

T1191

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**DENEYSEL GLOBAL SEREBRAL
İSKEMİ - REPERFÜZYON HASARINDA NİTRİK
OKSİT OLUŞUMU, LİPİD PEROKSİDASYONU VE
PROTEİN OKSİDASYONU:
GLUTAMAT SALINIM İNHİBİSYONUNUN
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

T1191/1-1

**UZMANLIK TEZİ
DR. MUSTAFA SERTESER**

**PROF.DR.TOMRİS ÖZBEN
TEZ DANIŞMANI**

**Referans gösterilerek tezinden faydalanılabilir.
ANTALYA,1999**

**AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi**

Asistanlığım süresince her türlü desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Sayın Prof.Dr.Tomris ÖZBEN'e, Biyokimya Anabilim Dalının tüm öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma teşekkür ediyorum

Dr.Mustafa SERTESER

İÇİNDEKİLER

I-GİRİŞ VE AMAÇ:	1
II-GENEL BİLGİLER:	3
1-Serebral Normal Oksidatif Metabolizma:	3
2-Serebral İskemi Çeşitleri:	5
3-Glutamat Nörotoksisitesinin Patofizyolojisi:	6
4-Serebral İskemide Glutamat Kaynağı:	15
5-İskemik Beyin Hasarında Hücresel ve Moleküler Mekanizmalar:	16
A-Kalsiyum Bağımlı Hasar:	16
B-Asidoza Bağımlı Hasar:	20
C-Oksidatif Stres:	22
C-1-NO:	24
C-2-Peroksinitrit:	30
6-Lipid Peroksidasyonu:	30
A-Ferröz İyonları İle Peroksidasyonun Başlaması:	32
B-Non-Enzimatik Lipid Peroksidasyonu:	32
C-Enzimatik Peroksidasyon:	33
7-Tiyoller:	34
A-Glutatyon:	37
8-Protein Karbonil İçeriği:	37
A-Protein Karbonil Gruplarının Orijini:	40
B-Okside Protein Birikiminin Moleküler Temeli:	40
9-Lamotrigine	41
III-MATERYAL VE METODLAR:	44
1-Cerrahi Prosedür:	44
2-Nitrit Tayini:	45
3-Nitrat Tayini:	46
4-MDA Tayini:	48
5-Konjüge Dien Tayini:	50
6-Doku SH Grupları Tayini:	51
7-Doku Protein Karbonil Grupları Tayini:	52
8-Doku Protein Tayini:	53
9-İstatistiksel Analiz	54
IV-SONUÇLAR:	55
1-Doku Nitrit Düzeyleri:	55
2-Doku Nitrat Düzeyleri:	56
3-Doku MDA Düzeyleri:	57
4-Doku Konjüge Dien Düzeyleri:	58
5-Doku Tiyol Grupları Konsantrasyonu:	59
6-Doku Karbonil Düzeyleri:	62

V-TARTIŞMA:	
VI-REFERANSLAR:	64
VII-ÖZET:	79
VIII-ABSTRACT:	91
	93

I-GİRİŞ VE AMAÇ

Amerika Birleşik Devletlerin`de her yıl ortalama 800.000 hasta, kardiyak arrest sonrası, hastanede veya hastane dışında uygulanan kardiyopulmoner resüsitasyon ile spontan kan dolaşımına kavuşmaktadır. Fakat bu hastaların en az % 60'ı hastanede yoğun beyin hasarından ölmekte, sadece hastaların % 3-10'u daha önceki yaşam standartlarına dönmektedir (1).

Özellikle büyük şehirlerde, hastaların acil servislere ulaştırılmalarında karşılaşılan zorluklar, **"6 dakikalık zaman aralığı"** denilen ve resüsitasyon sonucunda hastaların yaşama daha fazla döndükleri zaman diliminde, gerekli müdahalelerin yapılabilmesine imkan vermemektedir. Pratikte de, hastalarda resüsitasyona başlandığı zaman hasar mekanizmalarıda başlatılmış olmaktadır (1).

Günümüzde, klinikte iskemi ve reperfüzyona bağımlı beyin hasarını önleyecek bir tedavi henüz mevcut değildir. Yapılan müdahaleler semptomatik düzeyde kalmaktadır. Serebral iskemi ve reperfüzyondaki patofizyolojik mekanizmaların açığa kavuşması ile, deneysel hayvan modellerinde, insanlardaki klinik tablo benzeri kontrollü lezyonlar oluşturularak, bu patofizyolojik mekanizmalarda ki basamaklara farmakolojik olarak müdahale edilmekte, tedavinin biyokimyasal ve fizyolojik sonuçları kontrol altına alınarak hasar en az seviyede tutulmaya çalışılmaktadır (1).

Merkezi sinir sistemindeki (MSS) nöronların iskemi ve reperfüzyon hasarına yatkın olmaları; iki major hipotezin ortaya atılmasına neden olmuştur. **Eksitotoksik nörotransmitter hipotezi**; İlskemi sırasındaki patolojik olayları, **serbest radikal hipotezi** ise reperfüzyon aşamasındaki olayları kastetmektedir (2,3,4).

Afferent inputları alan nöronlar, fazla miktarda glutamatın, iskemiye bağımlı depolarizasyon sonucu salınımına neden olurlar. İskemiye duyarlı nöronlarda glutamat, NMDA veya AMPA iyonotropik reseptörlerine

bağlanır. NMDA reseptör aktivasyonu Ca^{+2} influksına, AMPA reseptör aktivasyonu ise Na^{+1} influksına neden olur. Artmış intraselüler Na^{+1} ise $3Na^{+1}/Ca^{+2}$ antiporter sistemi ile artmış intraselüler Ca^{+2} 'a neden olur. Artmış intraselüler Ca^{+2} ise sitotoksik etkisini değişik yollarla gösterir (1). Global iskemi sırasında da glutamat salınımının arttığı kesindir. Fakat NMDA reseptör antagonistlerinin global iskemide nöroprotektif etkileri gözlenmemiştir. AMPA reseptör blokajı global iskemide daha iyi protektif etki göstermiştir (1).

Serbest radikal hipotezi ise; nöronların GSH-Px açısından fakir olmaları ve fazla miktarda endojen demir içermelerinden dolayı radikal hasarına daha yatkın olduklarını belirtmektedir. İskemi sonrası yaklaşık 4 dakika içinde beyin ATP düzeyleri tükenmekte ve membran gradientinin kaybolması ile intraselüler Ca^{+2} miktarında artış olmaktadır. Fosfolipazların aktivasyonu ile serbest yağ asitlerinde özellikle serbest arakidonik asit konsantrasyonunda artış olmaktadır. Reperfüzyon aşamasında ise serbest arakidonik asit metabolizması süperoksit radikallerinin ana kaynağını oluşturmaktadır (3).

Membran lipidlerinin, iskemide Ca^{+2} bağımlı lipoliz ile ve reperfüzyonda O_2 radikallerine bağımlı PUFA peroksidasyonu ile hasarı; beyin iskemi ve reperfüzyonunda görülen üç fenomen ile açıklanabilir: 1- Reperfüzyon, duyarlı nöronlarda ultrastrüktürel hasarı hızlandırmakta, 2- İntrakraniyal basıncıdaki değişikliklerle ilişkili olmadan progresif hipoperfüzyon olmakta, 3- Duyarlı bölgelerde in-vivo protein sentez inhibisyonu olmaktadır (1).

Bu çalışmada, ratlarda global serebral İskemi ve reperfüzyon modeli oluşturularak beyin dokusunda NO oluşumu, lipid peroksidasyonu, protein karbonil ve tiyol içeriğindeki değişiklikler biyokimyasal olarak gösterilmeye çalışılmıştır. Lamotrigine ile tedavi edilen ratlarda, bu parametrelerdeki değişiklikler gösterilerek, erken reperfüzyon döneminde glutamat salınım inhibisyonunun etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

II-GENEL BİLGİLER

1-SEREBRAL NORMAL OKSİDATİF METABOLİZMA

MSS, fosfokreatin ve ATP'de bulunan yüksek enerji depolarını kullanarak tüm fonksiyonlarını yerine getirir. ATP'nin ADP ve fosfata hidrolizi ile 7 kcal/mol (29 kJ/mol) serbest enerji açığa çıkar. Açığa çıkan bu serbest enerji ile hücredeki bazı enzimatik olaylar gerçekleşir. Sitoplazmadaki non-oksidatif glikoliz ile ve özellikle mitokondrideki oksidatif solunum ile ATP tekrar elde edilir. Epileptik nöbetlerde görülen artmış beyin aktivitesinde dahi çok az ATP kaybı oluşarak, ATP seviyeleri normal sınırlarda tutulmaya çalışılır. ATP üretimi, beynin hücresel iskeletinin ve nörotransmitterlerin rekonstrüksiyonu için, MSS de glukozun CO₂ ve H₂O'ya oksidasyonuna ihtiyaç vardır. Herbir kullanılan glukoz molekülü için 38 mol ATP üretilmektedir. Kapiller endotelde bulunan özel glukoz transferazları sayesinde glukoz, hücresel ihtiyaca göre beyin hücreleri tarafından alınan en önemli substrattır. Otofaji veya otoliz gibi durumlarda beyin, yağ ve proteinde kullanır. Açlık gibi durumlarda da bazı yağ asitleri ve keton cisimcikleride beynin metabolik ihtiyaçlarını desteklemektedir. Fakat bu moleküller MSS'nin ihtiyacı olan tüm enerjiyi karşılamakta yetersiz kalmaktadırlar. Postneonatal periodda, 40 mg/dl 'nin altındaki hipoglisemi durumlarında konfüzyon, stupor ve koma ortaya çıkmaktadır (5).

Beyin normal olarak metabolik rezervlere sahip değildir. Kısmi O₂ ve substrat azlığında birkaç defans mekanizmasını biraraya getirebilir. Mutlak O₂ azlığında ise, 8 saniye içinde fizyolojik cevapsızlık, ve 10-12 saniye içerisinde ise elektroensefalografik aktivitede silinme meydana gelir. Total iskemide ise, glukoz ve glikojen rezervleri bir-iki dakika içinde yok olur (Tablo 1,2).

