |                |   | X |                 |   |   |
| Osteoradyonekroz (diğer kemikler)                                  |                |   | X |                 |   |   |
| Radyasyona bağlı proktit/enterit                                   |                |   | X |                 |   |   |
| Radyasyona bağlı yumuşak doku lezyonları                           |                |   | X |                 |   |   |
| Radyon uygulanmış dokularda cerrahi ve implantasyon (işlem öncesi) |                |   | X |                 |   |   |
| Ani işitme kaybı                                                   |                |   | X |                 |   |   |
| İskemik ülser                                                      |                |   | X |                 |   |   |
| Refrakter kronik osteomyelit                                       |                |   | X |                 |   |   |
| Nöroblastom evre 4                                                 |                |   | X |                 |   |   |
| Tip 3 (Opsiyonel)                                                  |                |   |   |                 |   |   |
| Post-anoksik ensefalopati                                          |                |   | X |                 |   |   |
| Larinks radyonekrozu                                               |                |   | X |                 |   |   |
| Radyasyona bağlı santral sinir sistemi lezyonu                     |                |   | X |                 |   |   |
| Vasküler girişim sonrası reperfüzyon hasarı                        |                |   | X |                 |   |   |
| Uzuv reimplantasyonu                                               |                |   | X |                 |   |   |
| Yüzey alanı %20'yi ve 2. dereceyi geçen yanıklar                   |                |   | X |                 |   |   |
| Akut iskemik oftalmolojik hastalıklar                              |                |   | X |                 |   |   |
| İnflamatuvar sürece sekonder iyileşmeyen yaralar                   |                |   | X |                 |   |   |
| Pnömatosis sistoides intestinalis                                  |                |   | X |                 |   |   |
| Diğer Endikasyonlar                                                |                |   |   |                 |   |   |
| Post sternotomi mediastinit                                        |                |   |   | X               |   |   |
| İnme                                                               |                |   |   | X               |   |   |
| Orak hücreli anemi                                                 |                |   |   | X               |   |   |
| Malign otitis eksterna                                             |                |   |   | X               |   |   |
| Akut miyokard infarktüsü                                           |                |   |   | X               |   |   |
| Femur başı nekrozu                                                 |                |   |   | X               |   |   |
| Retinitis pigmentosa                                               |                |   |   |                 | X |   |
| Tinnitus                                                           |                |   |   |                 | X |   |
| İnterstisyel sistit                                                |                |   |   |                 | X |   |
| Fasial paralizi                                                    |                |   |   |                 | X |   |
| Serebral palsi                                                     |                |   |   |                 |   | X |
| Multipl skleroz                                                    |                |   |   |                 |   | X |
| Fetoplasental yetmezlik                                            |                |   |   |                 |   | X |

Tablo 2. ECHM 2004, HBOT endikasyonları (67)

1. Dekompresyon hastalığı
2. Hava veya gaz embolisi
3. Karbonmonoksit, siyanid zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu
4. Gazlı gangren
5. Yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları (deri, kas, fasya)
6. Crush yaralanması, kompartman sendromu ve diğer akut travmatik iskemiler
7. Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar (diyabetik ve non-diyabetik)
8. Kronik refrakter osteomyelit
9. Aşırı kan kaybı
10. Radyasyon nekrozları
11. Tutması şüpheli deri flep ve greftleri
12. Termal yanıklar
13. Beyin apsesi
14. Anoksik ensefalopati
15. Ani işitme kaybı
16. Retinal arter oklüzyonu
17. Kafa kemikleri, sternum ve vertebraların akut osteomyelitleri

**Tablo 3.** Sağlık Bakanlığı HBOT endikasyon listesi (31)

## **5. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Komplikasyonları, Yan Etkileri ve Kontrendikasyonları**

### **a. Komplikasyonlar ve Yan Etkiler**

En sık karşılaşılan yan etki barotravmalardır. Barotravma vücutta hava dolu boşluklarda, basınç değişikliğine bağlı olarak oluşan hasarlardır. HBOT uygulamaları sırasında en sık orta kulak barotravması görülür. Orta kulaktaki hava hacmi basınç artışına bağlı olarak küçülür (Boyle gaz kanunu) ve negatif basınç oluşur. Oluşan negatif basınç çevre dokuyu içeri çekerek, ödem, eksüdasyon, kanama ve kulak zarında perforasyona sebep

olabilir. Valsalva manevrası, yutkunma gibi bazı manevralarla östaki borusundan orta kulağa hava geçişi ile basınç eşitlenmesi sağlanarak bu durum engellenir. Hasta eğitimi, basınç artış hızının yavaşlatılması ile orta kulak barotravmasının önüne geçilebilir. Orta kulak barotravmalarına bağlı hasarlar tedavi için kesin kontrendikasyon oluşturmaz ve endikasyona göre değerlendirilir. Acil tedavi gerektiren durumlarda ise barotravma göz ardı edilebilir veya miringotomi seçenek olarak değerlendirilebilir. Etkilenebilecek başka bir bölge ise paranasal sinüslerdir. Valsalva manevrası ile paranasal sinüslerde basınç eşitlenmesi sağlanır. Ancak hava geçişini engelleyecek kitle (mukosel vb) veya mukozal ödeme sebep olan durumlarda (alerjik rinit, üst solunum yolu enfeksiyonu) barotravma görülür. Nadiren orta kulakta aşırı negatif basınç oluşması veya güçlü valsalva manevrası yapılmasıyla iç kulak barotravması gözlenir. Dış kulak yolunda tıkalı lezyon veya buşon oluşumları nedeniyle ve iyi yapılmamış dental dolgular da barotravma gözlenebilmektedir. Cerrahi işlem sonrası gastrointestinal sistem ve oküler barotravmalar da bildirilmiştir (60).

En ciddi barotravma ise akciğer barotravmasıdır. Tedavi sonrası basıncın düşürülmesi sırasında, akciğerde hava hapsine neden olan lezyonlarda (kist, kavern vb), bronşiyal obstrüksiyonda veya glottisin kapalı olduğu durumlarda alveoler rüptür meydana gelebilir. Pnömotoraks, pnömomediastinum, cilt altı amfizem ve gaz embolisine neden olabilecek bu durum acil tedavi gerektirir. Bu nedenle, HBOT için hasta seçimi dikkatli yapılmalıdır (41).

HBOT'nin 3 ATA ve üzeri basınçlarda uygulanması ile MSS'de oksijen toksisitesi görülür. Standart HBOT protokolleri bu basınç değerinin altındadır. Ancak, konvülsiyona yatkın olan veya epilepsi hikayesi olanlarda, tedavi basınçlarında da toksisite gözlenebilir. Dekompresyon hastalığı tedavisinde olduğu gibi uzun süreli HBOT gerektiren durumlarda, solunum sıkıntısı, substernal ağrı ve öksürük semptomları ile karşımıza çıkan pulmoner toksisite gözlenebilir. Aralıklı oksijen solunması ile toksisitenin önüne geçilebilir (35, 41).

HBOT, bazı kişilerde, uzun süreli tedavi ile geri dönüşümlü miyopiye neden olmaktadır. Lens proteinlerinde oksidasyon nedeniyle olduğu öne sürülen bu durum haftalar içerisinde gerilemektedir (41, 55).

## **b. Kontrendikasyonlar**

HBOT'nin kesin olarak kontrendike olduğu durum tedavi edilmemiş pnömotorakstır. Rölatif kontrendikasyonlar tablo olarak verilmiştir (Tablo 4). Bu durumlarda hastanın kliniği ve tedavinin sağlayacağı fayda değerlendirilerek karar verilir (35, 41).

1. Üst solunum yolu enfeksiyonları
2. CO<sub>2</sub> retansiyonu ile birlikte olan amfizem
3. Radyografide hava hapsine yol açabilecek asemptomatik lezyonlar
4. Spontan pnömotoraks öyküsü
5. Kontrol edilemeyen yüksek ateş
6. Konvülsif bozukluklar
7. Toraks ve kulak cerrahisi sonrası, otoskleroz nedeniyle protez uygulananlar
8. Gebelik
9. Klostrofobi
10. Malign hastalık

**Tablo 4.** HBOT rölatif kontrendikasyonları (35, 41)

## **B- KAN-BEYİN BARIYERİ**

### **1. Tanım**

Kan-beyin bariyeri (KBB), spesifik transport sistemleri ile nöronal fonksiyonlar için gerekli maddelerin geçişine izin veren, beyni kanda dolaşan zararlı maddelerden ve toksinlerden koruyan, özelleşmiş, karmaşık hücresel bir sistemdir. KBB, madde geçişini hem fiziksel (sıkı bağlantılar), hem de metabolik (enzimler ve transport sistemleri) bariyerler sayesinde kontrol eder. KBB yıkımı ve fonksiyon bozuklukları, MSS patolojilerinde anahtar rol oynamaktadır (15, 23).

### **2. Tarihçe**

KBB varlığını ilk kez 1885’de Alman mikrobiyolog Paul Ehrlich ortaya çıkarmıştır. Ehrlich, triptan mavisi olarak bilinen doku boya maddesini intravenöz olarak verdiği hayvanlarda, sadece beyin dokusunun boyanmadığını görmüştür. Ancak boyanın beyin dokusuna geçmemesini, boyayı bağlayacak protein olmamasına bağlamıştır. 1909’da Edwin Goldman aynı boyayı beyin omurilik sıvısı (BOS) içerisine enjekte etmiş ve beyin dışında

boyanma olmadığını gözlemiştir. Bu deney, beyin ile kan arasında bir bariyer olması dışında beyin ile BOS arasında bariyer olmadığını da ortaya koymuştur (10, 23).

Daha önceleri KBB'yi glial hücrelerin oluşturduğuna inanılmıştır (Dempsey ve Wislocki 1955). 1960'lı yıllarda, Reese ve Karnovsky (1967), Brightman ve Reese (1969), bir traser olan horseradish peroksidazı intravenöz ve intratekal uygulayarak elektron mikroskopisinde ultrastrüktürel düzeyde KBB yapısını göstermişlerdir. Bu deneyler beyin vasküler endotel hücrelerinin, KBB'nin birincil yapıları olduğunu ve vücudun diğer bölgelerindeki endotel hücrelerinden farklı olduğunu ortaya koymuştur (10, 19).

Elektron mikroskopisi kullanımı ve farklı traserlerin takibi ile KBB yapısı ve geçirgenliği ile ilgili çalışmalar hızla devam etmiştir. 1987'de Gross ve Weindl, beyinde sirkumventriküler organlar olarak bildiğimiz bölgelerde KBB yapısı olmadığını göstermişlerdir. Risau ve Wolburg (1990) kan-beyin omurilik sıvısı bariyerini (KBOSB), Strazielle ve arkadaşları (2004) ise kan-retina bariyerini açıklamışlardır (10).

Günümüzde, KBB yapısı, fonksiyonları ve patolojik değişimleri tıp ve biyoloji alanında yoğun ilgi görmektedir ve KBB ilgili çalışmalar her geçen gün giderek artmaktadır.

### **3. Kan-Beyin Bariyeri Genel Özellikleri**

MSS, organizmada diğer bölgelerden farklı olarak optimal aktivitelerini sürdürebilmesi için mükemmel bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır. MSS'de hem elektriksel hem de kimyasal olarak sağlanan nöronal iletişim, oldukça hassas bir mikroçevrede sürdürülmektedir. Nöronal mikroçevreyi ve homeostazisi korumada kritik öneme sahip olan KBB, beyni kanda dolaşan bazı yabancı maddelerin yol açabileceği zararlardan, periferik hormon ve nörotransmitterlerden korur, nöronal hücreler için uygun ortam sağlar ve beyin kan akımını düzenler (1).

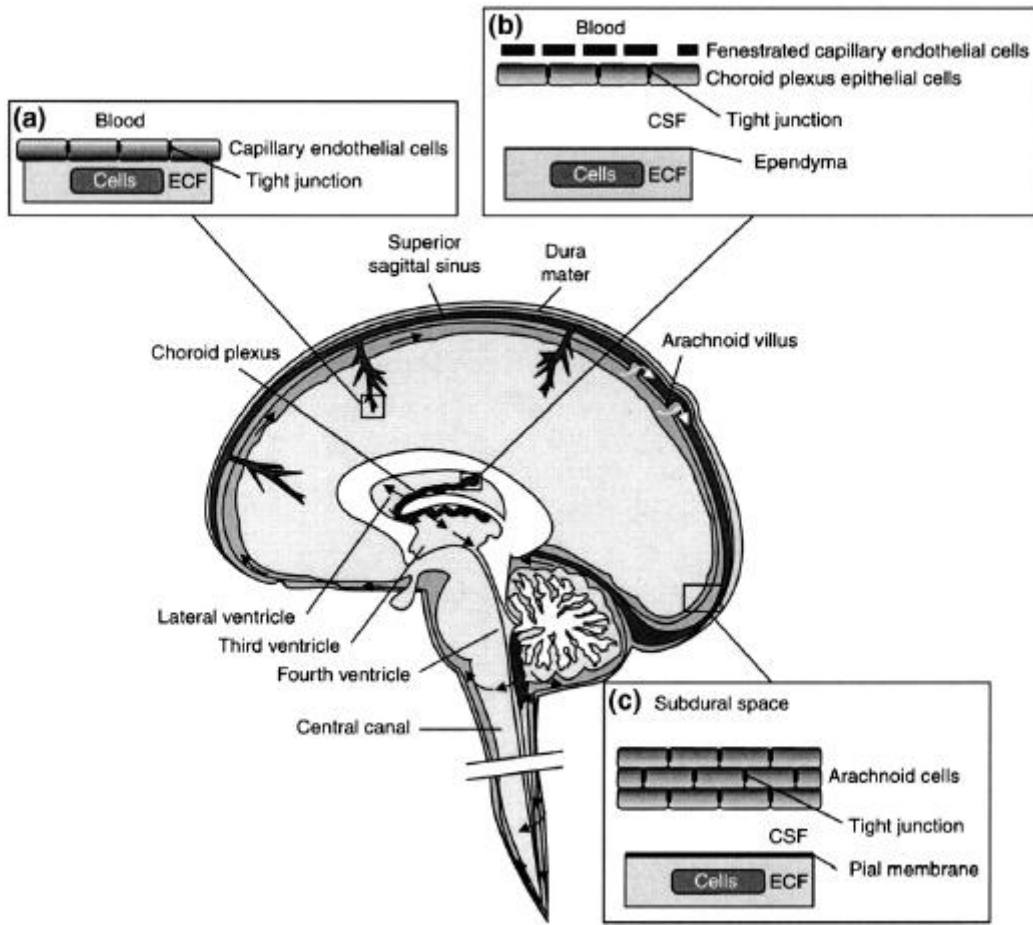
Beyinde bazı bölgelerde KBB zayıftır ya da hiç bulunmamaktadır. Sirkumventriküler organlar olarak bilinen bu kısımlar, kandaki değişimleri hızla algılar ve organizmayı ani değişimlerden koruyucu olarak fonksiyon görür. Sirkumventriküler organlar; pineal bez (melatonin salınımı), nörohipofiz (vazopressin benzeri hormonlar), area postrema (kusma merkezi), alt kommissural organ, subfornikal organ, koroid pleksus, median eminens, supraoptik yarıktır (72).