Beyin, yüksek enerji ihtiyaçlarını karşılamak için, bir kardiyak atımın yaklaşık 1/5'i gibi yüksek miktarda kan akımına sahiptir. Gri cevherde nöron ve glial hücre sayısı fazla olduğundan, kan akımı ve metabolizma beyaz cevhere göre daha fazladır (5).

Tablo 1: Normal insan beyinde kan akımı, glukoz ve oksijen kullanımı.

Fonksiyon	Değer
Serebral kan akımı	55 ml / 100 gr beyin / dk
Kullanılan glukoz	31 μ mol / 100 gr beyin / dk
Kan glukoz seviyeleri	6 μ mol / ml
Dağıtılan glukoz	330 μ mol / 100 gr beyin / dk
Kullanılan oksijen	156 μ mol / 100 gr beyin / dk
Kan hemoglobin içeriği	0.13 - 0.15 g / ml
Hb O ₂ kapasitesi	60 μ mol / gr
Dağıtılan oksijen (SaO ₂ =%95 ve Hb=14 gr / dl)	440 μ mol / 100 gr beyin / dk
Efektif dağıtılan oksijen	330 μ mol / 100 gr beyin / dk

Tablo 2: Ciddi beyin iskemisinde zaman aralıkları

Fonksiyon	Zaman
Elektroensefalografik disfonksiyon	10-12 saniye
ATP kaybı	120 saniye
İlk nöronal hasar	5 dakika
Ciddi nöronal hasar (Normoglisemi)	10-20 dakika
Enfarkt	
Normoglisemi	1-2 saat
Hiperglisemi	< 1 saat

2-SEREBRAL İSKEMİ ÇEŞİTLERİ

İskemi kelimesi; dokulara, kan akımının tamamen ortadan kalkması şeklinde tanımlanabilir. Fakat bu sınırlı tanımlama, birçok klinik serebral iskemi tipinin belirlenmesini, özellikle patofizyolojik sonuçların değerlendirilmesini zorlaştırır. Anatomik olarak, beyin kan akımındaki azalma; fokal (belirli bir damarın suladığı alana kan akımının olmaması) veya global olarak ikiye ayrılır (**Tablo 3**).

Tablo 3: Beyin iskemi çeşitleri

Jeografik

Global:	Kardiyak arrest, ciddi hipotansiyon, anoksemi.
Fokal:	Vasküler oklüzyon.
Watershed:	Major serebral arterler arasında makro düşük akım, arteriolar damarlar arasında mikro düşük akım.

Yoğunluk

Komplete	Asistol veya büyük arter oklüzyonu
Parsiyel	Arterial oklüzyonların çoğu

Nöropatolojik

	Otoliz, enfarkt, jeneralize nöronal nekroz, selektif nöronal nekroz, gecikmiş postaksonik hemisferik dismyelinizasyon
--	---

Fokal (veya multifokal) iskemi, beyni besleyen bir veya birden fazla damarın hasara uğraması sonucu ortaya çıkar. Fokal iskemi sonucu oluşan nörolojik defisit, damarın beslediği beyin bölgesinin özelliği ile ilgilidir. Fokal iskeminin sebebi; embolik veya trombotik gibi endojen vasküler oklüzyon veya eksojen vasküler bası olabilir (**5**).

Global iskemi; beynin tümüne veya büyük bir kısmına kan akımının ciddi bir şekilde azalması veya kesilmesi sonucu ortaya çıkar. Hasar, Arteria Carotis Interna veya Arteria Vertebralis'in anatomik dağılımı ile paralellik gösterebilir veya her iki Arteria Carotis Interna veya Arteria Vertebralis'in dağılımıyla uyumlu olabilir. Global serebral iskeminin esas sebebi, total serebral perfüzyonun, akut hipotansiyon veya asistol gibi klinik durumlarda azalmasıdır. Hemorajik veya septik şok gibi ciddi genel hipoperfüzyon, aorta diseksiyonu, kardiyak tamponad veya boyun damarlarının tıkanması, akut kan kaybı veya CO zehirlenmesine bağlı olarak ani ve ciddi anemi de global iskekiye neden olur (5).

Global ve fokal iskemi terimleri serebral iskeminin patogenezinin anlaşılmasında, kan akımındaki düşüşün miktarının belirlenmesine göre daha az önemlidirler. Komplet veya total beyin iskemisi sıklıkla kardiyak asistol ve daha nadiren büyük veya küçük tek damarın oklüzyonu sonucu olur. Parsiyel iskemi ise, fokal vasküler oklüzyon veya global hipoperfüzyon sonucu bir miktar kan akımının dokuları beslememesiyle ortaya çıkar. Fokal oklüzyon lezyon bölgelerindeki kan akımını tamamiyle durdursa da, deneysel ve klinik olarak, iskemik vasküler yatak merkezinde dahi, kollateral damarlar vasıtasıyla parsiyel perfüzyon mümkün olmaktadır. Tıkanmış damar bölgesi merkezindeki ciddi parsiyel iskemi sonucu oluşan patofizyolojik olaylar, total iskemi ile aynıdır ve merkezi iskemik bölgeyi, kendisini çevreleyen, çok az kan akımının olduğu bölgeden ayırır. Bu bölge iskemik penumbra olarak adlandırılır ve fokal iskemi tedavisinde tüm çabalar, bu bölgenin yaşatılmasına çalışılarak iskemik bölgenin en minimum şekilde tutulmasına yöneliktir (6).

3-GLUTAMAT NÖROTOKSİTESİNİN PATOFİZYOLOJİSİ

Hücrelerde birçok faktörler oksidan strese neden olsa da, beyinde bu prosesin esas nedeni, iyonotropik reseptörlerin aktivasyonuna neden olan nörotransmitter glutamattır. Glutamat ve diğer EAA lar, memelilerde merkezi sinir sistemindeki eksitatuvar sinaptik aktivitelerin hemen hemen birçoğundan sorumlu olup tüm sinapsların yaklaşık % 40'ından

salınmaktadır (7). Glutamatın depolarizasyon fonksiyonuna neden olan iyonotropik reseptörler, kendilerinin en potent antagonistlerine göre isimlendirilmişlerdir: NMDA, AMPA ve KA reseptörleri. Üçü içerisinde en iyi karakterize olanı NMDA reseptör kompleksidir. Bu kompleks, membrana yerleşik ve Na^+ , K^+ , ve Ca^{+2} a voltaja bağımlı olarak oldukça geçirgen bir kanaldan, ve glisin, Zn^{+2} , poliamin ve phencyclidin gibi tümü allosterik olarak glutamat bağımlı kanal açılmasını etkileyen bağlanma bölgelerinden oluşmaktadır (8). AMPA ve KA reseptörleride Na^+ a geçirgen kanallarla ilişkili olmaktadır. Bu reseptörlerden her ikisinde diğerinin algılama bölgesine karşı belirli bir afinite göstermekte ve antagonistler açısından farklılık göstermemektedirler. Bundan dolayı bu reseptörlere non-NMDA reseptörleri denmektedir. Son olarak 4. çeşit glutamat reseptörleri, metabolotropik reseptörler etkilerini G-proteinlerinin başlattıkları biyokimyasal olaylarla gösterirler. Metabolotropik reseptörler, glutamatın nörotoksik etkilerinin direkt mediatörü olmasalarda, bu reseptörlerin alt tiplerinin aktivasyonu nörotoksisiteyi daha da güçlendirebilir (9).

Glutamat reseptörlerinin alt ünitelerini kodlayan yaklaşık bir düzine gen izole edilmiştir. Non-NMDA reseptörü alt ünite genleri üç sınıftan oluşmaktadır (10):

- 1- **GluR1 - GluR4:** AMPA ya yüksek afinite, KA ya düşük afinite gösterirler.
- 2- **GluR5 - GluR7:** KA ya normal afinite gösterirler.
- 3- **KA1 - KA2:** KA ya yüksek afinite ile bağlanır fakat aktif homomerik kanal oluşturmazlar.

1950 li yıllarda, Lucas ve Newhouse; glutamat veya aspartatın sistemik verilmesi ile yeni doğmuş farelerde nöral retina dejenerasyonuna rastlamışlardır (11). Daha sonra Olney ve ark. periferik olarak verilen amino asitlerin, hipotalamus arcuate nucleus üzerinde olan nörotoksik etkilerini ve nöroeksitatuvar güçlerini belirlemişlerdir (12). Bu lezyonların karakteristik özelliği, yüksek glutamat konsantrasyonunun bulunduğu bölgelerdeki nöron hücre gövdelerine hasar vermesi, uzak nöronlardan

uzanan aksonlarda ve glia hücrelerinde hasar olmamasıdır. Olney, nöronlara selektif olarak depolarizan aktivitelerinden dolayı hasar veren bu EAA grubuna eksitotoksinler adını vermiştir. İntraserebral glutamat analoglarının enjeksiyonu ile yapılan çalışmalarda, her üç glutamat iyonotropik reseptör antagonistleri, hücre gövdesine özel fakat aksonları etkilemeyen lezyonlar oluşturmuştur (13).

Glutamatın eksitatuvar ve nörotoksik potansiyelinden dolayı, beyin ekstraselüler bölgesinde, BOS'taki konsantrasyonu 0.3 μ M iken, beyin parenkimasındaki konsantrasyonu 3 mM kadardır. Ekstraselüler glutamatın primer klirens mekanizması, glutamaterjik nöronal prosesler ve glialar üzerinde bulunan Na^+ bağımlı yüksek afiniteli transporter ailesidir. Anoksi veya hipogliseminin neden olduğu enerji eksikliği sonucu, ekstraselüler glutamat konsantrasyonu nörotoksik etkilerini gösterebileceği konsantrasyonlara ulaşır (7).

Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, nöronal hasara yol açan olaylar zincirinin başlaması için anahtar rolü oynasa da, her zaman gerekmez. Bu durum aşağıdaki gözlemlerle desteklenebilir: 1- Glutamat reseptör yoğunluğu, nöral sensitivite ile orantılı değildir (14,15), 2- Aksonlarda ve glialarda glutamat reseptörleri olmasına rağmen, bu yapılar direkt dejeneratif hasardan korunmuşlardır (16,17), 3- Özellikle glutamaterjik invazyonun olduğu beyin bölgelerinin dejenerasyonu, KA ve NMDA reseptör agonistlerinin nörotoksik fonksiyonlarını arttırmaktadır (18,19), 4- Reseptörlerin çok kısa aktivasyonundan saatler sonra bile nöronal dejenerasyon başlamaktadır (20).