MSS’de üç bariyerden bahsedilir (Şekil 3). Bunlar;

(a) Kan ve kapiller endotel hücreleri arasındaki bariyer; KBB

(b) Koroid pleksus epitel hücreleri ile kan arasında bulunan, kan-beyin-omurilik sıvısı bariyeri; KBOSB

(c) Kan ve avasküler araknoid epitel arasındaki bariyerdir (1).



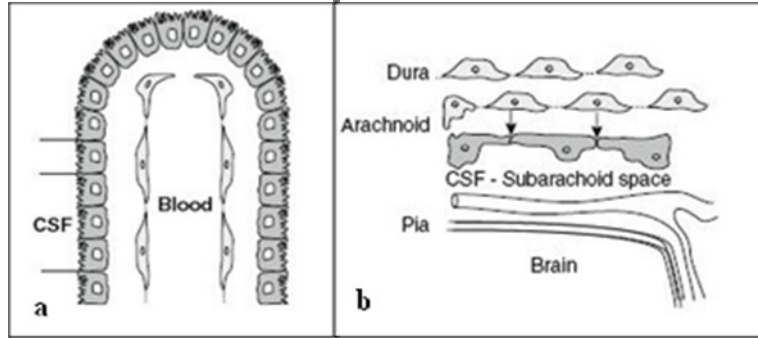
Şekil 3. Beyindeki bariyerler (1)

Koroid pleksustaki kapiller endotel hücreleri, kesikli bir bazal membrana ve fenestralara sahiptir. Bu fenestralı yapı sayesinde makromoleküllerin geçişine izin verir. BOS yüzeyine bakan, endim hücreleri olarak bilinen tek sıra epitel hücreleri, sıkı bağlantı yapıları “tight junction” (TJ) ile birbirine sıkıca bağlanarak KBOSB’i oluşturur. Endim hücreleri

mikrovillusları ile geniş bir yüzey alanına sahiptir (Şekil 4). Bu bölgede aktif transport, pasif ve kolaylaştırılmış difüzyon kandan beyine ve beyinden kana olmak üzere iki yönlü yapılmaktadır (3).

BOS, ventriküler sistemde yerleşmiş koroid pleksus epitel hücreleri (ependim) tarafından oluşturulur. Beyin ekstraselüler sıvı sekresyonunun bir kısmı ve interstisyel sıvı sekresyonu, KBB kapiller endoteli tarafından da yapılır. BOS ve beyin interstisyel sıvı sekresyonu,  $\text{Na}^+$  tarafından oluşturulan iyonik ve osmotik gradiyent ile yönetilir. KBB endotelinin abluminal ve koroid pleksus epitelinin apikal membranında bulunan  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPaz pompası ile kontrol edilir (1).

Üçüncü bir bariyer yapısı olan araknoid bariyer, duranın altında MSS'yi tamamen kaplayan avasküler epitelden oluşan bir yapıdır (Şekil 4). Küçük bir yüzey alanına sahip olsa da, beyin ve ekstraselüler sıvı arasında son ve tamamlayıcı bir bariyer görevi üstlenir. Araknoid zar genelde hidrofilik maddelere geçirgen değildir (1).



Şekil 4. (a) KBOSB, (b) Araknoid bariyer (15)

KBB, endotel hücrelerindeki TJ'ler ile oluşturulan fiziksel bariyer, endotel hücresi sitoplazmasındaki enzimler ile sağlanan enzimatik bariyer ve spesifik taşıyıcılardan oluşan transport bariyerinden oluşmaktadır. Son yıllarda “nörovasküler ünite” tanımı ortaya atılmıştır. Bu ünite kapiller endotel hücresi, ekstraselüler matriks, bazal membran, perisit, damar düz kası, glial hücreler, perivasküler makrofaj ve nöronlardan oluşmaktadır. Ünite içerisindeki hücreler arasındaki etkileşimin, beyin gelişimi, sinaptik aktivite ve KBB geçirgenliği üzerine etkileri vardır. MSS patolojilerinde, hücreler arası etkileşimin

bozulmasıyla KBB geçirgenliğinde değişiklikler olmaktadır (6). Ekstraselüler matriksteki bozulma ile KBB permeabilite artışı arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (58).

KBB özelliklerinde herhangi bir değişikliğin olup olmadığı, hayvan çalışmalarında uygulanan traserlerin takibiyle yapılabilmektedir. Normal koşullarda uygulanan bu traserler KBB'yi geçmezler. Bariyer özelliğini kaybettiği durumlarda, farklı molekül ağırlıklarında olan bu traserler, protein, solüt ve iyon permeabilitesini değerlendirmede kullanılabilmektedir (38). Kullanılan bazı traserler ve molekül ağırlıkları Tablo 5'de verilmiştir (49).

| Traser                                         | Molekül Ağırlığı |
|------------------------------------------------|------------------|
| Evans blue-albumin                             | 69.000 Da        |
| Ruthenium red                                  | 800 Da           |
| Floresan izotiyosiyonat dekstran               | 62.000 Da        |
| Floresan izotiyosiyanat albumin                | 67.000 Da        |
| Horseradish peroksidaz                         | 40.000 Da        |
| Mikroperoksidaz                                | 1.900 Da         |
| <sup>14</sup> C-dekstran                       | 70.000 Da        |
| <sup>14</sup> C- $\alpha$ aminoizobutirik asit | 103 Da           |
| <sup>14</sup> C-inülin                         | 5.000 Da         |
| <sup>14</sup> C-sukroz                         | 342 Da           |
| <sup>14</sup> C-metotreksat                    | 455 Da           |
| Sodyum floresan                                | 376 Da           |
| İyonik lantanum                                | 138,9 Da         |

**Tablo 5.** KBB geçirgenliğinin değerlendirilmesinde kullanılan traserler (46)



#### 4. Kan-Beyin Bariyeri Hücresel Elemanları

KBB'yi oluşturan hücreler, endotel hücreleri ve destek hücreleri olmak üzere iki gruba ayrılabilir (Şekil 5);

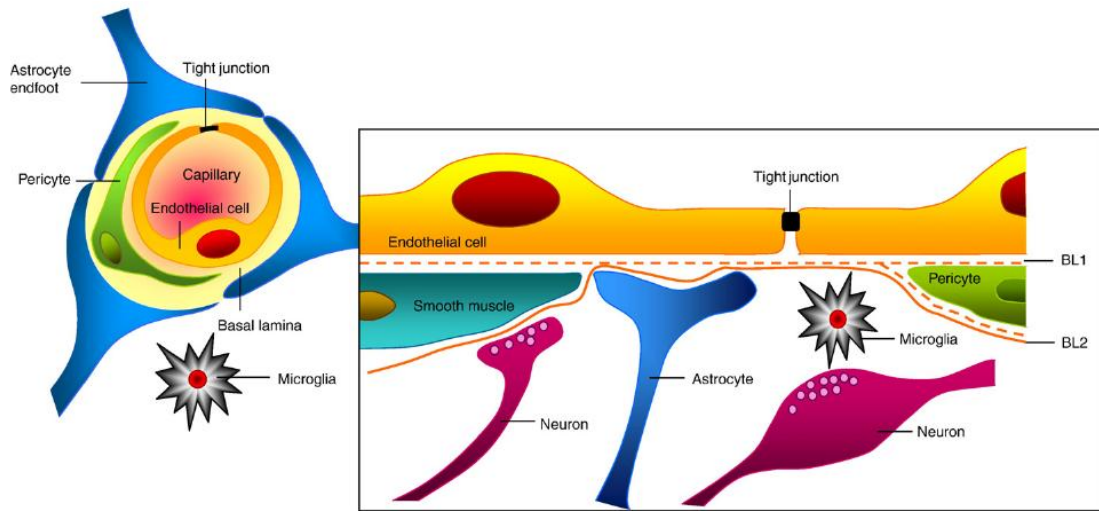
a. Endotel hücreleri

b. Destek hücreleri;

(1). Astrositler

(2). Perisitler

(3). Perivasküler mikrogial hücreler ve nöronlardır.



Şekil 5. KBB hücresel elemanları (1)

#### a. Beyin Kapiller Endotel Hücreleri

MSS iyi gelişmiş tüm organizmalarda KBB bulunmaktadır. İnsanlarda ve tüm memelilerde KBB, başlıca beyin vasküler endotel hücreleri tarafından oluşturulur. Yetişkin bir insanda KBB, yaklaşık 12 ile 18 m<sup>2</sup> kadar yüzey alanına sahiptir (1, 8).

Beyindeki endotel hücreleri, periferik vasküler endotelyal hücrelerden oldukça farklıdır. Bu endotel hücreleri, TJ adı verilen sıkı bağlantılar ile kenetlenmiş ve kesintisiz bir bazal membran üzerine yerleşmişlerdir, fenestrasyon göstermezler. Morfolojik olarak zonula okludens olarak da adlandırılan bu yapıların, lokalizasyonuna göre difüzyon kapasiteleri ve dirençleri değişiklik gösterir. Bu elektriksel direnç değeri, diğer dokularda  $3-33 \Omega/\text{cm}^2$  iken KBB'de  $1500-2000 \Omega/\text{cm}^2$  dolayındadır. Bu durum paraselüler yolla (endotel hücreleri arasından geçiş) beyne makromolekül, solüt ve iyonların geçişini önemli ölçüde kısıtlar. İntraselüler ve ekstraselüler kalsiyum konsantrasyonu, endotel hücreleri, glial hücreler ve nöronlardan salınan vazoaktif ajanlar, sitokinler bariyerin elektriksel direncini ve geçirgenliğini değiştirebilir (11, 69).

Beyin kapiller endotel hücresinde pinositik veziküller (kaveol) çok azdır ve çok sayıda mitokondri gözlenir. Sıçanlarda, kas hücrelerine oranla kapiller endotel hücrelerinde 5-6 kat daha fazla oranda mitokondri bulunmaktadır. Bu çok sayıda ve büyük hacimdeki mitokondrilerin, özellikle enerji bağımlı transselüler yol ile (endotel hücresi içerisinden geçiş) madde taşınmasında kullanıldığı düşünülmektedir. Morfometrik çalışmalarda beyin kapiller duvar kalınlığının, diğer kapiller duvarlara göre %39 oranında daha ince olduğu ve kaveollerin çok az olduğu gösterilmiştir (13). Luminal yüzeyde yerleşik bu kaveollerin transitoz ve endositozda rol aldığı bilinmektedir. Bazal membranın hasar gördüğü durumlarda vezikül sayısında artış görülür (12, 29).

KBB endotel hücresi luminal ve abluminal membran yüzeyleri arasında bir polarite mevcuttur. Gama glutamil transpeptidaz ( $\gamma$ -GTP) ve alkalen fosfataz (ALP) enzimleri luminal tarafta bulunmakta iken  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$  ve sodyum bağımlı nötral aminoasit taşıyıcılar abluminal yüzeyde bulunur. Glukoz taşıyıcı reseptörü GLUT-1'in, elektron mikroskopi çalışması ile abluminal yüzeyden luminal yüzeye doğru dağıldığı gösterilmiştir. Ayrıca luminal membran yüzeyinde özellikle kemoterapötiklerin dışarı çıkışını sağlayan P-glikoprotein (P-gp) ve çoklu ilaç direnci ile ilişkili proteinler (MRPs) bulunmaktadır (9, 12, 29).

Bazı ilaçlar ve nörotransmitterler, endotel hücresinin luminal yüzeyinden sitoplazmaya girdiğinde, spesifik enzimler tarafından inhibe edilirler. Enzimatik bariyer olarak fonksiyon gören, sitokrom p-450,  $\gamma$ -GTP, ALP, aromatik asit dekarboksilaz gibi enzimler, vücudun diğer bölgelerine oranla beyinde çok daha yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Endotel bariyer antijeni (EBA), GLUT-1 ve  $\gamma$ -GTP spesifik bariyer belirteçleridir (29).

## **b. Destek Hücreleri**

### **(1). Astrositler**

KBB'yi oluşturan endotel hücrelerinin %99'u glial hücreler tarafından çevrelenmiştir. Astrositler, KBB gelişimi ve modülasyonunda büyük role sahiptir. Astrosit yoğunluğunda azalma veya kayıp durumlarında, bariyer yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve TJ aralıklarında genişleme deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (58). Astrosit sitoplazmasında, mikroflement yapıda glial fibriler asidik protein (GFAP) bulunmaktadır ve bu hücrelerin tanınmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Astrosit hasarı veya hastalıklarında, GFAP boyanmasındaki değişiklikler duyarlı bir gösterge olarak kabul edilmektedir (22).

Astrositler hücre ve hücrelerarası su dağılımının düzenlenmesinde, iyon dengesinin korunmasında önemli rol almaktadır (2). Astrosit ayakçıklarında bulunan aquaporin-4 (AQP-4) ve potasyum kanalı olan Kir4.1 gliovasküler iletişimde, beyin su ve elektrolit dengesinin korunmasında oldukça önemlidir. AQP-4, astrosit ayakçıklarının beyin endotel hücrelerinin abluminal membrana bakan kısımlarında eksprese edilir (62). AQP-4 ekspresyonu KBB gelişimi ile paralellik gösterir ve KBB'nin hasar gördüğü durumlarda azalır (51, 62). Bu nedenle, AQP-4 glial protein olarak kabul edilir ve vasküler bariyer fonksiyonları açısından önemli bir belirteçtir (18).

### **(2). Perisitler**

Endotel hücrelerinin abluminal tarafında, bazal lamina ile çevrelenmiş, sitoplazmik uzantıları ile kapiller yapıyı çepeçevre saran hücrelerdir. Periferik mikrovasküler yapıları da çevreleyen bu hücreler, bağ dokusu hücreleri olarak tanımlansa da tam olarak sınıflandırılmamıştır. Perisitler, çizgili kas dokusu ile karşılaştırıldığında beyin dokusunda 30 kat daha fazla oranda bulunur. Aktin içerikleri ile kasılabilen perisitler, özellikle pia arteriollerinde kan akımının düzenlenmesine yardımcı olur. Bunun yanında salgıladığı büyüme faktörleri ile (TGF- $\beta$ , PDGF, ang-1 ve 2, sfingozin-1 fosfat) anjiogeneze rol almaktadır. Beyin dokusunda perisit kaybı, anormal vasküler morfolojiye ve vasküler hiperplaziye neden olmaktadır. Beyindeki bazı perisitler eksojen proteinleri fagosite etmekte ve antijen sunmaktadır, bu nedenle makrofaj kökenli olabilecekleri düşünülmüştür (15).