Bu uyumsuzluklar, araştırmacıları glutamat reseptör bağımlı nöronal dejenerasyondan sorumlu post-reseptör mekanizmalara yöneltmiştir.

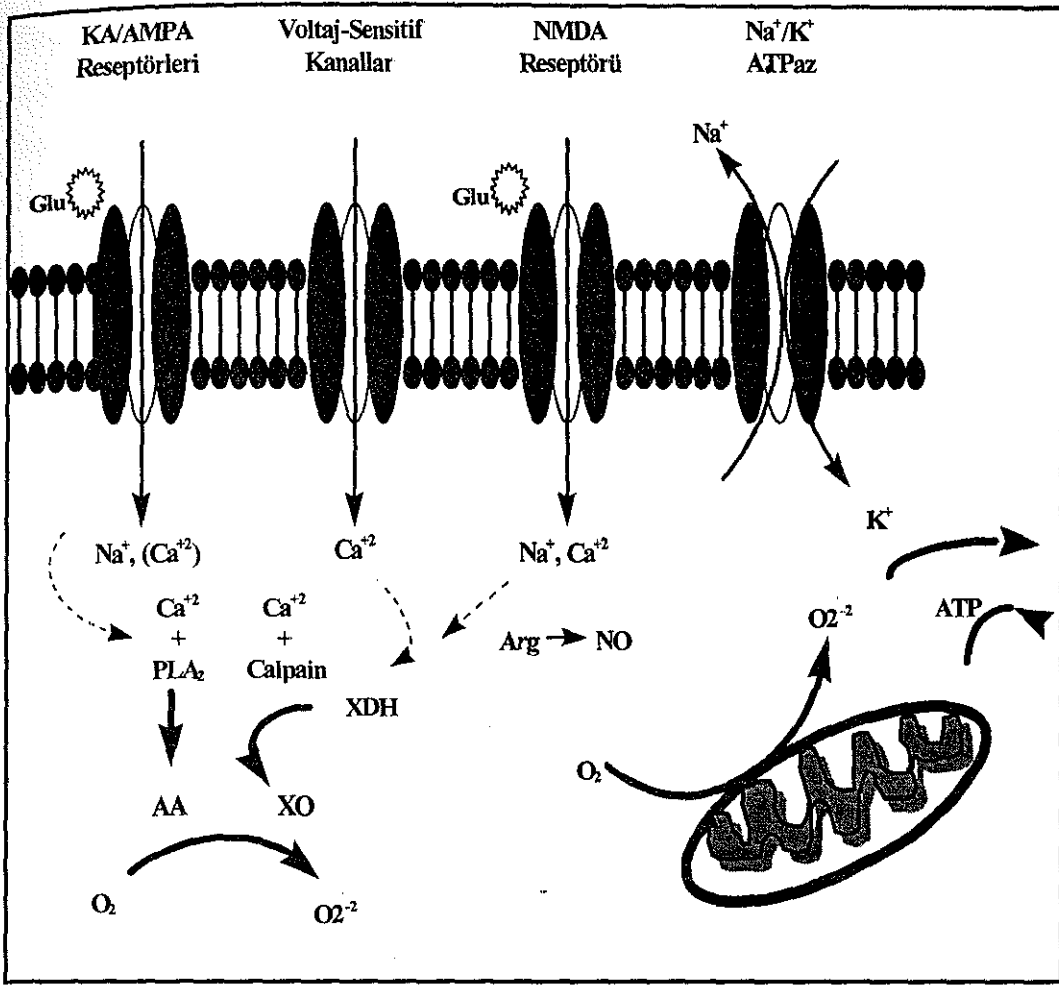
Doku kültürlerinde yapılan çalışmalar, glutamat-reseptör bağımlı nöronal dejenerasyonun, zamana ve iyonik bağımlılığa göre akut ve gecikmiş olarak iki formda olacağını göstermiştir. Nörotoksisitenin akut formu, nöronların ozmotik lizisine yol açan agonist varlığında, nöronal şişme ile karakterizedir ve glutamat-bağımlı katyon kanalları açık olduğu zaman,

masif H_2O influksına neden olan Na^+ ve Cl^- iyonlarının ortamdan uzaklaştırılması ile önlenabilir. Gecikmiş nöronal dejenerasyon ise, NMDA veya KA tarafından, yüksek konsantrasyondaki agoniste kısa maruz kalmaktan veya, düşük konsantrasyondaki agonistlere uzun süre maruz kalmaktan ortaya çıkar. Ne NMDA-bağımlı gecikmiş nöronal dejenerasyon ne de KA-bağımlı toksisite, akut toksisitenin blokajı, gecikmiş nöronal dejenerasyonun progresini etkileyemeyeceğinden dolayı, akut şişme gözükmez. Böylece in-vitro gecikmiş nörotoksisite, in-vivo glutamat-reseptör bağımlı nörodejenerasyona benzemekte ve nöronal eksitasyondan ayrılmaktadır (15,21).

Artmış intranöronal Ca^{+2} 'un, nöronal hasara neden olması için, uzun süre yüksek konsantrasyonlarda bulunması gerekir. Nöronun tipine bağlı olarak, intraselüler Ca^{+2} artışı, hem voltaj bağımlı Ca^{+2} kanalları hem de NMDA reseptör bağımlı Ca^{+2} influksı ile olur. Ca^{+2} 'un non-NMDA reseptör bağımlı nörotoksisitedeki rolü oldukça karışıktır. Moleküler düzeydeki son çalışmalar ile, KA/AMPA reseptör subünit transkriptlerinin post-transkripsiyonel düzenlenmesi, kanalların Ca^{+2} akımlarını iletmesine neden olmaktadır. Non-NMDA reseptör bağımlı Ca^{+2} influksı; striatum, serebellum ve hipokampusta gösterilmiştir. Bununla beraber, Ca^{+2} 'un, ortamın KA-bağımlı nörotoksisitesinde önlemediği bulunmuştur (22,23). Nöronal dejenerasyona yol açan Ca^{+2} bağımlı glutamat reseptör aktivasyonu, oksidan strese neden olan birçok ayrı mekanizmanın oluşmasına neden olur. NMDA reseptör bağımlı PLA_2 stimülasyonu, arakidonik asit salınımının artmasına ve O_2 radikallerinin oluşumuna neden olur. Arakidonik asit ve O_2 radikalleri, glutamat salınımını hızlandırır ve nöronal ve glial transport proseslerini inaktive ederek, geri alınımını inhibe ederler, böylece kısır bir döngü ortaya çıkar. Non-NMDA reseptör aktivasyonu ve arakidonik asit metabolizması arasındaki ilişki kesin değildir. Dumuis ve ark. striatal nöron kültürlerinde, non-NMDA reseptör agonistleri ile arakidonik asit salınımını göstermişlerdir (22), fakat Sun ve ark. KA ile beyin kesitlerinden arakidonik asit salınımını rapor etmişlerdir (24). Artmış intranöronal Ca^{+2} , Calpain I gibi, ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren peptidazları aktive eder. Ksantin oksidaz tarafından pürin bazlarının katabolizmasında süperoksit radikali oluşumuna

neden olur. NMDA ve KA reseptör agonistleri iki saat içerisinde ATP seviyelerinde düşüş ve AMP seviyelerinde artışa neden olduklarından, bu reaksiyon önem kazanmaktadır. Aynı zamanda laktik asit miktarında da önemli bir artış olduğundan, hücre Fe^{+2} depoları boşalmakta ve Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 den hidroksil radikali oluşmaktadır (11).

Dawson ve ark., Ca^{+2} bağımlı NMDA reseptör aktivasyonu sonucu, NOS tarafından bazı nöronlarda üretilen NO'nun, çevresindeki nöronlarda da dejenerasyona yol açtığını öne sürmüşlerdir (25). Doku kültürlerinde NOS inhibitörlerini, NO'ya bağlanan redükte hemoglobini, argininin kültür ortamından uzaklaştırılmasını, quiskualik asit ile NOS eksprese eden nöronların selektif olarak yok edilmesini deneyerek NMDA toksisitesine karşı korumayı göstermişlerdir. NO, mitokondrial oksidatif fosforilasyon ve ribonükleotid redüktaz gibi hücresel prosesleri engellese de, süperoksit radikali ile birleşerek peroksinitrit anyonunu oluşturur. Oluşan $ONOO^-$, asidik ortamda OH oluşturur. NOS eksprese eden nöronlar, hem NMDA bağımlı hem de NO bağımlı dejenerasyona dirençlidirler. Bunun sebebi de; NOS eksprese eden makrofajlarda da olduğu gibi, bu hücrelerin MnSOD gibi bazı protektif faktörleri içermeleridir. Bununla beraber diğer laboratuvarlar, NMDA veya glutamat bağımlı nörotoksitenin NOS inhibisyonu ile önlenebileceğini konfirme etmemişlerdir. Ayrıca KA toksisitesi ve NOS aktivitesi arasında, rat serebellar hücre kültürlerinde tam bir ayrılma gösterilmiştir. Ayrıca, NOS inhibitörleri ile sistemik tedavi sonrası, orta serebral arter ligasyonu sonrası oluşan beyin hasarında hem azalma hem de artma rapor edilmiştir (26,27).



Figür 1: Oksidan strese neden olan glutamat-reseptör bağımlı mekanizmalar. KA/AMPA reseptörlerinin glutamat tarafından aktivasyonu ile Na^+ ve bazı durumlarda Ca^{+2} influsu olmaktadır. Depolarizasyon sonucu olan NMDA reseptör aktivasyonu ile Na^+ ve Ca^{+2} influsu gerçekleşmektedir. Ayrıca depolarizasyon; voltaj sensitif kalsiyum kanallarından da Ca^{+2} influsuna neden olmaktadır. Artmış intranöronal Ca^{+2} , PLA_2 aktivasyonu ile arakidonik asit kaskadını, calpain aktivasyonu ile de XDH enziminin XO'a dönüşümüne ayrıca nNOS aktivasyonu sonucu NO oluşumuna neden olmaktadır. Bununla beraber depolarizasyon, Na^+/K^+ ATPaz tarafından ATP kullanımını arttırmakta, bu durumda oksidatif fosforilasyonun artarak O_2^- oluşumuna neden olmaktadır.

Bu farklı bulgular, selüler ortamın redoks durumundaki değişikliklerinden kaynaklanmaktadır. Daha öncede rapor edildiği gibi, süperoksit miktarındaki artış, peroksinitrit oluşumunu arttırabilir, azalış ise NMDA reseptör tiyol grubunun S-nitrozilasyonunu arttırarak, reseptör down-regülasyonunu ve nörotoksisiteden korunmayı sağlayabilir (28).

Glutamat iyonotropik reseptörlerinin oksidan strese yol açan birçok prosesi aktive etmeleri, oksidan stresin gerçekte nöronal dejenerasyonun ilk sebebi olmasını gerektirmez. Uç gerçeğin; oksidan stresin epifenomen veya sebep olma açısından kritik önemi vardır.

1- O_2 radikalleri irreversible hasar periyodunda üretilmektedirler, 2- Oksidan hasar gerçeği vardır ve 3- Serbest radikal scavengerları ve inhibitörleri nöronal dejenerasyonu önlemektedir. O_2 radikallerinin oluşumunda birçok farklı mekanizmanın varlığı ve deney sistemlerindeki farklı sonuçlara rağmen her üç kriter de hem NMDA hem de non-NMDA reseptör agonistleri açısından uyumlu gözükmektedir.

Serbest radikallerin non-NMDA reseptör bağımlı nörotoksisitedeki rolleri de önem kazanmaktadır. İn-vivo ve in-vitro çalışmalar sonucu, KA bağımlı nörotoksisite sonucu lipid peroksidasyon ürünlerinde birikme gösterilmiş, antioksidanlarla tedavi sonucu lipid peroksidasyonunda ve nörodejenerasyonda azalma gösterilmiştir. İdebenone, NMDA reseptör toksisitesini engellemeden, intraserebral KA veya quisqualik asit toksisitesini azaltmıştır.

Oksidan stresin neden olduğu glutamat bağımlı nörotoksisite formunun glutamat bağımlı iyon kanallarından ziyade, glutamatın bağlandığı sistin transporterlarından kaynaklandığı belirlenmiştir. Nöral-retina glioma hibridoma N18-RE-105 hücreleri kullanılarak, 8 saatlik artmış glutamata maruz kalmanın, bu nöron benzeri hücrelerde dejenerasyona yol açtığı Murphy ve ark. tarafından gösterilmiştir (29).

Sitoplazmik membran blebbing, nöritik proseslerde kırılmalar, çekirdek kondansasyonu hücre lizisinin habercisidir. Sitotoksisite için ortamda Ca^{+2} 'a ihtiyaç duyulsa da, glutamat bağımlı katyon kanallarının aktivasyonu ile uyumsuz olarak, glutamatın orta dereceli depolarizasyona (+5mV) neden olduğu hücre içi elektrik kayıtları ile gösterilmiştir. Glutamatın sitotoksik gücü, ortamdaki sistin konsantrasyonu ile ters orantılı bulunmuştur. Sistin eksikliğine bağlı olarak, hücrede progresif olarak glutatyon konsantrasyonu düşer. Bundan dolayı hücre içinde

oksidan madde birikimi söz konusudur. Bu oksidanlar, dichlorofluorescein'in okside fluoresan ürüne dönüşmesi ile gösterilmiştir. Ortama alfa-tokoferol veya idebenone gibi antioksidanların eklenmesi, geç periyotta bile, glutamat toksisitesine karşı korumuş, intraselüler oksidan birikimini önlemiş, fakat glutamat azalmasını geri döndürememiştir (30).

PLA₂'nin veya lipoksijenazlarla olan arakidonik asit metabolizmasının (siklooksijenazlarla olan metabolizma hariç) inhibisyonu, glutamat toksisitesine karşı koruma sağlamış ve ilk yolun önemli bir oksidan kaynağı olduğu gösterilmiştir. Kinonların 2-elektron redüksiyonunu sağlayan kinon reduktaz enziminin induksiyonu glutamatın yararlılığını azaltmış, enzim aktivitesinin inhibisyonu ise glutamat toksisitesini arttırmıştır (31).

Choi, Rothman ve Olney; EAA reseptörlerinin fazla miktarda aktivasyonunun, bir dizi intraselüler biyokimyasal olayı başlatarak nöronal hasara neden olacağını bildirmişlerdir. İmmatür beyindeki eksitotoksik nöronal hasar selektif EAA reseptör antagonistleri ile inhibe edilebilmektedir. Her bir EAA reseptör alt tipi, aşırı reseptör aktivasyonu durumunda, hem gelişen beyinde hem de yetişkin beyinde nöronal hasarla sonuçlanacak olaylar zincirini başlatmaktadır. NMDA, quisqualate ve KA gibi glutamat analoglarının in-vivo eksitotoksik etkilerine karşın, glutamat bağımlı in-vivo toksisite, sadece metabolik stres gibi durumlardaki presinaptik alım sisteminin aşırı yüklenmiş veya baskılanmış olduğu durumlarda gerçekleşir (11).

EAA nörotoksitesinin altında yatan mekanizmalar, in-vitro çalışmalara dayandırılarak 2 ana başlık altında incelenebilir. Birincisi; *nöronal membranların depolarizasyonudur*. Na⁺¹ influksını sekonder pasif Cl⁻¹ ve H₂O influksı takip eder. Bu durumda nöronlarda şişmeye neden olur. İkinci step ise; özellikle NMDA reseptör/kanal aktivasyonu sonucu *aşırı Ca⁺² influksı*, ikinci mesajcıl sistemin aktivasyonu, internal Ca⁺² depolarının mobilizasyonu, lipazların ve proteazların aktivasyonu, serbest yağ asitlerinin ve serbest radikallerin oluşumu, mitokondrial fonksiyon kaybı ve enerji depolarının kaybı ile karakterizedir. Bu hücrel değişiklikler, nöron

iskeletini ve membran yapılarını bozarak, nöron ölümüne neden olurlar. Metabolik stres veya hücrel enerji yetmezliğinde, yüksek afiniteli EAA alımı, bu prosesin yüksek enerjiye bağımlı olmasından dolayı bozulacaktır. Gerçekten, intraserebral NMDA enjeksiyonu akut veya geçici olarak sinaptozomal $^3\text{[H]}$ -glutamat alımını engellemiştir (11).

Sinaptik aralıkta EAA birikimi, EAA reseptör aktivasyonunun uzamasına neden olarak, devamlı bir membran depolarizasyonuna ve aşırı miktarda iyon fluksuna neden olacaktır. Hücreden Ca^{+2} 'un dışarı atılması ve nöronal membranlar arasında iyonik dengelerin sağlanması enerjiye bağımlı olduğundan, aşırı nöronal aktivasyonun, hücrenin enerji ihtiyacı ve mevcut enerji depoları arasındaki dengeyi bozması muhtemeldir. Enerji azalmasına neden olan fizyolojik faktörler, EAA bağımlı nörotoksisiteye katılabilirler (11).

Böylece eksitotoksisite; kritik olarak artmış intraselüler Ca^{+2} seviyelerine ve kontrol edilemeyen otolize neden olan aşırı ve devamlı sinaptik EAA reseptör aktivasyonu sonucudur. Neden oldukları bilinse de, pre- ve post-sinaptik nöronal mekanizmaların ve glial mekanizmaların eksitotoksisiteye ne derecede katıldıklarını belirlemek zordur (11).

Hem presinaptik hem de glial olaylar, EAA için yüksek afiniteli geri alım sistemleri bozuk ise, artmış sinaptik EAA konsantrasyonları, EAA reseptör aktivasyonunun devam etmesine neden olabilir. Ayrıca artmış presinaptik salınım, EAA'ların sinaptik konsantrasyonunu arttıracaktır. Bununla beraber, post-sinaptik hücredeki enerji metabolizmasındaki değişiklikler, normal EAA fonksiyonu ve eksitotoksisite arasındaki dengeyi belirleyecektir. Örneğin; intraselüler homeostatik olaylar, normal sinaptik aktivitede eksitotoksisite oluşmasını engellemektedir. Bununla beraber, bu mekanizmalar, enerji metabolizması bozulduğunda fonksiyonlarını kaybederler ve eksitotoksisite gelişebilir (11).

EAA reseptörlerinin, özellikle NMDA alt gruplarının aşırı aktivasyonu; hipoksi-iskemi, hipoglisemi, epileptik nöbetler, fiziksel beyin travması ve Huntington Hastalığı gibi kronik nörodejeneratif hastalıklar, Alzheimer

Hastalığı, Lathyrism ve amiotrofik lateral sklerosis gibi birçok nöronal hasarın patogenezinin sorumlu tutulmaktadır (11).

Birçok araştırmacı, selektif NMDA reseptör-kanal inhibitörlerinin fokal iskemiden önce veya sonra verilmesi ile beyin hasarının ciddiyetinin azaldığını deneysel olarak göstermişlerdir. NMDA reseptör antagonistleri, bunlar gibi akut ve kronik nörolojik hastalıkların yeni bir klinik tedavi modelini teşkil edebilirler.

4-SEREBRAL İSKEMİDE GLUTAMAT KAYNAĞI

Beyine kan akımının durması ile ATP seviyeleri azalmakta, bu da glutamatın eksitotoksik salınımının durmasına neden olmaktadır. Çünkü bu proses te ATP bağımlıdır. O halde iskemik beyin dokusunda glutamat effluksi nasıl olmaktadır?

Nöronlarda ve glialarda glutamatın normal ekstraselüler konsantrasyonlarını mikromolar seviyede tutan transport moleküller fonksiyonlarını yerine getirememektedirler. Ayrıca glutamatın nöronal ve glial membranlardan transportu; membran potansiyeline ve Na^+ ve K^+ iyonlarının membran üzerindeki dağılımına bağlıdır. ATP seviyesi düştüğünde; beynin total ATP'sinin % 40'ından fazlasını kullanan Na^+/K^+ ATPaz, Na^+ ve K^+ gradientini koruyamayacaktır. Böylece glutamat transportunu sağlayan kuvvet kaybolacak ve ekstraselüler glutamat konsantrasyonu, intra- ve ekstraselüler iyonlar ve amino asitler arasında yeni bir denge sağlanıncaya kadar artış gösterecektir. Sonuçta ekstraselüler glutamat konsantrasyonu sitotoksik seviyelere ulaşacaktır (32).