### **(3). Mikroglial Hücreler ve Nöronlar**

Mikroglial hücreler, makrofajların beyin parankimi içerisinde görülen farklı bir formudur. Leptomeningeal mezenkimal hücrelerden köken alır ve beyinde mikroglial hücelere transforme olurlar. Perivasküler makrofajlar, dolaşımdan parankime geçmiş monositlerdir. Köken olarak aynı olsalar da fenotipik farklılıkları vardır (15).

Beyin parankimindeki nöronlar, endotel hücreleri, perivasküler astrositler ve perisitler ile yakın temas halindedirler. KBB geçirgenliğinin, kan akımının düzenlenmesinde ve metabolik ihtiyaçların karşılanmasında rol almaktadırlar. Nöronal ve mikrovasküler iletişimin bozulduğu, iskemi ve travma gibi nöronal hasar yaratan durumlarda KBB fonksiyonları bozulmaktadır. Alzheimer hastalığında olduğu gibi, kolinerjik innervasyonun bozulduğu durumlarda serebrovasküler fonksiyonlar da bozulmaktadır. Akut hipertansiyon nedeniyle oluşan locus coeruleus hasarında da noradrenerjik innervasyonda bozukluk ile KBB geçirgenliği değişmektedir. Kesin mekanizmalar bilinmemekle beraber araştırmalar devam etmektedir (58).

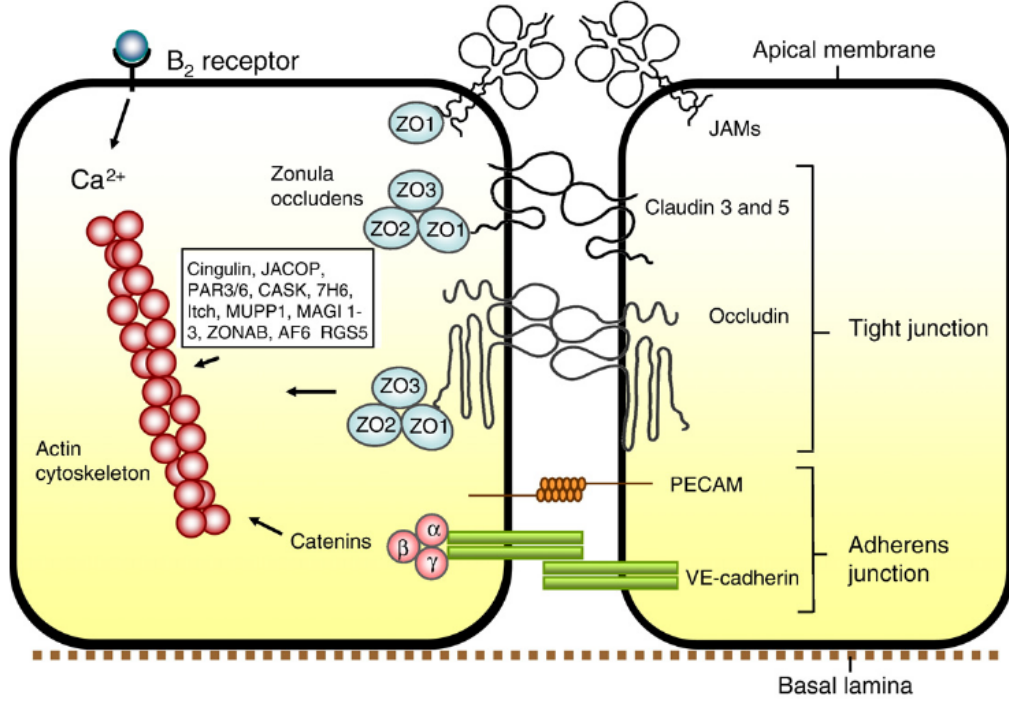
## **5. Kan-Beyin Bariyeri Sıkı Bağlantıları**

Serebral endotel hücreleri, koroid pleksus epiteli ve araknoid epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, kandan beyin dokusuna birçok makromolekül ve polar maddenin geçişini engelleyen önemli bir yapıdır. TJ yapıları lokal ve dolaşımdaki faktörlere bağlı olarak paraselüler yolun fonksiyonlarını dakikalar içerisinde düzenleme kabiliyetine sahiptir (1, 69).

Endotel hücreleri arasında iki bağlantı kompleksi vardır (Şekil 6). Bunlar; TJ ve aderan bağlantılardır (adherens junction: AJ).

### **(a). Sıkı Bağlantılar**

Sıkı bağlantı (TJ) proteinleri, üç integral protein; klaudin, okludin ve bağlantı adezyon molekülü (junctional adhesion molecule: JAM), sitoplazmik uzantıları; zonula okludensler (ZO-1, 2, 3), singulin ve diğer proteinlerden oluşmaktadır. Sitoplazmik ve membran proteinleri ile bağlantıda olan aktin, endotel hücresinin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli hücre iskeleti proteindir (63, 69).



Şekil 6. Endotel hücreleri arasındaki bağlantı kompleksi (1).

### (1). İntegral Proteinler

**Klaudin:** 22 kDa ağırlığında ve fosfoprotein yapısında olan klaudinler sadece TJ yapıları içerisinde bulunur (Şekil 6). Klaudinlerin insan ve farelerde bilinen 20 izomeri mevcuttur. C terminal uçları ile hücre içinde ZO-1, ZO-2 ve ZO-3'ün PDZ bölgesine (postsynaptic density-95 protein) bağlanır. Klaudinler, TJ yapısı içinde, komşu endotel hücrelerindeki klaudine bağlanarak paraselüler geçirgenlikte anahtar rol oynar (1, 52, 69).

**Okludin:** TJ yapısında ilk keşfedilen, 65 kDa ağırlığında integral fosfoproteindir. Okludinin aminoasit dizilimi insan ve kemirgenlerde %90 homoloji göstermektedir. C-sonlanma bölgesi ise türler arasında en çok benzerlik gösteren kısımdır. C-sonlanmasına, en çok ZO-1 proteini bağlanır ve aktin ile doğrudan ilişki içerisinde.  $Ca^{+2}$ 'den bağımsız bağlayıcı-yapıştırıcı protein özelliği olan okludinin membrandaki yoğunluğu elektriksel direnç artışı ile paralellik gösterir (1, 69). Okludinin G-protein bağımlı veya bağımsız olarak fosforilasyonu paraselüler geçirgenliği düzenlemektedir. Son çalışmalar okludinin epitel hücre farklılaşmasında ve transepitelyal nötrofil migrasyonunda rolü olduğunu göstermektedir (15).

**Bağlantı adezyon molekülü:** Bağlantı adezyon molekülü (JAM), 40 kDa ağırlığında, epitel ve endotel TJ'lerinde bulunan glikolize bir proteindir. TJ ile ilişkili üç tipi belirlenmiştir. TJ dışında dolaşımda monosit, nötrofil, lenfosit alt gruplarında ve trombositlerde tespit edilmiştir. Monosit göçü ile ilişkilidir. İki değişebilir immunglobulin bölgesi içeren ekstraselüler bölgeye sahiptir. İn vitro çalışmalarda monoklonal antikorlar ile JAM inhibisyonu sağlanarak monosit transmigrasyonu engellenmiştir. JAM fonksiyonları henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (1, 69).

## **(2). Sitoplazmik Proteinler**

Okludin, klaudin ve JAM, sitoplazmik regülatör proteinlere bağlanmaktadır. TJ oluşumunda rol alan sitoplazmik proteinler; ZO-1, ZO-2, ZO-3, singulin, 7H6 ve diğer birkaç proteinden oluşur. ZO-1, 2 ve 3 membran bağlantılı guanilat kinaz benzeri proteinlerdir (MAGUK). ZO-1 ve ZO-2 C-terminal uçları, hücre iskeletini oluşturan aktin proteini ile bağlanır. Aktin primer hücre iskelet proteini olup, TJ proteinleri ile etkileşerek, paraselüler geçirgenlikte rol almaktadır (63, 69). ZO-1; okludin, klaudin, JAM ve aktin ile etkileşir. ZO-2; klaudin, okludin, singulin ve  $\alpha$ -katenin ile etkileşir. ZO-3; singulin, ZO-1 ve miyozine bağlanır (Şekil 6).

Sıkı bağlantı bölgesinde tespit edilen 7H6, ATP azalmasına cevap olarak TJ'den ayrılmakta ve bunun sonucu olarak paraselüler geçirgenlik artmaktadır (8).

Afadin (AF6), sıkı ve aderan bağlantı bileşenidir. AF6 ve JAM, endotel ve epitel hücrelerinden monosit göçü sırasında, TJ'lerin açılıp-kapanmasında rol almaktadırlar (69).

Singulin sadece TJ içeren epitel ve endotel hücrelerinde bulunur. ZO-2, ZO-3, AF6, JAM, aktin ve miyozin ile etkileşir (14). Bunların dışında CASK, MUPP-1, MAGI-1,2 ve 3, RGS5, ZONAB, JACOP gibi birçok düzenleyici protein bulunmaktadır (8).

## **(b). Aderan Bağlantılar**

Aderan bağlantılar (AJ) bir membran proteini olan kaderin ile aracı proteinlerle aktine bağlı katenin arasındaki bağlantıları oluştururlar (Şekil 6). AJ yapısı endotel hücresine yapısal destek sağlamaktadır. Bu yapının bozulması durumunda bariyer yapısı kaybolur (1, 63 69).

**VE-kaderin:** Endotel spesifik integral proteindir. Katenin üzerinden hücre iskeletine bağlanır. AJ içerisindeki kateninin rolü, TJ'deki okludin ile benzerlik taşımaktadır. Son dönemlerde identifiye edilen p120-katenin, VE-kaderine yüksek afinite ile bağlanmaktadır. İn-vivo ve in-vitro çalışmalar VE-kaderinin, endotel bütünlüğünün sağlanmasında ve yeni damar organizasyonunda rolü olduğunu göstermektedir (15).

**Trombosit Endotelyal Hücre Adezyon Molekülü:** Trombosit endotelyal hücre adezyon molekülü (PECAM), CD31 olarak da bilinir ve başlıca hücre apikalinde yoğunlaşmış olarak bulunup TJ yapısı içerisinde değildir. PECAM-1 hücre-hücre adezyonunu sağlar. Homofilik etkileşimle karşı hücredeki PECAM ile heterofilik etkileşimle integrinlere bağlanır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, MSS'ye monosit transmigrasyonunda rol oynadığını göstermektedir (15).

## **6. Kan-Beyin Bariyeri Fonksiyonları**

Yetişkin bir insanda, MSS'de rejenerasyon yok denecek kadar azdır. Doğumdan itibaren nöronal hücre ölümü sürekli ve sabit şekilde devam etmektedir. Dolayısıyla KBB fonksiyonlarındaki kayıplar bu süreci hızlandırmakta ve geri dönüşümü olmayan hasarlara neden olmaktadır (1).

### **a. İyon Regülasyon**

KBB sadece nöronal fonksiyonlar için optimal bir ortam sağlamakla kalmaz, aynı zamanda spesifik iyon kanalları ve taşıyıcıları ile snaptik sinyalizasyon için uygun koşulları sağlamaktadır. Memelilerde plazma potasyum konsantrasyonu 4,5 mM iken, BOS ve beyin intersitisyel sıvısında 2,5-2,9 mM'dür. Aynı şekilde, pH, kalsiyum ve magnezyum konsantrasyonları KBB ve KBOSB tarafından kontrol edilmektedir (1).

### **b. Nörotransmitterler**

Nöroeksitator aminoasit olan glutamat, beslenme sonrası plazmada dalgalanmalar gösterir. Glutamat beyinde doğrudan nöroeksitator ve nörotoksik etkiler göstermektedir. KBB periferik kaynaklı nörotransmitter ve benzeri maddelerin geçişini engellemektedir (8).

### c. Nörotoksinler

Suda eriyen birçok besin maddesi ve metabolitler, düşük miktarlarda KBB'den pasif olarak MSS'ye diffüze olmaktadır. Nörotoksik olan bu maddeler; ekzojen toksinler, proteinler, zenobiyotikler veya endojen metabolitler, ABC proteinler (ATP-binding cassette transporters) olarak adlandırılan ATP bağımlı sistemler ile dışarı pompalanmaktadır. Nörotoksinlerdeki artış, nöron dejenerasyonuna ve hastalıklara zemin hazırlamaktadır (3).

### d. Makromoleküller

BOS'un protein içeriği, plazmaya oranla oldukça düşüktür ve farklıdır. Plazmada bulunan albumin, protrombin ve plazminojen gibi makromoleküller, sinir dokusunda hasara ve apoptoza yol açar. MSS'de plazminojen plazmine, protrombin de trombine dönüştürülebilmektedir. Plazmin ve trombin apoptozu tetikleyebilir. Ayrıca albuminin MSS'ye geçişi ile glial hücreler aktive olmakta ve skar dokusu oluşmaktadır (48). Bazı proteinler BOS'da plazmaya oranla daha fazla konsantrasyonda bulunmaktadır. Bir serin proteaz olan sistain-C, MSS'de lokal olarak sentezlenen bir proteindir. BOS'da yüksek oranda bulunur ve plazmadan BOS'a protein kaçaklarını sınırladığı düşünülmektedir (1, 59).

### e. Beynin Beslenmesi

Beyin ihtiyacı olan besin maddelerini temin etmek için, kapiller yapı üzerinde birçok spesifik taşıyıcı sistem bulundurmaktadır. Beynin enerji için kullandığı ana substrat glukozdur. Normal serebral glukoz tüketimi, 1 dakikada 100 gram beyin dokusunda 23 mM'dür. Arteriyel kan glukozunun %15'i serebral dokuya diffüze olmaktadır (57). Glukoz, KBB'den GLUT-1 ile taşınmaktadır. Metabolizma hızı oldukça yüksek olan bu organ, sınırlı da olsa enerji depolayabilmektedir. Beyinde, plazmaya oranla kreatin 180 kat daha fazla oranda bulunur. Kreatin böbrek ve karaciğer tarafından üretilir, kreatin taşıyıcısı (CRT) ile taşınır. Beyin endotel hücrelerine CRT aracılı kreatin transport sistemi ile alınmakta ve enerji kreatinfosfat olarak depolanmaktadır (8).