Nöronal somata ve dendritler, iskemide glutamati hızlı bir şekilde salmaktadırlar. İskemide glia ve nöronlar farklı davranmaktadırlar. Bunun sebebi de; nöronların Na^+/K^+ ATPaz ın fonksiyon kaybı sonucu membran potansiyelindeki düşüş ile aktive olan, voltaj bağımlı Na^+ kanalları içermesidir. Bu da anoksik depolarizasyon sonucu, glutamat transportunu sağlayan tüm kuvvetlerin ortadan kalkmasına neden olmaktadır. Glialar,

voltaj bağımlı Na^+ kanallarını daha az içerdiklerinden, depolarizasyonun oluşması daha uzun sürmektedir. Böylece nöronlardan glutamat kaybı olurken, glialar hala glutamat geri alımına devam etmektedirler (33).

Sinir terminalleri depolarizasyon ve iskemiye oldukça direnç göstermektedirler. Çok az miktarda glutamat, terminallerden iskemi sırasında salınmaktadır. Henüz kesin olarak gösterilmemiş olsa da, bu terminallerin glutamat transporterları açısından zengin olabilecekleri belirtilmektedir. Ayrıca voltaj bağımlı Na^+ kanallarının sinir terminallerindeki dağılımı da tam olarak bilinmemektedir (34).

MSS nin selektif olarak yatkınlığı, Parkinson Hastalığı, Huntington hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz gibi yaşa bağımlı hastalıkların karakteristik özelliğidir. Son 10 yıl içerisindeki çalışmalar sonucunda aşırı glutamat bağımlı katyon kanallarının uyarılması, deneysel modellerde, epilepsi, strok ve hipoglisemi durumlarında nöron hasarını başlatan olaylar olarak suçlanmaktadır (35).

5-İSKEMİK BEYİN HASARINDA HÜCRESEL VE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

Son yıllarda iskemik beyin hasarının mekanizmaları hakkında bilgiler artmaktadır. Üç major moleküler olay veya olaylar zinciri ilgi odağı olmuştur. Bunlar; **artmış intraselüler Ca^{+2} , aşırı asidoz ve aşırı serbest radikal oluşumu** sonucu ortaya çıkan olaylardır. Bu mekanizmalar ayrı ayrı belirtilse de, birbirlerinden izole bir şekilde çalışmazlar.

A)-KALSİYUM-BAĞIMLI HASAR

Memelilerde güçlü intraselüler prosesler intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu 10^{-6} - 10^{-8} mol/L ve ekstraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunu da 10^{-3} mol/L de tutmaktadırlar. Normal olarak Ca^{+2} hücreye ya voltaj bağımlı yada ligand bağımlı, örneğin NMDA kanallarından girecektir. İnterselüler serbest Ca^{+2} , sitozolden transmembran Na^+ gradientine bağımlı Na^+ - Ca^{+2} antiporter sistemi ile uzaklaştırılır. Ayrıca ATP bağımlı Ca^{+2} pompası da serbest Ca^{+2} 'un uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır.

Intraselüler Ca^{+2} ya proteinlere bağlanır yada endoplazmik retikulum yada mitokondri tarafından alınır. Intraselüler Ca^{+2} 'un % 60'ı mitokondri tarafından alınmaktadır. Endoplazmik retikulum ve mitokondri tarafından bu proses enerji bağımlı olup, mitokondride bu proses, iç mitokondri membranındaki proton elektrokimyasal gradienti ile sağlanmaktadır. İskemi sırasında sitozolik Ca^{+2} 'un 1000 kat arttığı ve Ca^{+2} bağımlı proseslerin anormal artışı gözlenmiştir. Hücre yıkımına neden olan en önemli Ca^{+2} bağımlı mekanizma, fosfolipazların aktivasyonudur (36).

Intraselüler Ca^{+2} da aşırı artış, lipazların, proteazların, endonukleazların aşırı aktivasyonuna ve protein kinazların aşırı aktivasyonuna bağlı olarak ta, reseptörlerin, membran kanallarının ve translokazların fosforilasyonu ile fonksiyon kaybına neden olan, non-fizyolojik bir uyarıdır. Akut hücre hasarına yol açan en önemli olay, sitoskeleton komponentlerini hasara uğratan ve plazma membranı ve sitoskeleton bütünlüğünü bozan proteazların aktivasyonudur. Henüz kan-beyin bariyerini geçen ve strok tedavisinde kullanılan herhangi bir proteaz inhibitörü mevcut değildir. Diğer önemli olaylardan birisi de, fosfolipazlar tarafından başlatılan reaksiyonlar zinciridir. Enerji yetersizliği, kalsiyum influksi/salınımı ve reseptör aktivasyonu, fosfolipidlerin PLA_2 tarafından hidrolizine neden olur. Reaksiyon sonucunda lizofosfolipidler ve arakidonik asit gibi serbest yağ asitleri ortaya çıkar. PLC nin PIP_2 ile reaksiyonu sonucu arakidonik asidin diğer bir kaynağı olan DAG ve IP_3 oluşur. Lizofosfolipidler ve serbest yağ asitleri, özellikle poliansature yağ asitleri, membran deterjanları veya iyonofor gibi davranarak olumsuz etki göstermektedirler. Ayrıca arakidonik asit ise, serbest radikallerin bir kaynağı olarak gösterilmektedir. Arakidonik asitin vazomotor problemlere neden olması ve kan-beyin bariyerinden moleküllerin sızmasına neden olması doğrulanmış olsa da, serbest radikal oluşumundaki rolü hala tartışmalıdır. Günümüzde, arakidonik asite mal edilen bu rollerin, siklo-oksijenaz ve lipoksijenaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan, ikincil mesajcı olarak kabul edilen ve sinaptik aktiviteyi lokal veya transsinaptik etkilerle modüle eden, oksijene ürünler tarafından gerçekleştirildiği kesinlik kazanmaya başlamıştır. Örneğin; postsinaptik olarak PLA_2 aktivitesi sonucu oluşan arakidonik asit, presinaptik membran olaylarını modifiye edecek metabolitleri oluşturmaktadır. 4 lipolitik olay tarif

edilebilir. Bunlar; siklo-oksijenaz ve lipoksijenaz yollarının aşırı aktivasyonu, platelet aktive edici faktörün (PAF) üretimi ve protein kinazların aktivasyonudur.

PLC'nin PIP_2 ile reaksiyonu sonucu IP_3 ve DAG oluşmakta ve PLA_2 de etanolamin fosfogliseridleri, plazmalojenler ve kolin fosfogliseridleri üzerine etki ederek, lizofosfolipidler ve arakidonik asidi oluşturmaktadır. DAG'ın di- ve monoasit gliserid lipazlar tarafından yıkılması ile arakidonik asit oluşmaktadır. PAF oluşumuna neden olan ayrı bir PLA_2 - bağımlı yol son yıllarda önem kazanmıştır. PLA_2 , hücre membranlarındaki fosfatidilkolin fraksiyonunun küçük bir komponenti olan alkil-2-asit-sn-gliserofosfokolin'e etki ettiğinde lizo-PAF ve arakidonik asit oluşur. Lizo-PAF biyolojik olarak inaktif olsa da, asetiltransferaz ile kataliz sonucu, proenflamatuar olan, platelet aktivasyonunu ve lökosit aktivasyonu ve endotel hücrelere adhezyonuna neden olan PAF oluşur.

Beyin dokusunda da PAF için bağlanma bölgesi mevcuttur. PAF antagonistleri serbest yağ asidi birikimini epileptik nöbetlerde ve iskemide azalttığından, PLA_2 'nin reseptörlerle birleşmesini uyarabilir ve arakidonik asit kaskadında amplifikasyon faktörü olarak rol oynar.

Beyin dokusu siklo-oksijenaz ve lipoksijenaz enzim komplekslerine sahip olduğundan, arakidonik asit'eikosanoidlere metabolize olur. Normal fizyolojik şartlarda substrat miktarı az olduğundan, eikosanoidlerin üretimi sınırlıdır. Ancak iskemi sırasında arakidonik asit birikimi, prostaglandinlerin, tromboksanların, lökotrienlerin ve prostasiklinin üretimini arttıracaktır. Arakidonik asitin siklo-oksijenaz ve lipoksijenaz ile oksidasyonu için oksijene ihtiyaç olduğundan, bu üretim reperfüzyon fenomeni olarak kabul edilir. Bununla beraber, bu mekanizmada yer alan bazı enzimler düşük Michaelis sabitine sahip olduklarından, arakidonik asit metabolitleri kısmı iskemik dokularda da birikmektedir.

Tüm 5-lipoksijenaz ürünleri biyolojik olarak aktiftirler ve birçok metabolit, 11-, 12- ve 15-lipoksijenaz aktivitesi sonucu oluşmuştur. 5-lipoksijenaz yolunun en önemli ürünü 5-hidroperoksi-eikosatetraenoik asit (5-HPETE),

5-hidroksi-eikosatetraenoik asit (5-HETE)'dir. 5-HETE'nin polimorfonükleer lökositler (PMNL) üzerine güçlü kemoatraktan etkisi vardır. Lökotrien B₄ ün güçlü bir kemoatraktan etkisi olsa da, lökotrien C₄, D₄, E₄; «slow reacting substances of anaphylaxis » olarak adlandırılır ve vazokonstriksiyon sonucu vasküler permeabiliteyi artırırlar. Böylece lökotrienlerin kan-beyin bariyerini hasara uğratarak ödem oluşumuna neden oldukları bildirilmektedir.