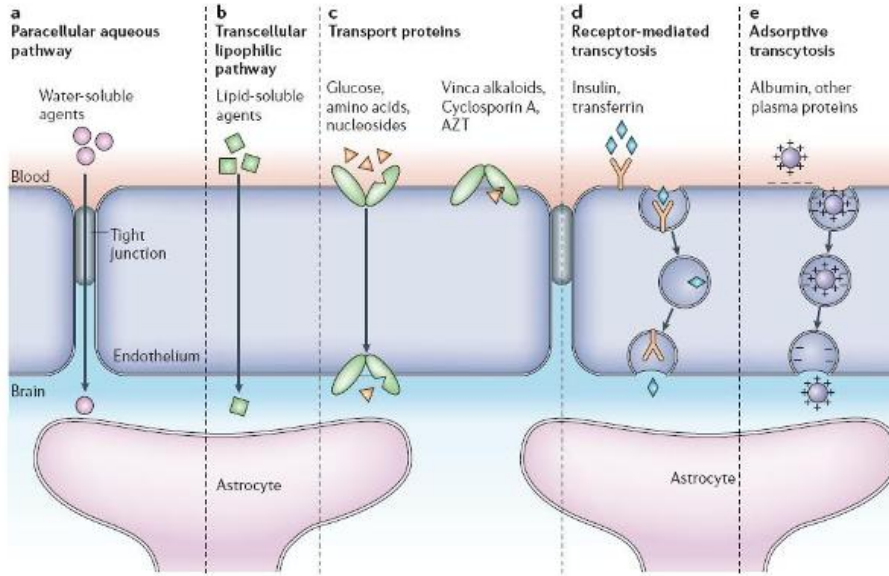
## 7. Kan-Beyin Bariyerinden Madde Geçişi

Lipid çözünürlüğü fazla olan nikotin, oksijen, CO<sub>2</sub> gibi maddeler, KBB'den pasif difüzyon ile geçebilmektedir. Molekül ağırlığı 450 Da üzerinde olan maddelerin geçişi sınırlıdır. Plazma proteinlerine yüksek afinite ile bağlanan maddelerin KBB'ye penetrasyonu zordur. Pozitif yüklü ve asidik yapıda moleküllerin geçişi daha kolay olmaktadır. Kısacası, bir



maddenin KBB'den geçişi, moleküler yapı ve büyüklüğe, çözünürlüğe, afiniteye, kan akım hızına, taşıyıcılar gibi birçok faktöre bağlı olmak üzere değişir (1).

KBB'den madde geçişi temel olarak paraselüler ve transselüler olmak üzere iki yolla kontrol edilir. Paraselüler yol; endotel hücreleri arasındaki TJ'ler ile yönetilir, okludin, klaudin-1,5 ve JAM burada önemli rol oynar (20). Beyin endotelinde pinositoz ile geçiş oldukça sınırlıdır. Transselüler yol ile madde geçişi aktif transport sistemleri ile gerçekleşir. Beyin beslenmesi için gerekli olan maddelerin taşınması iki yönlü olarak gerçekleşmektedir. GLUT-1, nötral aminoasit taşıyıcıları (LAT1), monokarboksilik asit taşıyıcısı (MCT1) bunlardan bazılarıdır (Şekil 7). Zenobiyotik ve ilaçların dışarı çıkışını sağlayan luminal membranda yerleşmiş P-gp, MDR-1 gibi ABC protein ailesi üyeleri genelde tek yönlü çalışan taşıyıcılardır. Ancak bazı MDR izoformları abluminal membranda da tespit edilmiştir, bazı taşıyıcılar ise çift yönlü çalışmaktadır (1, 20).



**Şekil 7.** KBB'den madde geçişi (2)

Beynin ihtiyaç duyduğu veya atmaya çalıştığı makromoleküller KBB'yi endositoz yolu ile geçmektedir (Şekil 7). Reseptör aracılı veya adsorbtif aracılı endositoz ve transsitoz, hücre içinde veziküller (kaveol) aracılığıyla gerçekleşmekte, albumin, peptid, protein, LDL,

transferrin, leptin ve insülin gibi makromoleküllerin taşınmasında kullanılmaktadır (1). Kaveoller plazma membranından oluşan 50-100 nm boyutlarında, makromoleküllerin taşınmasını, sinyal iletimini ve hücre adezyonunu sağlayan veziküllerdir ve transsitozda önemli rol almaktadırlar. Kaveolin, 21-24 KDa molekül ağırlığında, kaveolün yapısal komponentini oluşturan bir proteindir. Üç kaveolin geni tespit edilmiştir (kaveolin-1, -2 ve -3). Endotel hücreleri yüksek miktarda kaveolin-1 eksprese etmektedir. Kaveolin-1 ve 2 sıçan mikrodamarlarında bulunurken, kaveolin-1 insan KBB'sinde bulunmaktadır (15). Kaveolin-1 kapiller endotel hücrelerinin arasında bulunan sıkı bağlantı proteinlerinin degradasyonunu önlemekte ve serbest radikal yapımı ve matris metalloproteinazların (MMP) aktivitesini azaltarak KBB bütünlüğünü korumaya çalışmaktadır (27). Fokal iskemi/reperfüzyon hasarında nitrik oksit ve MMP yapımındaki artışın kaveolin-1 yapımını azalttığı gösterilmiştir. Bu azalma bir sıkı bağlantı proteini olan zonula okludens yapımındaki azalmaya neden olmakta ve KBB geçirgenliği ile korelasyon göstermektedir (28).

### **8. Kan-Beyin Bariyerinin Gelişimi**

KBB, intrauterin yaşamda gelişmeye başlar ve perinatal evrede gelişimini tamamlar. Sıçanlarda yapılan çalışmalarda, TJ yapıları KBB'de ilk oluşan ve fonksiyon kazanan yapılar olarak görülmüştür. KBB, doğumda makromolekül ve protein geçirgenliği açısından olgun olmasına rağmen, iyon geçirgenliğinin düzenlenmesi ve olgunlaşması doğumu takiben tamamlanmaktadır. Postmortem çalışmalar, insanlarda KBB gelişiminin ikinci trimesterde başladığı göstermektedir. Preterm infantlarda daha sık görülen periventriküler kanamalar, KBB geçirgenliğindeki artıştan kaynaklanmaktadır. KBB geçirgenliği, organizmanın gelişim düzeyi, yaş ve hormonal etkilerle değişiklik gösterebilmektedir (1).

### **9. Kan-Beyin Bariyeri Patofizyolojisi**

KBB yetmezliğine neden olan MSS patolojilerine her geçen gün daha fazla hastalık eklenmektedir. MSS'ini ilgilendiren birçok patolojik durumda, değişken şiddette, geçici veya kronik bariyer fonksiyon bozukluğu ortaya çıkmaktadır. Bu KBB fonksiyon bozuklukları, TJ yapılarında açılma ile meydana gelen paraselüler açılma, pinositik aktivite artışı, por oluşumu, transport ve enzim sistemlerindeki bozulma ile madde ve ilaç taşınmasında değişiklikler olarak karşımıza çıkmaktadır (15, 23). İskemi, hipoksi, reperfüzyon, travma, enfeksiyon, enflamasyon, beyin tümörleri, glokom, multipl skleroz, SLE, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, epilepsi, diyabetes mellitus, akut hipertansiyon, hipovolemi, alüminyum toksisitesi, hiperosmolarite, lizozomal depo hastalıkları bunlar arasında sayılabilir (1, 19). Ayrıca,

elektromanyetik alanda, mikrodalga radyasyon ve iyonize radyasyon maruziyetinde KBB geçirgenlik değişiklikleri gözlenmektedir (29).

### **III. AMAÇLAR**

HBO'nun normal canlıdaki KBB üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar az sayıda ve yetersizdir. Çalışma sayısının azlığı yanında sonuçlarının da çelişkili olması ayrıca dikkat çekmektedir.

Bu deneysel çalışmada, sağlıklı sıçanlarda, hiperbarik ortamda %100 oksijen (HBO) solumanın ve hiperbarik ortamda hava (HBH) solumanın, MSS'nin ana savunma hattı olan KBB üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Elde edilecek verilerin, HBO ve HBH solumanın, MSS üzerindeki etkilerinin anlaşılmasında bir basamak olması beklenmektedir.

## IV- GEREÇ VE YÖNTEM

### A- ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiş (Proje no: 8028) ve İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 2010/ 79'nolu kararıyla onaylanmıştır (Ek-1).

Çalışmada toplam 72 adet Wistar albino türü, sağlıklı genç erişkin dişi sıçan kullanılmıştır.

Çalışma grupları;

1. Hiperbarik oksijen soluyan grup (G-HBO grubu),
2. Hiperbarik hava soluyan grup (G-HBH grubu),
3. Kontrol grubundan oluşturulmuştur.

Her grup farklı incelemeler için 8'er sıçandan oluşan 3 alt gruba ayrılmıştır. Bu alt gruplarda, Evans blue (EB) boyası ile KBB geçirgenliğinin kantitatif değerlendirmesi, Horseradish peroksidaz (HRP) ile elektron mikroskopi düzeyinde HRP geçişi, son olarak ta immunohistokimyasal değerlendirmeye; kaveolin-1, okludin ve AQP-4 immunoreaktivitesi araştırılmıştır.

Hayvanların bakımı İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) tarafından gerçekleştirilmiştir. Hiperbarik uygulamalar İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı bünyesindeki deney basınç odasında, diğer işlem ve uygulamalar ise İstanbul Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

### B- DENEYSEL PROSEDÜR

#### 1. Hiperbarik Oksijen Solunması

Hiperbarik uygulamalar, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı bünyesindeki, 0,37 m<sup>3</sup> hacmindeki deney basınç odasında gerçekleştirildi. Sıçanlara 24 saat içerisinde 4 kez (0, 6, 12 ve 18. saatlerde başlamak üzere), HBO solutuldu. Deney basınç odası normobarik şartlarda 10 dakika %100 oksijen ile ventile edildikten sonra, yine %100 oksijen ile 15 dakikada 2,5 ATA basınca kadar komprese edildi. 2,5 ATA'da 60

dakikanın ardından, basınç odası 15 dakikada dekomprese edildi. Deneyin 24. saatinde; 4. seans HBO solunmasından yaklaşık 4 saat sonra, EB boyası ile KBB geçirgenliğinin kantitatif değerlendirmesi yapılacak olan ve HRP ile elektron mikroskopi düzeyinde HRP geçişi incelenecek olan sıçanlar kateterize edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirme yapılacak olan sıçanlara hiperbarik uygulamalardan yaklaşık 4 saat sonra fiksasyon işlemi uygulanmaya başlandı.

## **2. Hiperbarik Ortamda Hava Solunması**

Sıçanlara 24 saat içerisinde (0, 6, 12 ve 18. saatlerde başlamak üzere), toplamda 4 seans olarak HBH verildi. Deney basınç odası hava ile 15 dakikada 2,5 ATA basınca kadar komprese edildi. 2,5 ATA'da 60 dakikanın sonunda basınç odası 15 dakikada dekomprese edildi. Deneyin 24. saatinde; 4. seans HBH solunmasından yaklaşık 4 saat sonra, EB boyası ile KBB geçirgenliğinin kantitatif değerlendirmesi yapılacak olan ve HRP ile elektron mikroskopi düzeyinde HRP geçişi incelenecek olan sıçanlar kateterize edildi. İmmunohistokimyasal değerlendirme yapılacak olan sıçanlara hiperbarik uygulamalardan yaklaşık 4 saat sonra fiksasyon işlemi uygulanmaya başlandı.

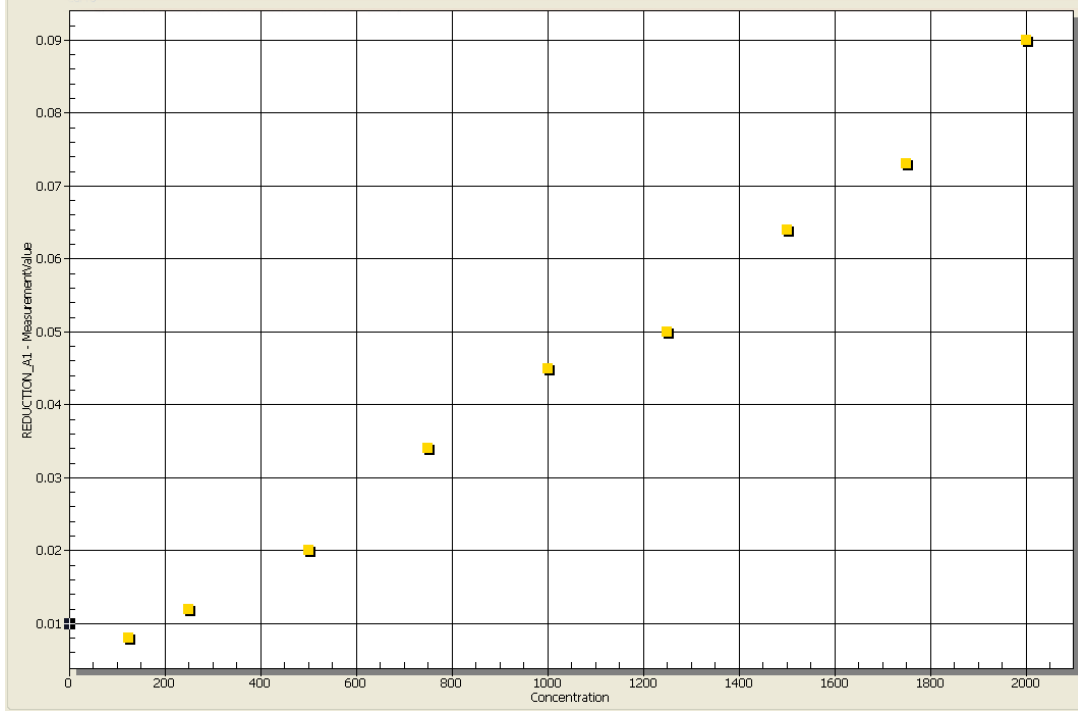
## **3. Kateterizasyon ve Dekapitasyon**

Kloral hidrat (360 mg/kg, IP) anestezisi altında, sıçanların sağ femoral venleri kateterize edildi. Madde enjeksiyonunun ardından (EB boyası, HRP traseri), yine kloral hidrat anestezisi altında dekapitasyon uygulandı.

## **4. Kan-Beyin Bariyerinin Kantitatif Değerlendirmesi**

KBB geçirgenliği, femoral venden verilen EB boyasının (EB; %2, 4 ml/kg) beyindeki miktarının ölçülmesiyle tayin edildi. Kloral hidrat anestezisi altında, EB boyası verildikten 30 dakika sonra, sıçanlar transkardiyak perfüzyona alındı. Transkardiyak perfüzyon, serum fizyolojik solüsyonu ile (%0,9 NaCl; pH 7,4, 200 ml) yaklaşık 15 dakika uygulandı ve sıçanlar dekapite edildi. Beyin dokusu bütün olarak çıkarıldı, sağ ve sol beyin korteksleri ile diensefalon olmak üzere 3 bölgeye ayrıldı. Alınan her beyin bölgesi, önceden daraları alınmış alüminyum folyolara konularak, hassas terazide tartıldı ve net ağırlıkları hesaplandı. Her bölgeye ait doku parçası tüplere konarak 2 ml fosfat tamponunda (PBS; pH 7,4) homojenize edildi, ardından proteini çöktürmek için eşit miktarlarda %60'lık triklorasetik asit eklendi ve 2 dakika vorteks uygulandı. Örnekler 4 °C'de 30 dakika bekletildikten sonra, 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatanttaki boya konsantrasyonu 620 nm dalga boyunda ölçüldü

(Microplate Reader; DTX880 Multimode Detector, Beckman Coulter). EB boya miktarı hazırlanan standart eğri kullanılarak “ $\mu\text{g}$  EB/mg beyin dokusunda” olmak üzere hesaplandı (Grafik 1).



**Grafik 1.** EB boyasının standart eğrisi (x;  $\mu\text{g}$  EB/4 ml PBS, y; Absorbans)

## 5. İmmünohistokimyal Değerlendirme

Bariyer tipteki endotel hücrelerinde bulunan ve sıkı bağlantı proteini olan okludin, astrosit ayakçıklarında yer alan ve bariyer fonksiyonları açısından önemli bir belirteç olan su kanalı proteini AQP-4 ve endotel membranında bulunup kaveollerin yapısal komponentini oluşturan kaveolin-1 proteinlerinin immunoreaktivitesi araştırıldı.

Bu amaçla, her deney grubundaki sıçanlara yüksek dozda kloral hidrat (720 mg/kg, İP) anestezisinin ardından, yaklaşık 200 ml 0.1M PBS içinde bulunan %4'lük paraformaldehit ile yaklaşık 15 dakika süresince sol ventrikülden perfüze edilerek beyinlerin fiksasyonu sağlandı. Fiksasyon sonrasında beyinler çıkarılıp, aynı fiksatif içinde  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bir gece tutulduktan

sonra parafine gömüldü. 3 µm kalınlığında beyin kesitleri alındı. Kesitler suya indirildikten sonra endojen peroksidaz inhibisyonu için %3 hidrojen peroksit inkübasyonu yapıldı. Okludin için proteaz enzimi (Sigma; 37°C'lik etüvde 5–7 dakika), kaveolin-1 için sitrat tamponu içinde düdüklü tencere (1 atmosfer basınçta 1 dakika) ve AQP-4 için sitrat tampon içinde düdüklü tencere (1 atmosfer basınçta 1 dakika) uygulamaları ile antijen iyileştirme işlemi gerçekleştirildi.

Non-spesifik antikor bağlantılarını önlemek amacıyla, blok solüsyonu uygulamasının ardından poliklonal tavşan anti-okludin antikor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); dilüsyon oranı 1/50 ve inkübasyon süresi 2 saat, poliklonal tavşan kaveolin-1 IgG antikor (Santa Kruz, CA, USA); dilüsyon oranı 1/50 ve inkübasyon süresi 2 saat, poliklonal tavşan anti-AQP-4 antikor (Millipore, San Francisco, USA); dilüsyon oranı 1/100 ve inkübasyon süresi 2 saat olarak primer antikor inkübasyonları yapıldı. Takiben bağlanan antikorları işaretlemek üzere biyotinlenmiş sekonder antikor ve streptavidin peroksidaz solüsyonlarını içeren deteksiyon kiti (Skytek, USA) kullanıldı ve aminoetil karbazol kromojeni uygulaması yapıldı. Ardından kesitler, karşıt boyama için Mayer Hematoksilin nükleus boyası ile boyandı. Negatif kontroller için, komşu eş kesitlere primer antikor uygulaması yapılmaksızın aynı işlemler yapıldı.

Işık mikroskobuna takılmış dijital bir kamera (Nikon, Coolpix 4500) aracılığıyla okludin ve kaveolin-1 için hipokampal CA1 bölgesinden, AQP-4 için de parietal korteksten görüntüler alındı. Her hayvandan, en az 100 kapillerde bilgisayar görüntü analiz programı ile (Image Pro Plus 6.0 software, Media Cybernetics Inc.) antikorların immün boyanma şiddetleri tespit edildi.

Her antikor için, her bir hayvandan alınan görüntülerin tümü incelendikten sonra, grubun özelliğini en iyi yansıtan fotoğraf tez çalışmasına konulmak üzere seçildi.

## **6. Horseradish Peroksidaz Traserinin Makroskobik İncelenmesi ve Elektron Mikroskobik Değerlendirilmesi**

Paralel seri deneylerde aynı işlemleri takiben, KBB'deki morfolojik değişiklikleri göstermek üzere ikinci bir KBB traseri olarak horseradish peroksidaz (HRP Tip-II) kullanıldı. Bu işlemler için sıçanlara femoral ven yolu kullanılarak, molekül ağırlığı 40.000 Da olan HRP (200 mg/kg) enjekte edildi. HRP enjekte edildikten 20 dakika sonra, hayvanlara kısa süreli transkardiyak serum fizyolojik perfüzyonu yapıldı. Hemen ardından, %2,5 glutaraldehit + %2



paraformaldehit içeren 0,1 M fostat tamponlu (pH: 7,4) fiksatif ile fikse edildi. Takiben, hayvanlar +4 °C'de bir gece bekletildi, beyinler çıkartılıp vibratom ile 50 µm kalınlığında kesitler alındı. Her bir beyinden alınan kesitler ayrı bir petri içinde olacak şekilde 0,05 M Tris-HCl tamponu içine alınıp üzerlerine 3,3'-diaminobenzidin eklenmesini takiben 5-30 dakika beklendi. Bu süre içinde kesitler üzerinde kahverengi renkte bir HRP reaksiyonun olup olmadığı takip edildi. Değerlendirmeler yapılmak üzere, beyin kesitlerinin fotoğrafları alındı. Takiben, HRP pozitif veya negatif kesitler üzerinde hipokampustan alınan 1 mm<sup>3</sup>'lük doku örnekleri aynı fiksatifte 4°C'de bir gece bekletildi. Ardından örnekler, %1'lik ozmium tetraoksitte 1 saat postfiksasyonu takiben gömüldü. Ultra ince kesitlerde (60 nm) elektron mikroskopunda (JEOL 1011 Japan ) incelendi. CCD kamera ile görüntüler alındı (MegaView III, Soft Imaging System, GmBH, Germany).

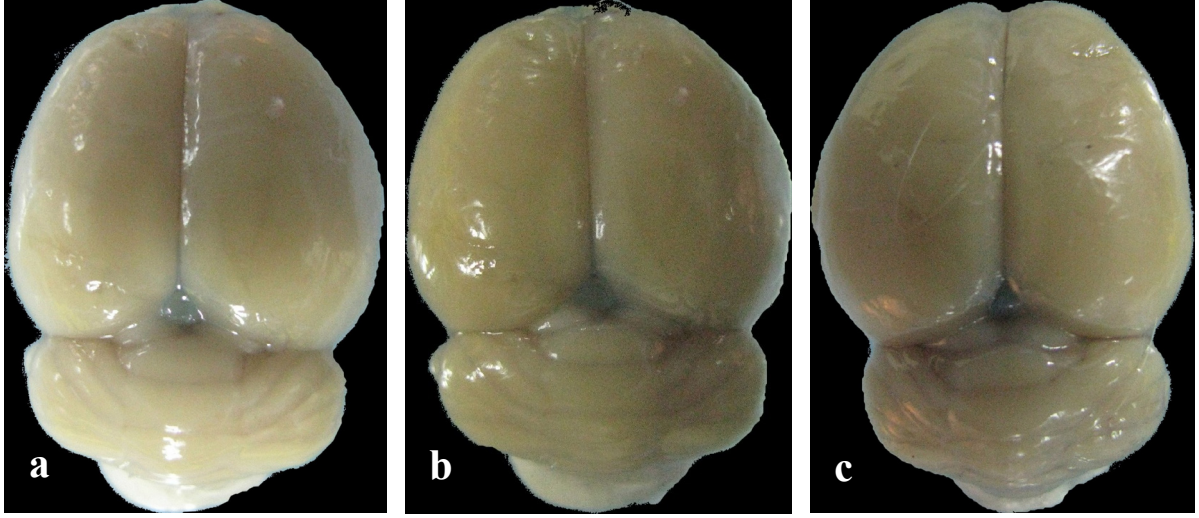
### **C- İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

İstatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for Social Sciences 15.0 versiyonu) bilgisayar programı kullanıldı. Gruplar arasındaki genel anlamlılığı değerlendirmek için başlangıçta tek yönlü varyans analizini (one way ANOVA) ardından posthoc Tukey testi ve Wilcoxon Signed Ranks testleri kullanıldı. P<0,05 ve altındaki değerler anlamlı olarak kabul edildi.

## V- BULGULAR

### A- EVANS BLUE BOYASININ BEYİN DOKUSUNDAKİ KANTİTATİF DEĞİŞİKLİKLERİ

Deney gruplarındaki hayvanların beyinleri, EB boyası enjeksiyonundan 30 dakika sonra çıkarılmış ve elde edilen beyinlerin makroskopik görünimleri Şekil 8’de verilmiştir.

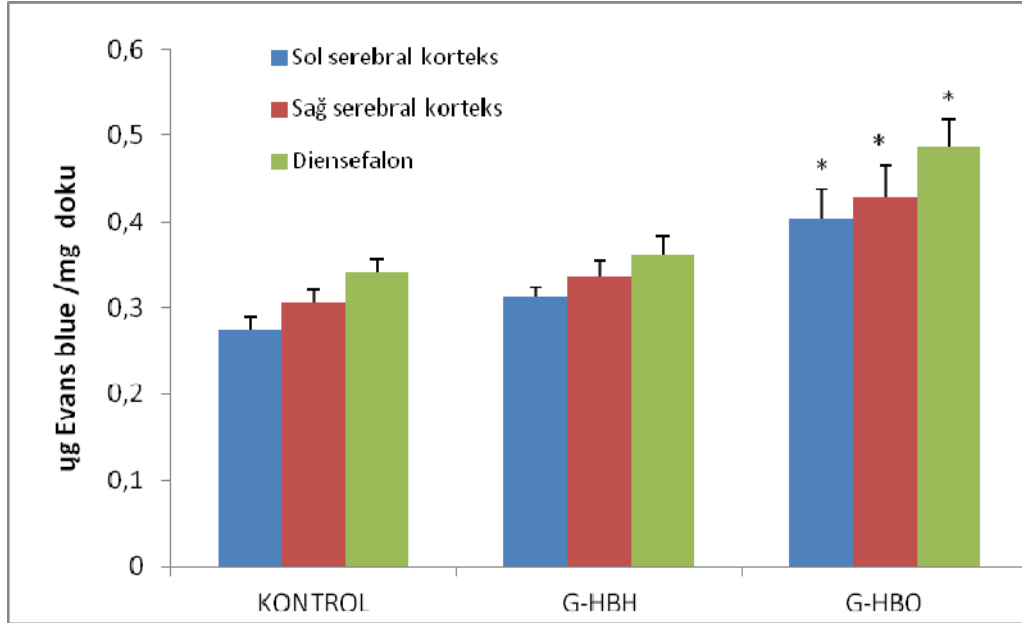


**Şekil 8.** EB boyası enjeksiyonundan sonra alınan beyin örnekleri  
(a) Kontrol, (b) G-HBH, (c) G-HBO grupları. Makroskopik olarak gruplar arasında belirgin bir farklılık izlenmemektedir.

Kontrol, G-HBH ve G-HBO gruplarındaki sıçanların beyin dokusuna geçen EB boyası miktarı, beyin sağ serebral korteks, sol serebral korteks ve diensefalon bölgelerinden kantitatif metodla ölçülmüştür. Makroskopik görünümün aksine, kontrol ve G-HBH grubu ile karşılaştırıldığında, G-HBO grubunda, beyin dokusuna geçen EB boyasının miktarında anlamlı artış tespit edilmiştir ( $p<0,05$ ). Tüm gruplarda beyin dokusuna geçen EB boya miktarı (Tablo 6) ve grafiği verilmiştir (Grafik 2).

|                | Sol serebral korteks | Sağ serebral korteks | Diensefalon   |
|----------------|----------------------|----------------------|---------------|
| <b>KONTROL</b> | 0,274 ± 0,016        | 0,306 ± 0,015        | 0,342 ± 0,015 |
| <b>G-HBH</b>   | 0,312 ± 0,011        | 0,337 ± 0,017        | 0,362 ± 0,021 |
| <b>G-HBO</b>   | 0,404 ± 0,033        | 0,429 ± 0,037        | 0,487 ± 0,033 |

**Tablo 6.** Beyin dokusuna geçen EB boyası miktarının kantitatif değerleri (µg EB/mg beyin dokusu). Ortalama (X) ± Standart hata (SE) olarak kabul edilmiş (n=8)



**Grafik 2.** Beyin dokusuna geçen EB boyası miktarının kantitatif değerleri.

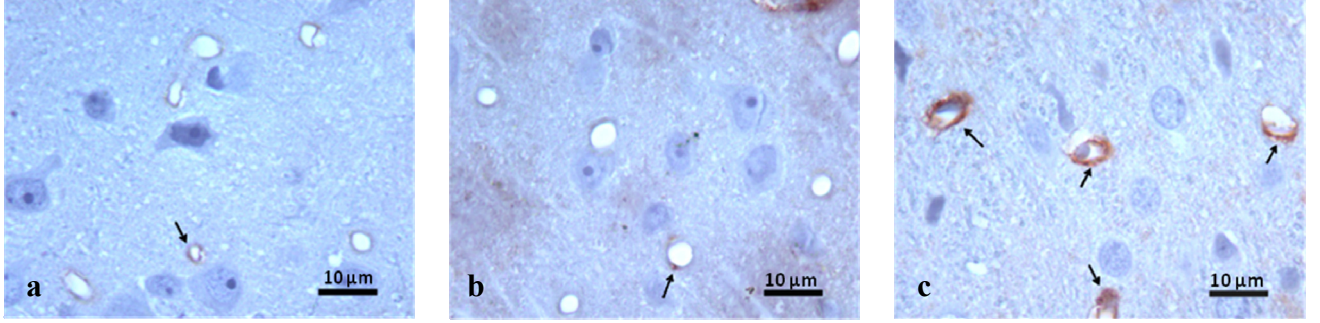
## B- İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYANMA DEĞİŞİKLİKLERİ

Işık mikroskopunda x1000 büyütmede, beyin dokusu kesitlerinde, sırasıyla AQP-4, okludin ve kaveolin-1 immün boyanmaları Şekil 9, 10 ve 11’de verilmiştir.

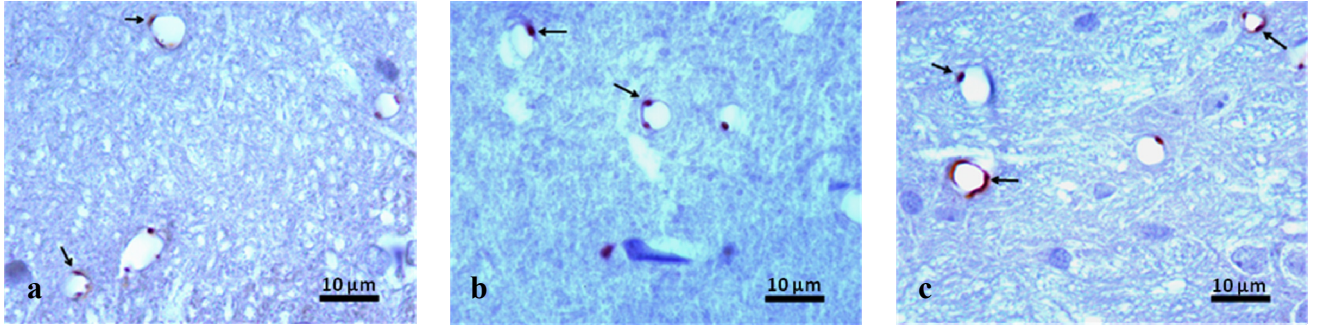
AQP-4’ün görüntü analizi ile rölatif boyanma yoğunluğunun, kontrol ve G-HBH grupları ile karşılaştırıldığında G-HBO grubunda anlamlı olarak arttığı saptanmıştır (p<0.01), (Grafik 3).