Serebrovasküler alanda, siklo-oksijenaz ürünlerinden Tromboksan A₂ (TxA₂) ve prostasiklinin (PGI₂) etkileri üzerinde durulmaktadır. TxA₂, vazokonstriktör olup agregasyona neden olurken, PGI₂, vazodilatasyona ve anti-agregasyona neden olmaktadır. Ayrıca PGD₂, PGE₂ ve PGF_{2α}'nin membran ve sinaptik fonksiyonların önemli mediatörleri olduğu belirtilmektedir. TxA₂ ve PGI₂ arasında bir dengesizlik oluştuğunda, enerji yetersizliğinin olduğu dokuda mikrosirkülasyon bozulacaktır. Böyle bir dengesizlik arakidonik asit kaskadı sırasında ortaya çıkmaktadır. Tromboksan sentaz ve prostasiklin sentaz enzimleri uyarılmış olsalar da, prostasiklin sentaz serbest radikaller tarafından inaktive edilmektedir. Diğer bir deyişle iskemi, tromboksan aktivasyonu ile vazokonstriksiyon ve platelet agregasyonuna neden olmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar, TxA₂ antagonistleri ve PGI₂'nin beraber verilmesinin iskemik dokuda kan akımını olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Gerbillerde yapılan bir çalışmada, siklo-oksijenaz blokerleri ile iskemi öncesi tedavi, CA1 bölgesindeki gecikmiş nöronal hasarı engellemiştir. Aynı bulgular AMPA reseptör blokerleri ile de elde edilmiştir. Böylece siklo-oksijenaz metabolitleri, sinaptik fonksiyonun up-regulasyonunu regule eden mesajcılar olarak görev yapmaktadırlar.

PLC aktivasyonu, IP₃ ve DAG birikimine neden olmaktadır. IP₃ oluşumu ve intraselüler Ca⁺² artışı, PKC'nin aktivasyonuna ve translokasyonuna neden olmaktadır. Böyle bir aktivasyon, reseptörlerin veya iyon kanallarının fosforilasyonu ile, membran fonksiyonunda kalıcı değişikliklere yol açmaktadır. Glutamat veya NMDA aplikasyonu ile CA1 nöronlarının dendritlerinde intraselüler Ca⁺²'da artış gözlenmiştir. PKC inhibitörü sfingozin ile kalıcı intraselüler Ca⁺² artışı engellenmiş ve

muhtemel mekanizma, kalsiyum kanallarının fosforilasyon ile up-regulasyon olduğu yolundadır. Benzer mekanizmalar, geçici iskemi sonrası görülen gecikmiş nöron ölümünden de sorumlu tutulmaktadır. Diğer bir PKC antagonisti olan staurosporin, gerbillerde iskemik hasarı engellemiştir. Bununla beraber, iskemi sonrası PKC translokasyona uğrasa da, aktivasyonunu kaybetmektedir. Belkide sinaptik fonksiyonun transient iskemi sonrasındaki up-regulasyonu protein kinazların deaktivasyonu sonucu olmaktadır. Diğer bir gerçek te; protein metabolizmasını değiştiren genetik ekspresyondaki değişikliklerdir. Kalsiyum, *c-fos* ve *c-jun* gibi proto-onkogenlerin ekspresyonuna neden olmaktadır. Bu genlerin mRNA'ları geçici iskemi sonrası artmaktadır. Son çalışmalar, iskemi ve hipogliseminin bir çok büyüme faktörü mRNA'sını indüklediğini göstermiştir.

B)-ASİDOZA-BAĞIMLI HASAR

İskemi sırasında intraselüler ve ekstraselüler pH'taki düşüş, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki dengesizlik sonucudur. Aerobik şartlarda, 1 mol glukoz, 2 mol piruvata dönüşürken 2 mol ATP elde edilir. Piruvat, piruvat dehidrogenaz enzimi aracılığıyla metabolize olduktan sonra, mitokondride CO_2 ve H_2O 'ya indirgenir, 36 mol ATP elde edilir. Hipoksi/iskemi, bu metabolik olayları piruvat oksidasyonu aşamasında bloke ederek piruvatın laktata dönüşmesine neden olur. Bu reaksiyonu laktat dehidrogenaz enziminin, piruvat reduktaz kısmı katalizler. Anaerobik şartlarda ATP üretimi düşecek ve hücre asidifiye olacaktır. Ayrıca, O_2 yetersizliğinden dolayı mitokondri de Ca^{+2} sekestrasyon yeteneğini kaybedecek, intraselüler Ca^{+2} 'da artış olacaktır. Asidoz ve intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu arasındaki dengesizlik iki şekilde açıklanabilir. Birincisi; artmış intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu, mitokondriyi Ca^{+2} 'u alması için uyaracak ve mitokondrinin ATP üretim yeteneğini azaltarak asidozu hızlandıracaktır. İkincisi; çok düşük oksijen veya ATP konsantrasyonlarında, mitokondri kalsiyumu alamayacak ve intraselüler Ca^{+2} 'da artış meydana gelecektir. Ayrıca serbest H^+ , Ca^{+2} 'u bağlama bölgelerinden serbest hale geçirecektir.

Tam veya tama yakın iskemide, laktat birikimi, dokunun pre-iskemik glukoz veya glikojen miktarına bağlıdır. Böylece asidozun ciddiyeti, pre-iskemik plazma glukoz konsantrasyonu ile ilişkilidir. Global veya ön beyin iskemilerinde intraselüler pH, 6.2-6.4 arasındadır ve hiperglisemi ile daha da düşmektedir. Pre-iskemik hipergliseminin geçici global veya ön beyin iskemisine bağlı hasarı, laktik asit üretimini arttırarak kötüleştirdiği kesindir. Bu tip beyin hasarının en önemli göstergeleri; ödem, post-iskemik nöbetler ve hızla gelişen beyin lezyonlarıdır. Pre-iskemik hiperglisemi selektif nöron nekrozunu pan-nekroza çevirdiğinden, glial hücrelere ve/veya vasküler endotele zarar vererek enfarkta neden olan predispozan bir faktördür. Hiperglisemiklerde, kısa iskemi periodlarını takiben, saatler sonra gecikmiş büyük parenkimal lezyonlar ortaya çıkmıştır. Hiperglisemiklerde, enfarkt ve non-enfarkt dokular arasındaki sınır keskin bulunmuştur ve enfarkt bölgesinde, proliferan kapillerler olmaksızın total nekroz bulunmuştur. Bu da, asidozun mikrosirkülasyonu hasara uğratarak pan-nekroza neden olduğu şeklindedir. Hipoglisemiklerde ise, neokorteksin 2. katmanına lokalize enfarkt ve non-enfarkt bölgeler arasında keskin bir sınır olmayan, proliferan kapillerler içeren, perifokal selektif nöronal nekroz halkası içeren lezyonlar bulunmaktadır. Hipogliseminin, depresyon-benzeri depolarizasyon dalgalarının yayılmasına ve eksitotoksik hücre hasarına yol açan EAA salınımına neden olduğu bildirilmektedir.

Uzun yıllardır düşük ekstraselüler pH'in kalsiyumun voltaj bağımlı kalsiyum kanallarınca ve kasta 3 Na⁺/ Ca⁺² değişimi ile fluksunun gecikmesine neden olduğu bilinmekteydi. Son yıllarda ekstraselüler düşük pH'in NMDA reseptör bağımlı Ca⁺² influksını azalttığı yada bloke ettiği söylenmektedir. Bu durumun faydalı olduğunu söylemek imkansızdır.

Asidozun hangi mekanizmalar ile yoğun doku hasarına neden olduğu şöyle özetlenebilir:

a)- ödem oluşumu, b)- mitokondrial solunum sistemi inhibisyonu, c)- laktat oksidasyonunun inhibisyonu, d)- atılımının inhibisyonu.

Asidoza bağımlı ödem oluşum mekanizması, Na^+/H^+ ve $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter sistemlerinin glia gibi hücrelerde simultane şekilde bulunmasına dayanmaktadır. Bu gibi antiporter çiftleri diğer hücrelerde de bulunmakta ve hücre volümünün regülasyonunda görev almaktadırlar. Bununla beraber, asidoz Na^+/H^+ antiporter sistemini aktive ederek H^+ 'nin $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ sistemi ile tekrar geri alınımına neden olursa, Na^+ ve Cl^- birikimine neden olan bir kısır döngü meydana gelecek ve ozmotik olarak su çekecektir. Diüretikler antiporter sistemlerini bloke ederek ödem tedavisinde kullanılmaktadırlar.

Düşük pH, mitokondride ADP uyarımlı oksijen kullanımını geciktirmekte veya bloke etmektedir. Böylece pH 6 civarına düştükçe çok az miktarda ATP üretilmektedir. Mitokondrinin fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için pH'nın artırılması gerekmektedir. Bu da, biriken laktatın oksidasyonu ve Na^+/H^+ değişiminin hızlandırılması ile mümkündür. Maalesef her iki olayda, düşük pH nedeniyle inhibe haldedir. En azından bazı dokularda, LDH'nin laktata olan afinitesi, enzim molekülündeki titre olmuş esansiyel imidazol grubunun olmasından dolayı asidik pH'ta düşüktür. Böylece intraselüler pH arttığı zaman önce laktat oksidasyonu hızlanacaktır. Bu da, Na^+/H^+ değişimi ile olacaktır. Bununla beraber, düşük pH değerlerinde antiporter sistem çok yavaş çalışacağından, ekstraselüler pH artıncaya kadar H^+ atılımı yavaş olacaktır. Kan dolaşımı yeniden sağlansa dahi, ciddi asidotik doku risk altında olacaktır.

C)-OKSİDATİF STRES

Beyin vücut oksijeninin aşırı derecede büyük bir kısmını kullanmaktadır. Enerjisini, özellikle mitokondriyal solunum zincirinin oksidatif metabolizmasından sağlamaktadır. Mitokondriler özellikle nöron hücre gövdeleri olmak üzere dendrit, akson ve sinaptik bouton gibi ATPaz'ın nöronal membranlar arasındaki iyon dengelerini koruduğu nöritik proseslerde de bulunmaktadır. Nöronal oksidatif fosforilasyon, nöronal ateşlemede farklılıklar göstermektedir. Yüksek enerjili elektronların, mitokondrial elektron zincirinde oluşturdukları sızıntı, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Mitokondrial

solunum zincirinin elemanlarını kodlayan genler, hem nükleer DNA (NuDNA) hem de mitokondrial DNA (MtDNA) üzerinde lokalizedir. MtDNA, NuDNA ya göre 10 kat daha fazla mutasyona uğrayabilmekte ve tamir mekanizmalarında etkisi daha az olmaktadır. Hücresel oksidanların büyük bir kısmına yatkınlığından dolayı , MtDNA, yaşa bağlı olarak yaklaşık 15 kat daha fazla okside nükleotid içermektedir. Son bulgular, hereditör MtDNA mutasyon ve delesyonlarının, nörodejenerasyon ve strok gibi patolojilerle ilişkili olduğunu ve yaşa bağlı olarak kazanılan mutasyonların elektron transport zincirinin etkinliğini bozacağını ve oksidan stresi arttıracığını belirtmektedir (37).