Okludinin rölatif boyanma yoğunluğu incelendiğinde, G-HBO grubunda nispeten artış saptanmış, diğer gruplarla karşılaştırıldığında bu artış anlamlı bulunmamıştır (Grafik 4).

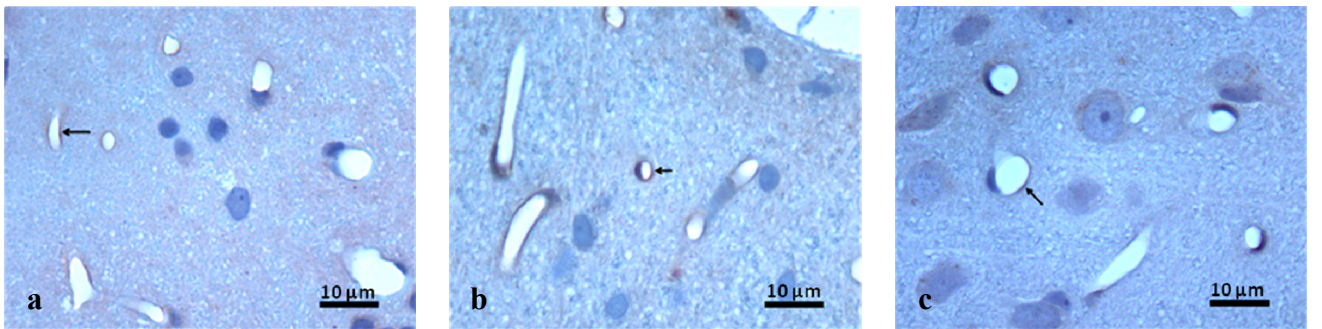
Kaveolin-1'in imaj analizi ile rölatif boyanma yoğunluğunda, gruplar arasında fark gözlenmemiştir (Grafik 5).



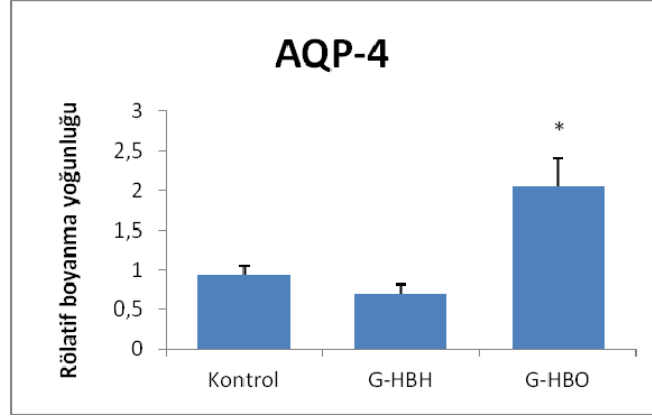
**Şekil 9.** AQP-4 immün boyanması (a) Kontrol, (b) G-HBH, (c) G-HBO grupları. Kapiller lümeni kuşatan astrosit ayakçıklarındaki AQP-4'ün immün boyanması özellikle G-HBO grubunda belirgindir (ok ile gösterilmiştir).



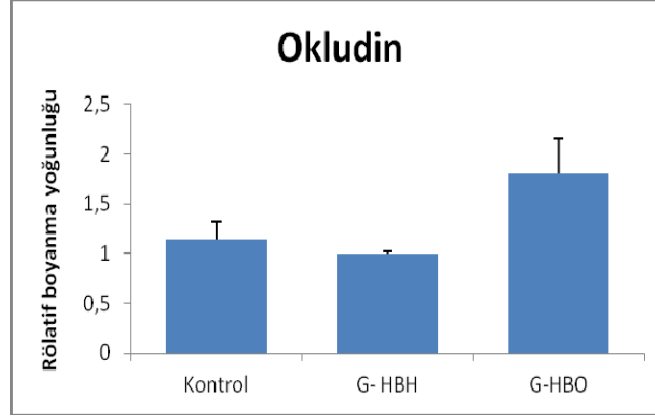
**Şekil 10.** Okludin immün boyanması (a) Kontrol, (b) G-HBH, (c) G-HBO grupları. Sıkı bağlantılarda bulunan okludin immün boyanmasında gruplar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (ok ile gösterilmiştir).



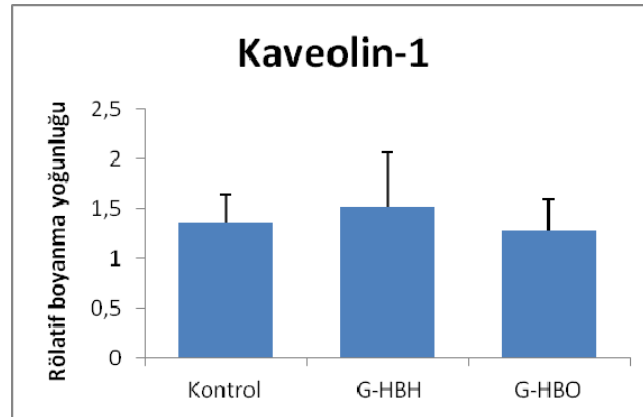
**Şekil 11.** Kaveolin-1 immün boyanması (a) Kontrol, (b) G-HBH, (c) G-HBO grupları. Endotel membranında bulunan kaveolin-1'in immün boyanmasında gruplar arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir (ok ile gösterilmiştir).



**Grafik 3.** AQP-4 rölatif boyanma yoğunluğu. Ortalama ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Standart hata (SE) olarak kabul edilmiştir (n=8).



**Grafik 4.** Okludin rölatif boyanma yoğunluğu. Ortalama ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Standart hata (SE) olarak kabul edilmiştir (n=8).

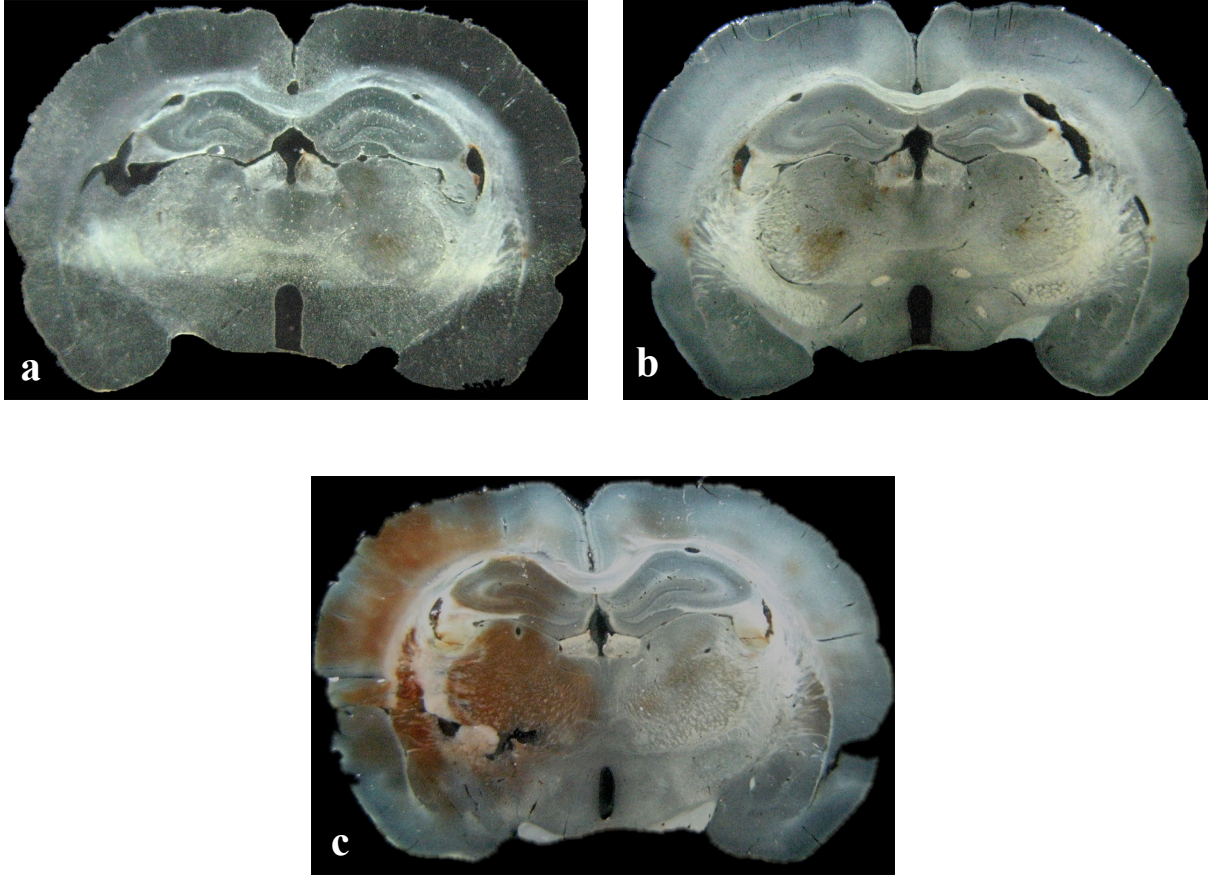


**Grafik 5.** Kaveolin-1 rölatif boyanma yoğunluğu. Ortalama ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Standart hata (SE) olarak kabul edilmiştir (n=8).



### C-HRP TRASERİNİN MAKROSKOBİK GÖRÜNÜMÜ

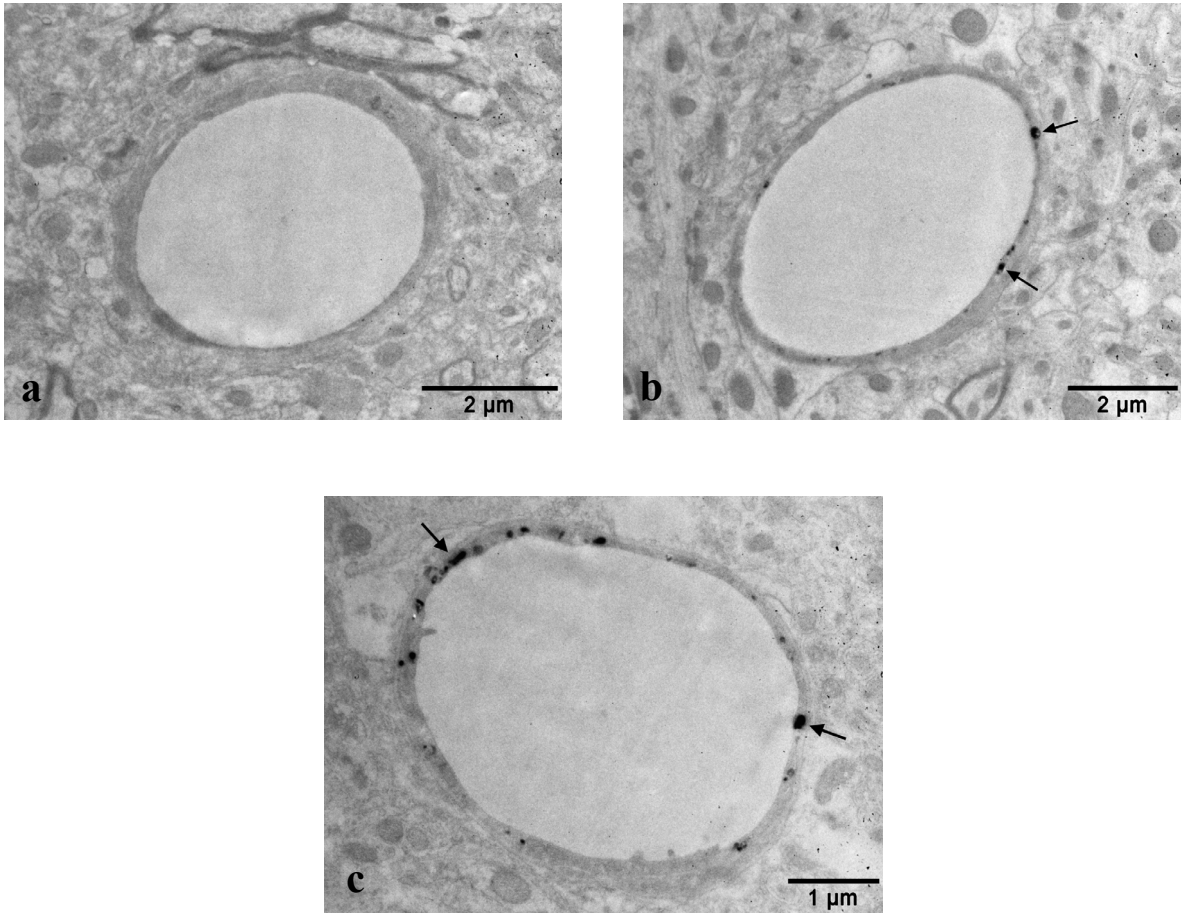
Kontrol grubundaki sıçanların beyin parankimine geçemeyen HRP'nin, diğer deney gruplarındaki sıçanların beyninden alınan koronal kesitlerde, kortikal ve subkortikal alana geçtiği gözlemlendi. HRP geçişi bu bölgelerde kahverengi reaksiyon olarak izlendi (Şekil 12). HRP reaksiyonu, G-HBO grubunda daha belirgin olarak gözlemlendi.



**Şekil 12.** Beyin dokusu koronal kesitlerinde HRP reaksiyonu  
(a) Kontrol, (b) G-HBH, (c) G-HBO grupları. HRP-reaksiyon ürünü (kahverengi) görülmektedir.

#### D- ELEKTRON MİKROSKOPİ BULGULARI

Elektron mikroskopik değerlendirmede, G-HBO ve G-HBH gruplarında, kapiller endotel hücreleri içine HRP traserinin geçişi gözlenmiştir. Bu geçiş G-HBO grubunda daha fazla izlenmektedir. Kontrol grubunda ise herhangi bir geçiş saptanmamıştır (Şekil 13). Ayrıca tüm gruplarda, endotel hücre bütünlüğünün korunmakta olduğu ve endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların (TJ) kapalı olduğu gözlenmiştir.



**Şekil 13.** Elektron mikroskopi görüntüleri **(a)** Kontrol, **(b)** G-HBH, **(c)** G-HBO grupları. HRP traserinin endotel hücre sitoplazmasındaki kaveolar veziküller içindeki görünümü (Ok ile gösterilmiştir).

## VI- TARTIŞMA

Klinik uygulamalarda HBOT'nin KBB üzerindeki etkileri bilinmemektedir. HBO'nun KBB geçirgenliği üzerine olası etkileriyle ilgili olarak farklı deney hayvanlarında yapılan kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda farklı HBO protokolleri ve KBB geçirgenliğini değerlendirmek üzere farklı traserler kullanılmış olup çalışmaların sonuçları da farklılık göstermektedir.