Beyinde eksprese edilen monoamin oksidaz (MAO), tirozin hidroksilaz ve L-amino oksidaz gibi enzimler, normal aktiviteleri sonucu H_2O_2 üretebilirler. Ayrıca askorbik asit, katekolaminler gibi bazı nöronlarda konsantre olan endojen maddelerinde oto-oksidasyonu H_2O_2 oluşmasına neden olabilir. Bazı nöronal enzim aktiviteleri de oksidan oluşumuna neden olmaktadır. Örneğin Ca^{+2} a bağımlı Fosfolipaz A_2 aktivasyonu, arakidonik asit seviyesini arttırarak, lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimatik yolları aracılığıyla süperoksit oluşumuna neden olurlar. Membranlardan diffüze olabilen, ikinci mesajcı NO ise, Ca^{+2} tarafından aktive edilen NOS tarafından sentezlenmekte ve aktivitesi nörotransmitter reseptörleri tarafından regüle edilmektedir. NO, süperoksit ile hızlıca reaksiyona girmekte ve peroksinitrit anyonu oluşmakta, asidik ortamda peroksinitrit ise, hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Enerji azlığı ve artmış intraselüler Ca^{+2} varlığında, Ca^{+2} 'a bağımlı proteaz aktive olarak, ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşmektedir. Birikmiş hipoksantininde ksantine, ksantin oksidaz tarafından dönüştürülmesi ile de, ürik asit, süperoksit radikali ve H_2O_2 oluşmaktadır. Hidroksil radikali, en fazla reaktif olan radikaldır ve bilinen hiçbir enzimatik reaksiyon tarafından direkt olarak oluşturulmamaktadır. Hidroksil radikali, H_2O_2 'nin yavaş dekompozisyonu sonucu oluşabilir. Fakat bu proses, Fenton reaksiyonunda olduğu gibi Fe^{+2} tarafından hızlandırılabilir. Yukarıda belirtilen hücresel oksidanlara karşı, beyinde oksidan düzeyini düşürmek için bazı defans mekanizmaları bulunmaktadır.

Oksijen radikalleri proteinlere, deoksinükleik asitlere ve lipid membranlarına saldırarak hücre fonksiyonlarını ve bütünlüğünü bozarlar. Beyin fazla miktarda PUFA içerdiğinden, serbest radikal ataklarına daha duyarlıdır. Membran lipidlerindeki çift bağlarda bulunan H^+ atomları özellikle hidroksil radikalleri tarafından kolayca tanınmaktadır. PUFA içinde oluşan karbon radikalide, moleküler yapısında değişiklik göstererek daha stabil bir bileşik olan ve hücre membranları içindeki yağ asitleri ile çapraz bağ yapan konjüge dienleri oluşturmaktadır. Aerobik durumlarda, konjüge dienler O_2 ile birleşerek organik peroksi radikalleri oluşur ve lipid peroksidasyonu devam eder. Peroksi radikalleri de, komşu yağ asit zincirlerinden hidrojen iyonu çalarak lipid peroksidasyonunu devam ettirirler. Ayrıca; peroksi radikalleri, bu H atomu ile birleşerek lipid hidroperoksitlerini oluştururlar. Fe^{+2} varlığında, lipid hidroperoksitleri alkoksi radikallerini ve aldehitleri oluştururlar.

C-1)-NO

Serbest radikal bir gaz olan NO'nun nörotransmitter oluşu, kan basıncı regülasyonunda ve enfeksiyona cevapta rol oynaması gibi bir çok fizyolojik işlevinin bulunması, bu molekülün keşfinden bugüne kadar bir çok araştırmanın odağı olmasına neden olmuştur. Bu çalışmalar NO'nun biyolojik fonksiyonlarının anlaşılmasının yanı sıra; üretiminin yada fonksiyonunun önlenmesinin de bazı klinik durumlarda yararlı olabileceğini göstermiştir.

NO yarı ömrü çok kısa olan (3-5 sn) fakat çok fazla biyolojik fonksiyonları olan bir moleküldür. Kısaca NO, özellikle MSS'de ve kardiyovasküler sistemde, hücre membranlarından kolayca diffüze olabilen ve hedef hücreleri aktive edebilen yeni bir sinyal-ileti molekülüdür. Bunlara ek olarak, oldukça reaktif bir serbest radikal olarak NO, Parkinson hastalığı, AIDS, strok ve demans gibi hastalıklarda nöronal dejenerasyondan sorumlu tutulan, sitotoksik bir moleküldür (38).

NO, MSS ve PSS nöronları, endotel hücreleri, plateletler, nötrofiller ve makrofajlar tarafından üretilmektedir. Nöronlarda, endotel hücrelerinde ve

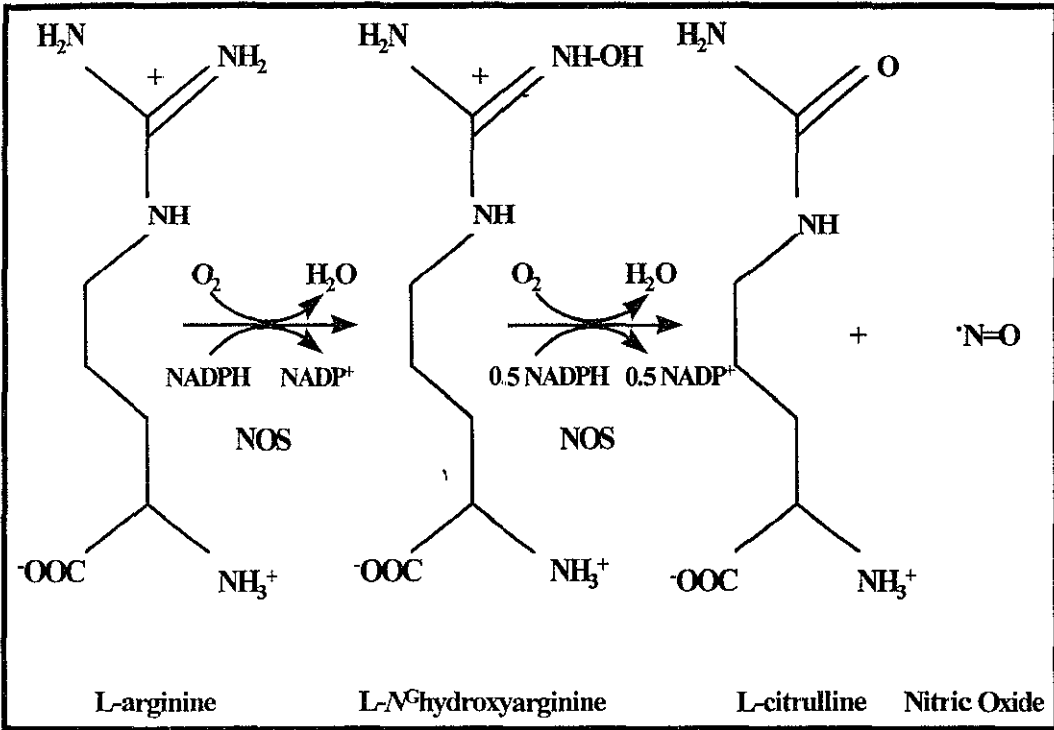
plateletlerde NO sentezi, reseptör-aracılı yada iyon kanalı-bağımlı Ca^{+2} influksının sonucunda Ca-Calmoduline bağımlı NOS enzimi tarafından olmaktadır. MSS nöronlarında Ca^{+2} influksi, EAA glutamatin NMDA reseptörlerini uyarması sonucu olmaktadır. Endotel hücrelerinde ise; endojen olarak aktif bazı biyolojik moleküllerin (asetil kolin, noradrenalin, bradikinin) spesifik hücre reseptörlerine bağlanması sonucu olmaktadır. Bunlardan farklı olarak, immün sistem hücrelerinde NO sentezi kalsiyumdan bağımsız olmaktadır. Lipopolisakkaritler (LPS), tumor nekrosis faktör (TNF), interleokin 1 (IL-1) ve interferon- γ gibi sitokinler, NO sentezini indükleyebilmektedirler (39).

Bir çok durumda NO; multiple biyolojik etkilerini, hedef hücredeki solubl guanilat siklaz enzimini aktive ederek ve intraselüler cGMP akümülyasyonuna neden olarak göstermektedir(40). Bu mesajcı molekül ise daha sonra intraselüler enzim kaskadını aktive ederek biyolojik etkilerini göstermektedir. Buna ek olarak, NO, güçlü bir reaktif serbest radikal olup, süperoksit radikali ile birleşip, daha sitotoksik bir radikal olan peroksinitrit ve hidroksil radikalini oluşturmaktadır. Böyle güçlü oksidan moleküllerin oluşumu da, NO'nun sitotoksik ve nörodejeneratif etkilerine neden olmaktadır (41).