KBB'de geçirgenlik artışı, bazı moleküllerin bariyeri aşarak beyin dokusuna ulaşmasına neden olup istenmeyen etkileri ortaya çıkarabileceği gibi, özellikle MSS'yi etkilemesi istenen ilaçların bariyeri aşmasına olanak sağlayarak olumlu bir etkiye de neden olabilir. Bu nedenle HBO'nun KBB üzerine etkilerinin bilinmesi, hem klinik uygulamalarda HBOT'nin MSS üzerine etkilerinin aydınlatılmasını sağlayacak, hem de MSS hastalıklarına yönelik tedavilerde HBO'nun adjuvan olarak kullanılıp kullanılmayacağı konusunda fikir verecektir.

HBO'nun KBB üzerine etkileriyle ilgili farklı deney hayvanlarıyla yapılan çalışmaların önemli bir bölümünde kontrol grubunu, normobarik şartlarda %100 oksijen veya hava soluyan hayvanlar oluşturmaktadır (26, 44). Gruenau ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kontrol grubunu 2,5 ATA basınç altında 0,3 ATA kısmi basınçla oksijen solutulan sıçanlar oluşturmuştur (26). Lanse ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise kontrol grubunu 2,5 ATA basınç altında %10 oksijen soluyan sıçan ve kediler oluşturmuştur (44). Bu iki araştırma dışındaki çalışmalarda hiperbarik ortamın kendisinin KBB üzerine olası etkisi konusunda yorum yapmak mümkün görünmemektedir. Çalışmamıza 2,5 ATA'da %100 oksijen soluyan G-HBO grubunun yanında, 2,5 ATA'da hava soluyan G-HBH grubu da dahil edilmiştir. Her ne kadar hiperbarik seanslar esnasında G-HBH grubundaki sıçanların solunum ortamındaki oksijenin kısmi basıncı artsa da, bu değer G-HBO grubundaki sıçanların solunum ortamındaki oksijenin kısmi basıncının yaklaşık beşte biri kadardır. Bu durumda hiperbarik ortamın kendisinin KBB geçirgenliği üzerine etkisi olması halinde her iki grupta da aynı etkinin görülmesi gerektiğini, solunan ortamındaki oksijenin kısmi basıncının etkili olması halinde ise bu etkilerin G-HBO grubunda, G-HBH grubuna kıyasla daha belirgin görülmesi gerektiğini söylemek mümkündür.

Daha önceki HBO ve KBB ile ilgili yapılan çalışmalarda KBB geçirgenliğini değerlendirmek için traser olarak <sup>14</sup>C-sukroz, cadmium-free ferritin, sodyum floresan, floresan EB, EB boyası ve HRP kullanılmıştır. Kullanılan bu traserler farklı özelliklerde olup



molekül ağırlıkları değişkendir. Traserler, değerlendirmede kullanılacak olan yöntemle göre seçilmektedir (38). Bizim çalışmamızda yaygın olarak kullanılan ve kabul gören iki traser kullanılmıştır. Elektron mikroskopik inceleme için 40.000 Da molekül ağırlığındaki elektrondens bir traser olan HRP, makroskopik ve kantitatif değerlendirmeye olanak tanıyan 69.000 Da molekül ağırlığındaki EB boyası kullanılmıştır. KBB'deki geçirgenlik artışının hangi yolla olduğu konusunda fikir edinmek içinde immünohistokimyasal incelemede okludin, kaveolin-1 ve AQP-4 immün boyanma yoğunlukları değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda EB boyası sadece G-HBO grubunda KBB'yi geçebilmiştir. Bu durumda hiperbarik seanslar esnasında, kısmi basıncı yüksek oksijen solumanın KBB'de EB boyasına karşı geçirgenliği arttığını söylemek mümkündür. Esasen hiperbarik seanslar esnasında G-HBH grubundaki sıçanların soluduğu hava içindeki oksijenin kısmi basıncı da artmıştır. Ancak bu artış normobarik şartlara göre G-HBH grubunda yaklaşık olarak 2,5 kat iken, G-HBO grubunda yaklaşık 12,5 kat fazladır. Bulgular, KBB'de EB boyasına karşı geçirgenlik artışının olabilmesi için, solunan gaz içindeki oksijen kısmi basıncının belirli bir limitin üzerinde olması gerektiğini düşündürmektedir. Dolayısıyla bu durum, hiperbarik ortamın kendisinin KBB'de EB boyasına karşı geçirgenlik artışına neden olmadığı yönünde değerlendirilebilir. Bu bulgu Gruenau ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptığı ve traser olarak <sup>14</sup>C-sukroz kullandığı çalışma sonucu ile uyumlu değildir (26). Ancak bu çalışmada traserin farklı olmasının yanında HBO uygulama dozu ve süresi de farklıdır. Bu çalışmada 2,5 ATA'da 90 dakikadan oluşan HBO seansları günde bir kez beş gün süreyle uygulanırken, bizim çalışmamızda dört seans HBO uygulaması 24 saat içinde yapılmıştır. Her iki çalışmanın sonuçlara bakarak KBB üzerine etkisi açısından HBO dozunun önemli bir faktör olduğu söylenebilir. Ayrıca kullanılan traserlerin farklı olması da sonuçtaki farklılığa neden olabilir. HBOT, klinik kullanımında söz konusu iki çalışmadakine benzer protokollerle uygulanmaktadır. Akut travmatik iskemiler, CO zehirlenmesi, gazlı gangren gibi akut endikasyonlarda HBOT çalışmamızdakine benzer protokollerde uygulanmaktadır. Bu nedenle HBOT uygulamalarında KBB'de geçirgenlik artışına bağlı olası etkilerin, çalışmamızda bahsedilen süre ve dozda HBOT uygulanan hastalarda araştırılması uygun olabilir.

Çalışmamızda HBO ve HBH'nın, beyinde hem makroskopik hem de elektron mikroskopik olarak, HRP geçişine izin verecek ölçüde KBB geçirgenliğini arttırdığı gözlenmiştir. Ancak G-HBO grubunda HRP geçişi G-HBH grubuna kıyasla hem makroskopik hem de elektron mikroskopik olarak daha fazla görülmektedir. Bu bulgular Lanse ve arkadaşlarının sıçan ve kediler üzerinde yaptığı deneysel çalışma sonuçlarıyla uyumludur

(44). Araştırmacıların uyguladığı HBO protokolü ve kullandıkları traser bizim çalışmamızdakinden farklı olup, kullandıkları deney hayvanı sayısı ve cinsleri farklıdır. Araştırmacılar deney grubu ve kontrol grubu için ikişer farklı cins hayvan (sokak kedisi ve sıçan) kullanmışlardır. Söz konusu çalışmada HBO 2,5 ATA'da 90 dakika, günde bir kez ve beş gün süreyle verilmiştir. Bizim uygulamamızla kıyaslandığında uyguladıkları doz daha düşüktür. Ayrıca Lanse ve arkadaşları çalışmada traser olarak cadmium-free ferritin kullanırken, bizim çalışmamızda HRP kullanılmıştır. Her iki çalışmada da sıkı bağlantılarda herhangi bir açılma ya da pinostotik vezikül tespit edilmemiş olup, KBB bütünlüğünde de bozulma tespit edilmemiştir. Bu bulgular cadmium-free ferritin ve HRP'nin KBB'yi transelüler yolla geçtiğini düşündürmektedir. Lanse ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HBO soluyan grup, 2,5 ATA da %10 oksijen içeren nitrojen-oksijen karışımı soluyan sıçanlar ile karşılaştırılmıştır. Bu grupta solunan gaz içindeki oksijenin kısmi basıncı 0,25 ATA olup, KBB'den cadmium-free ferritin geçişi görülmemiştir. Bizim çalışmamızda daha az olmakla birlikte HRP geçişi G-HBH grubunda da tespit edilmiştir ve bu grubun hiperbarik seanslar sırasında soluduğu oksijenin kısmi basıncı ise 0,5 ATA civarındadır. Elektron mikroskopisi sonuçlarına bakarak, HRP'ye karşı muhtemel transelüler geçişin, HBH ile sağlanan kısmi oksijen basıncı artışında dahi (kontrol grubuna kıyasla 2,5 kat) gerçekleşebileceğini söylemek mümkündür. İstatistiksel olarak değerlendirme yapılmasa da, makroskobik ve elektron mikroskobik olarak HRP geçişinin G-HBO grubunda daha fazla olması, geçirgenliğin solunan oksijenin kısmi basıncındaki yükselmeye paralel olarak arttığını düşündürmektedir.

Avtan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, çekal ligasyon yöntemi ile sepsis oluşturulan sıçanlarda HBO'nun KBB'de EB boyasına karşı geçirgenliği azalttığı, ancak HRP geçişi üzerine etkisi olmadığı belirtilmiştir (4). Aynı çalışmada sağlıklı sıçanlarda HBO'nun KBB geçirgenliğini arttırdığı belirtilmektedir. Sağlıklı sıçanlarda uygulanan HBO ile elde edilen bulgular bizim çalışmamız ile uyumludur. Septik koşullarda KBB'de geçirgenlik artışını gösteren birçok çalışma mevcuttur. Sepsis patogeneğinde endotel disfonksiyonu anahtar rol oynamaktadır. Endotel fonksiyonlarında bozulma; sitokinler (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), kemokinler, kompleman aktivasyonu (C3, C5a), bradikinin, bakteri toksinleri, reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türevleri nedeniyle oluşmaktadır (25). Endotelde oluşan yapısal ve fonksiyonel bozulmayla geçirgenlik artmakta, trombosit agregasyonu ve lökosit adezyonu oluşmaktadır. HBO, indüklenmiş makrofajlardan IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  salınımını azaltmakta ve endotoksin aracılı oksidatif stresi azaltmaktadır (7, 45). HBO'nun sepsiste mortalite ve morbiditeyi azalttığını

bildiren çalışmalarda mevcuttur (68). Bu nedenle, sepsiste artan KBB geçirgenliğinin HBO uygulamasıyla azalması söz konusu olabilir.

Çalışmamızda traserlerin geçiş yollarıyla ilgili detaylı bilgi elde edebilmek için, immünohistokimyasal olarak kaveolin-1, okludin ve AQP-4 yoğunluğuna da bakılmıştır.

Gruplar arasında kaveolin-1 rölatif boyanma yoğunluğunda anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bu bulgular HBO'nun kaveolin-1 proteininde immünohistokimyasal yöntemle belirlenebilecek bir farklılık yaratmadığını düşündürmektedir. Literatürde HBO ve kaveolin-1 ile ilgili yapılmış bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda okludinin boyanma yoğunluğu, HBO grubunda göreceli olarak artmış, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bu sonuç HBO veya HBH'nın sıkı bağlantılarda anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı yönünde yorumlanabilir. Nitekim, G-HBO ve G-HBH grubundaki sıçanların beyin dokusuna HRP geçişi saptanmasına rağmen elektron mikroskopisinde sıkı bağlantıların kapalı olduğu gözlenmiştir. Okludin boyanma yoğunluğunda değişiklik olmaması ve sıkı bağlantıların kapalı olması, madde geçişinin paraselüler yolla değil, transelüler bir yolla gerçekleştiğini destekler niteliktedir.

AQP-4'ün immünohistokimyasal inceleme sonuçlarına baktığımızda, rölatif boyanma yoğunluğunun G-HBO grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Beyinde, iskemi, travma ve subaraknoid hemorajiye bağlı hasarlarda, AQP-4 ekspresyonu değişmektedir. Travmada ilk 24 saat içinde AQP-4 ekspresyonunun azaldığı görülürken, travmanın aksine geçici (transient) orta serebral arter oklüzyonuna bağlı inmede, hasar oluşacak bölgede ilk 1 saat içerisinde AQP-4 ekspresyonu artmaktadır. Ancak daha şiddetli inme modellerinde bu erken dönem ekspresyon artışı gözlenmemektedir (5). AQP-4 artışı ile beyin ödemi ilişkilendiren başka çalışmalar da mevcuttur (62, 37). Çalışmamızda incelediğimiz kesitlerde, histopatolojik olarak herhangi bir ödem bulgusu saptanmamıştır. AQP-4'ün boyanma şiddetindeki bu artışın, HBO'nun KBB geçirgenliğini arttırmasına karşı oluşan, su ve iyon dengesini korumaya yönelik bir cevap olabileceğini düşündürmektedir. Öte yandan beyin ödeminde HBOT kullanımının antiödem etki gösterdiği de bilinmektedir (64). Veltkamp ve arkadaşları HBO'nun, sıçan ve farelerde oluşturulan fokal serebral iskemi sonrası ortaya çıkan ödemi ve KBB geçirgenliğini azalttığını bildirmişlerdir (71). Ayrıca postiskemik dönemde uygulanan HBO'nun, serebral mikrovasküler bazal lamina

degradasyonunu azalttığı gösterilmiştir (70). Mink ve arkadaşları, tavşanlarda oluşturulan global serebral iskemi sonrası uygulanan HBO'nun beyin kan akımını azalttığını, floresan EB ile yaptıkları fotometrik ölçümlerde de KBB geçirgenliğini azalttığı göstermişlerdir (47).

HBO'nun KBB geçirgenliği üzerine etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar oldukça az sayıda olsa da, sonuçlar daha çok HBO'nun sağlıklı deney hayvanlarında KBB geçirgenliğini arttırdığı yönündedir. Bu geçirgenlik artışı nedeniyle, MSS hastalıklarının tedavisinde HBO'nun adjuvan olarak kullanılabileceğine işaret eden çalışmalar da mevcuttur. Örneğin invitro şartlarda sığır beyin endoteleli üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada, anti-kanser bir ajan olan Karboplatin'in beyin endotel hücrelerinden geçişinin, HBO uygulaması ile arttığı tespit edilmiştir (73). Sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, Karboplatin'in enjeksiyonu sonrası beyin dokusundaki düzeyleri ölçülmüş, kontrol grubunda Karboplatin ölçülemeyecek düzeyde iken, HBO soluyan sıçanlarda yüksek oranda tespit edilmiştir (65). Bu deneysel çalışmalar özellikle beyin tümörlerinde ve metastazlarında, anti-kanser ajanlara ek olarak adjuvan HBO kullanımı konusunda umut vaad etmektedir.

## VII- SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Sağlıklı sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada, HBO solumanın KBB’de EB boyasına geçirgenliği arttırdığı tespit edilmiştir. HBH solumayla EB boyasına karşı geçirgenliğin değişmemesi, G-HBO grubundaki geçirgenlik artışının hiperbarik ortamın kendisinden değil, oksijenin kısmi basıncındaki artışa bağlı olduğunu işaret etmektedir.

Çalışmamızda ayrıca HBO ve HBH solumanın KBB’de HRP’ye karşı geçirgenliği arttırdığı saptanmıştır. Bu artış G-HBO grubunda daha fazla olmuştur. G-HBO ve G-HBH gruplarında, makroskopik ve elektron mikroskopik düzeyde HRP geçişi olmasına rağmen, sıkı bağlantıların kapalı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal olarak bir sıkı bağlantı proteini olan okludinin boyanma yoğunluğunda gruplar arasında değişiklik tespit edilmemiştir. Bu bulgular HRP’nin KBB’den transselüler yolla geçtiğini düşündürmüştür.

Çalışmamızda HBO veya HBH 24 saat içinde 4 kez verilmiştir. Daha uzun sürelerde uygulanan HBO veya HBH’nin etkilerini görmek, herhangi bir adaptasyonun söz konusu olup olmadığını anlamak, bozulan KBB geçirgenliğinin ne zaman geri döndüğü konusunda fikir edinebilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Ayrıca bu deneyde farklı molekül ağırlığına sahip iki traser kullanılmıştır. Farklı molekül ağırlığına ve özelliklere sahip daha fazla traser ile yapılacak çalışmalar, HBO ve KBB geçirgenliği ile ilgili daha fazla bilgi verecektir. Çalışmada hiperbarik ortamın etkisini de görmek için deneklere hiperbarik ortamda hava solutulmuştur. Aslında 2,5 ATA basınç altında hava solutulduğunda oksijenin kısmi basıncını da 2,5 kat artmıştır. Bu basınç değeri yaklaşık olarak normobarik şartlarda %50 oranında oksijen solutmayla elde edilen oksijen kısmi basıncı kadardır. Oksijen basıncındaki bu artışın KBB geçirgenliğini etkilemesi olasıdır. Bu nedenle KBB üzerine hiperbarik ortamın bizzat kendisine ait etkileri konusunda değerlendirme yapabilmek için, deneklere basınç altındayken, normobarik şartlardaki oksijen kısmi basıncını sağlayacak, nitrojen/oksijen karışımı solutulmalıdır.

## VIII- KAYNAKLAR

1. Abbott NJ, Patapendige AA, Dolman DE et al. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(1):13-25.
2. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neuroscience.* 2000; 7:41-53.
3. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol.* 2005; 25(1):5-23.
4. Avtan SM, Kaya M, Orhan N, et al. The effects of hyperbaric oxygen therapy on blood-brain barrier permeability in septic rats. *Brain Res.* 2011 Sep 15;1412:63-72.
5. Badaut J, Ashwal S, Obenaus A. Aquaporins in cerebrovascular disease: a target for treatment of brain edema? *Cerebrovasc Dis.* 2011;31(6):521-31. Epub 2011 Apr 12.
6. Banerjee S, Bhat MA. Neuron-Glial interactions in blood-brain barrier formation. *Ann Rev Neurosci.* 2000; 30:235-258.
7. Benson RM, Minter LM, Osborne BA, et al. Hyperbaric oxygen inhibits stimulus-induced proinflammatory cytokine synthesis by human blood-derived monocyte-macrophages. *Clin Exp Immunol.* 2003 Oct;134(1):57-62.
8. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K et al. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Reports,* 2008; 60(5):600-622.
9. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood- brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* 1980; 192:17-28.
10. Betz AL. An Overview of the Multiple Functions of the Blood-Brain Barrier. In: Frankenheim J, Brown MG (eds). *Bioavailability of Drugs to the Brain and the Blood-Brain Barrier.* U.S. Department of Health and Human Services, publication number (AMD): 92-1910. Printed 1992; 54-72.
11. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* 1990; 429:47-62.
12. Conford EM, Hyman S. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx.* 2005; 2(1):27-43.
13. Coomber BL, Stewart PA. Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc Res.* 1985; 30:99-115.

14. Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, et al. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol.* 1999 Dec 27;147(7):1569-1582.
15. Correale J, Villa A. Cellular element of the blood-brain barrier. *Neurochem res.* 2009; 34:2067-2077.
16. Çimşit M. Basınç Odaları. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1. Basım.* Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 13-22.
17. Çimşit M. Hiperbarik Oksijenin Etki Mekanizması. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1. Basım.* Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 23-34.
18. Çimşit M. Hiperbarik Tedavinin Tarihçesi. In: Çimşit M (ed). *Hiperbarik Tıp 1. Basım.* Ankara, Eflatun Yayınevi, 2009; 1-12.
19. De Vries HE, Kuiper J, de Boer AG. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. *Pharmacol Rev.* 1997 Jun;49(2):143-155.
20. Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y et al. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005 Feb;25(1):59-127.
21. Elliot D, Kindwall EP. Decompression Sickness. In: Kindwall EP and Whealn HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice 2nd revised ed.* USA, Best Publishing Company, 2002; 434-485.
22. Eng LF, Ghirnikar RS. GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol.* 1994 Jul; 4(3):229-237.
23. Engelhardt B. Sorokin L. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 2009 Nov; 31(4):497-511.
24. Feldmeier JJ. Hyperbaric Oxygen 2003. Indications and Results. In: Feldmeier JJ (ed). *The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report.* UHMS. Kensington, Maryland, 2003; 87-100.
25. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, et al. Pathophysiology of septic encephalopathy--an unsolved puzzle. *Crit Care.* 2010;14(3):165
26. Gruenau SP, Folker MT, Rapoport SI. Lack of hyperbaric O<sub>2</sub> effect on blood-brain barrier permeability in conscious rats. *Aviat Space Environ Med.* 1981; 52(3):162-165.
27. Gu Y, Dee CM, Shen J. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011; 3:1216-1231.

28. Gu Y, Zheng G, Xu M, et al. Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J. Neurochem.* 2012; 120 (1):147-156.
29. Gültürk S, İmir G, Tuncer E. Kan beyin bariyeri. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2007; 29(2):147-154.
30. Hammarlund C. The Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygenation. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice*, 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 37-68.
31. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Uygulanan Özel Sağlık Merkezleri Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete. Tarih: 01.08.2001, sayı 24480.
32. Hyperbaric Oxygen Therapy Indications, The Hyperbaric Oxygen Therapy Committee Report. Ed: Gesell LB. Undersea and Hyperbaric Medical Society, Inc. Durham, USA, 2008.
33. Jain KK. History Of Hyperbaric Medicine In: Jain KK (ed). *Textbook Of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 2-10.
34. Jain KK. Hyperbaric Oxygen Therapy in Infections. In: JAin KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 189-192.
35. Jain KK. Indications, Contraindications, and Complications of Hyperbaric Oxygen Therapy. In: Jain KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 105-108.
36. Jain KK. Physical, Physiological, and Biochemical Aspects of Hyperbaric Oxygenation. In: Jain KK (ed). *Textbook of Hyperbaric Medicine* 3rd ed. Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, Hogrefe&Huber Publishers, 1999; 11-28.
37. Karasu A, Aras Y, Sabancı PA, et al. The effects of protein kinase C activator phorbol dibutyrate on traumatic brain edema and aquaporin-4 expression. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2010; 16(5):390-394.
38. Kaya M, Ahishali B. Assessment of permeability in barrier type of endothelium in brain using traser: evans blue, sodium florescein, and horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol.* 2011; 763:369-382.
39. Kemer A, Muth C, Mathieu D. Patient Management. In: Mathieu M (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Nederlands, Springer, 2006; 651–670.

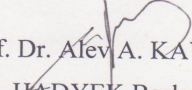
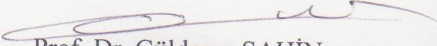
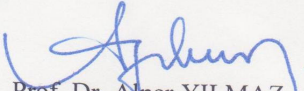
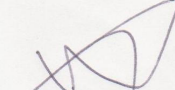
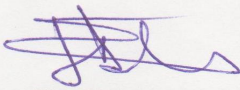


40. Kindwall EP. A History of Hyperbaric Medicine. In Kindwall EP (ed). *Hyperbaric Medicine Practice*. USA, Best Publishing Company 2002; 1-20.
41. Kindwall EP. Contradictions and Side Effects to Hyperbaric Oxygen Treatment. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 84-96.
42. Kindwall EP. The Physics of Diving and Hyperbaric Pressures. In Kindwall EP, Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 21-36.
43. Knighton DR, Silver IA, Hunt TK. Regulation of wound-healing angiogenesis: effect of oxygen gradients and inspired oxygen concentration. *Surgery*. 1981; 90:262-270.
44. Lanse SB, Lee JC, Jacobs EA, et al. Changes in the permeability of the blood-brain barrier under hyperbaric conditions. *Aviat Space Environ Med*. 1978; 49(7):890-894.
45. Lin HC, Wan FJ. Hyperbaric oxygenation reduces overexpression of c-Fos and oxidative stress in the brain stem of experimental endotoxemic rats. *Intensive Care Med*. 2008 Jun;34(6):1122-1132.
46. Mathieu D, Wattel F. Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen on Microorganisms and Host Defences Against Infection, In: Mathieu M (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 103–120.
47. Mink RB, Dutka AJ. Hyperbaric oxygen after global cerebral ischemia in rabbits reduces brain vascular permeability and blood flow. *Stroke*. 1995 Dec;26(12):2307-2312.
48. Nadal A, Fuentes E, Pastor J et al. Plasma albumin is a potent trigger of calcium signals and DNA synthesis in astrocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 February 28; 92(5): 1426–1430.
49. Nag S. Blood-brain barrier permeability using tracers and immunohistochemistry. *Methods Mol Med*. 2003; 89:133-144.
50. Namer IJ, Steibel J, Poulet P, et al. Hyperbaric oxygen treatment in acute experimental allergic encephalomyelitis. Contribution of magnetic resonance imaging study. *Neuroimage*. 1994; 1(4):308-312.
51. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier. *J Cell Science* 2001; 114:1297-1307.
52. Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, et al. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia*. 2003; 42:235–251.

53. Niinikoski J, Hunt TK, Dunphy JE. Oxygen supply in healing tissue. *Am J Surg.* 1972; 123:247-252.
54. Niinikoski J. Physiologic Effects of Hyperbaric Oxygen on Wound Healing Processes. In: Mathieu D (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 135-146.
55. Palmquist BM, Philipson B, Barr PO. Nuclear cataract and myopia during hyperbaric oxygen therapy. *Br Journal of Ophthalmology*, 1984; 68(2):113-117.
56. Park M. Effects of Hyperbaric Oxygen in Infectious Diseases: Basic Mechanism. In Kindwall EP and Whelan HT (eds). *Hyperbaric Medicine Practice* 2nd revised ed. USA, Best Publishing Company, 2002; 205-244
57. Paulson OB. Blood–brain barrier, brain metabolism and cerebral blood flow. *Eur Neuropsychopharmacol.* 2002 Dec; 12(6):495-501.
58. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J et al. Blood–brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006 Sep; 1(3):223-236.
59. Reiber H. Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid. *Clinica Chimica Acta* 2001; 310:173–186.
60. Roque F, Simao A. Barotraumatism. In: Mathieu M (ed). *Handbook on Hyperbaric Medicine*, Netherlands, Springer, 2006; 715–730.
61. Silver IA. The measurement of oxygen tension in healing tissue. *Progr Resp Res.* 1969; 3:124-135.
62. Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *ancet Neurol.* 2007 Mar;6(3):258-68.
63. Stevenson BR, Keon BH. The tight junction: morphology to molecules. *Ann Rev Cell Devel Biol.* 1998; 14:89-109.
64. Sukoff MH, Ragatz RE. Hyperbaric oxygenation for the treatment of acute cerebral edema. *Neurosurgery.* 1982; 10(1):29-38
65. Suzuki Y, Tanaka K, Neghishi D, et al. Increased distribution of carboplatin, an anti-cancer agent, to rat brains with the aid of hyperbaric oxygenation. *Xenobiotica.* 2008 Dec;38(12):1471-1475.
66. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing – more than a nutrient. *World J. Surg.* 2004; 28, 294-300.
67. The 7th European Consensus Conference on Hyperbaric Medicine. In Mathieu D. (ed). *Conference Report ECHM, Lille, 3th-4th Dec 2004.*

68. Thom SR, Lauermann MW, Hart GB. Intermittent hyperbaric oxygen therapy for reduction of mortality in experimental polymicrobial sepsis. *J Infect Dis.* 1986 Sep;154(3):504-510.
69. Ueno M. Molecular Anatomy of the Brain Endothelial Barrier: An Overview of the Distributional Features. *Current Med Chem.* 2007; 14:1199-1206.
70. Veltkamp R, Bieber K, Wagner S, et al. Hyperbaric oxygen reduces basal lamina degradation after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2006 Mar 3; 1076(1):231-237.
71. Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, et al. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2005 Aug; 36(8):1679-1683.
72. Weiss N, Miller F, Cazaubon S et al. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Apr; 1788(4):842-857.
73. Yamazaki H, Shimizu M, Murayama N, et al. Increased transendothelial permeability of anti-cancer agent carboplatin with the aid of hyperbaric oxygenation (Abst). *Xenobiotica.* 2008 Oct;38(10):1298-1304.

**IX- EKLER****EK-1. HADYЕК onay belgesi**

|                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                      |                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                             | <b>T.C</b><br><b>İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ</b><br><b>HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU</b>                              |                                        |
| Sayı: 79                                                                                                                                                                                                                                                     | 27/05/2010                                                                                                           |                                                                                                                           |
| Sn. Prof. Dr. Akın Savaş TOKLU<br>İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi                                                                                                                                                                               |                                                                                                                      |                                                                                                                           |
| Karar No: 79<br>Başvuru Tarihi: 11/05/2010                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                      |                                                                                                                           |
| Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Dr. Nihal Güneş ÇEVİK'e ait "Hiperbarik Ortamda Solunan Hava Ve Oksijenin Kan-Beyin Bariyeri Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur. |                                                                                                                      |                                                                                                                           |
| <br>Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ<br>İ. Ü. HADYЕК Başkanı                                                                                                                      | <br>Prof. Dr. Müjdat UYSAL<br>Üye | <br>Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN<br>Üye   |
| <br>Prof. Dr. Nuriye AKEV<br>Üye                                                                                                                                          | <br>Prof. Dr. Alper YILMAZ<br>Üye | <br>Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK<br>Üye |
| <br>Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ<br>Üye                                                                                                                                    | Avukat Safiye ALTUN<br>Üye                                                                                           | Mak. Müh. Seyfettin AVCI<br>Üye                                                                                           |
| <hr/> İstanbul Üniversitesi<br>Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı<br>İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü 34119 Beyazıt-İSTANBUL<br>TEL : (0 212) 440 00 00/ 10013<br>E mail : hadyek@istanbul.edu.tr                                                 |                                                                                                                      |                                                                                                                           |

## **X- ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ**

1979 yılında Denizli’de doğdum. İlköğretim ve lise eğitimimi Denizli’de tamamladım. 2004 yılında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi’nden mezun oldum. Kasım 2008’de İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı’nda, Tıpta Uzmanlık Öğrencisi olarak çalışmaya başladım. Halen aynı bölümde görevime devam etmekteyim.

e-posta: nihalgunes@yahoo.com