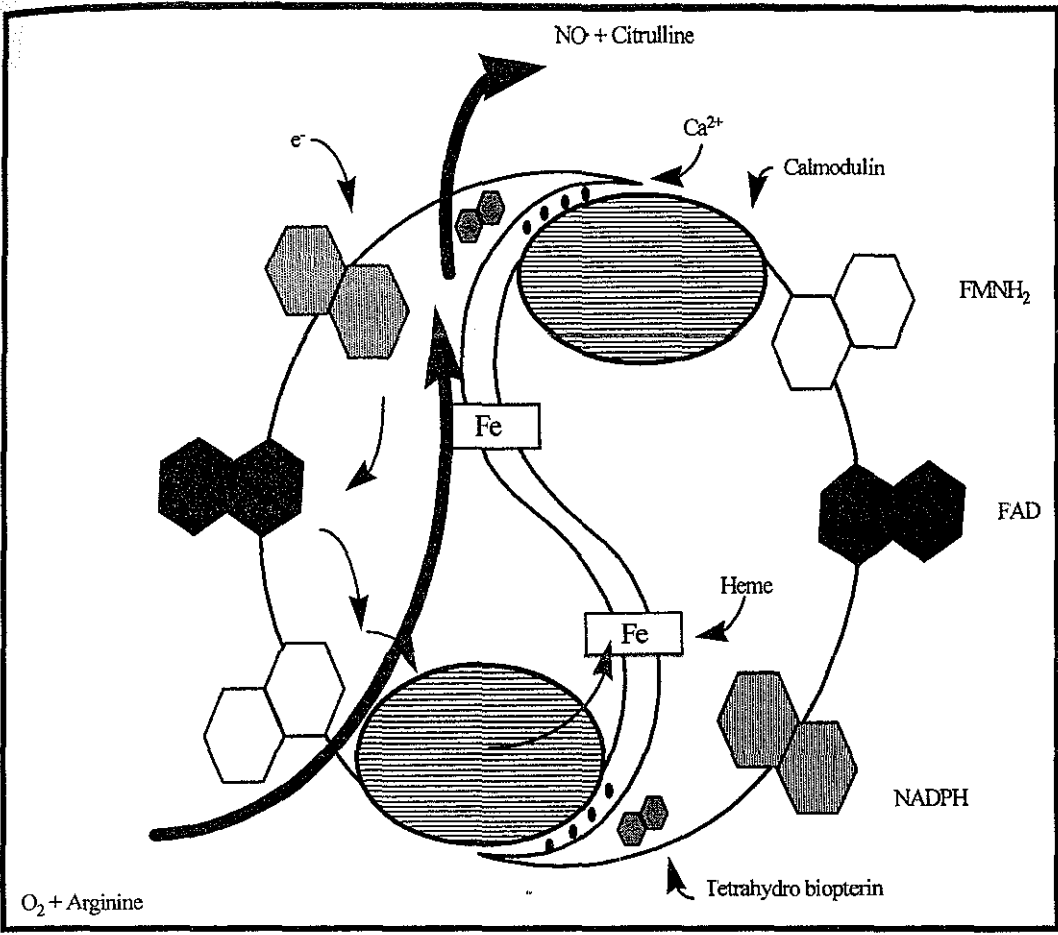
NO, L-argininin 5-elektron oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu reaksiyondan sorumlu olan enzim NOS (E.C. 1.14.13.39), protoporfirin IX-hem içeren bir enzim olup molekül ağırlığı 130-160 kDa'dur. Homodimer olarak bulunur ve FAD, FMN, BH_4 , NADPH ve calmoduline ko-faktör olarak ihtiyaç duyar. Reaksiyon tam olarak açıklanamamış olsa da, 2 basamaklı bir mekanizma öne sürülmüştür. Birinci basamakta; L-Arg, L-NG hidroksi arginine (L-HOARG) dönüşür. Bu reaksiyon için bir molekül O_2 , NADPH ve BH_4 'e ihtiyaç vardır. İkinci basamak ise; L-HOARG' in NO ve sitrülline oksidasyonudur. Her iki basamakta da NOS enzimi görev alsa da, sitokrom P450 redüktazın da ikinci basamağı katalizlediği ispat edilmiştir. Gerçekte, sitokrom P450 redüktaz, NOS ile yapısal benzerlik göstermektedir. İlginç olarak, rat beyninden pürifiye edilen NOS, L-Arg eksikliğinde, $\text{O}_2^\bullet$ ve H_2O_2 üretmiştir. Fakat bu reaktif oksijen türlerinin NOS içeren hücrelerde in-vivo oluşup oluşmadığı bilinmemektedir (42).

Üç ayrı NOS izoformunun varlığı, farklı doku kaynaklarından elde edilen, enzimi kodlayan cDNA'ların izolasyonu ve sekans analizi yapılarak gösterilmiştir: Nöronal veya nNOS, endotelial veya eNOS, indüklenabilir veya iNOS. iNOS ekspresyonu, LPS ve sitokinlere bağımlı olup, kalsiyumdan bağımsız iken, nNOS ve eNOS ekspresyonu konstitütif olup, kalsiyuma bağımlıdır. Genel olarak iNOS enzimi mikromolar düzeyde NO üretirken, nNOS ve eNOS pikomolar düzeyde NO üretmektedir.

PSS'de de aktivite gösterse, nNOS'un esas yerleşim yeri serebellumdur. eNOS ise esas olarak büyük damarların endotel tabakasında membranda bulunur. Plateletlerde bulunan NOS aktivitesinin de eNOS olduğu söylenmektedir. iNOS ise nötrofillerde, kanser hücrelerinde, hepatositlerde ve endotel hücrelerinde sitokin veya LPS indüksiyonu sonrası artmaktadır.

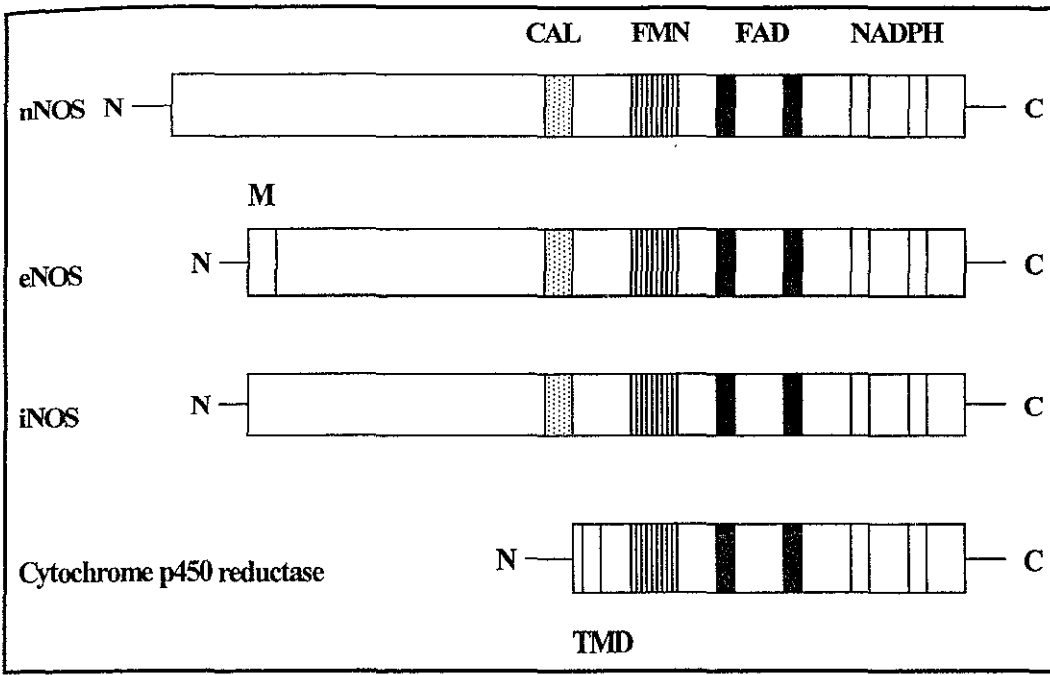


Figür 2:L-argininden L-sitrüllin ve nitrik oksit oluşumu



Figür 3: Nitrik oksid sentaz enziminin kofaktörleriyle beraber homodimer olarak gösterilmesi.

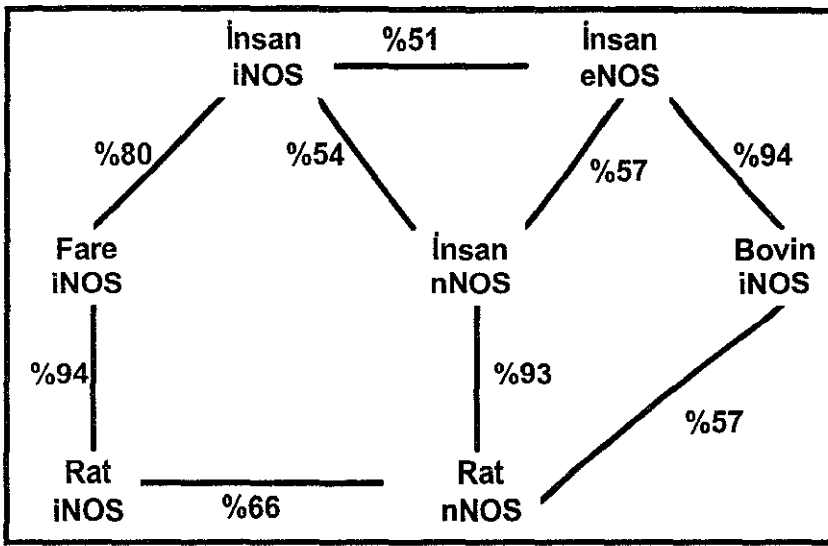
Her üç izoformun da amino asit sekansları ortaya konmuş, NADPH, FAD, FMN ve calmodulinin enzime bağlanma bölgesinin, enzimin karboksi (C) terminalinde yer aldığı belirlenmiştir. Her üç izoformunda bu bölgeleri, sitokrom P450 redüktaz ile benzerlik göstermektedir. NOS izoenzimlerinin amino terminali (N), cAMP bağımlı kinaz için fosforilasyon bölgelerini içermektedir. Ancak fosforilasyonun enzim aktivitesi üzerine fizyolojik önemi henüz açıklık kazanmamıştır. Yine molekülün bu bölgesi, putatif Arg veya BH_4 bağlanma bölgelerini içeren, bir bölge daha içermektedir. eNOS'un N terminali, diğer izoformlardan farklı olarak açıltransferazlar tarafından gerçekleştirilen myristoylation hedef sekansı içermekte ve karakteristik özelliğide, membran ile ilişkili olmasından dolayıdır (43) (Figür 4).



Figür 4:NOS izoenzimleri ve sitokrom p450 redüktaz enzimlerinin cDNA yapıları. M: myristoylation, TMD: trans membrane domain, CAL: kalmodulin,

NOS izoformları arasındaki amino asit sekansı benzerliği insanda %51-57 arasında değişmektedir. Fakat insan ve rat nNOS enzimleri, %93 amino asit benzerliği göstermektedir **(44)** (Figür 5).

NOS aktivitesinin inhibisyonuna ilgi hergeçen gün artmakta ve bir çok NOS inhibitörü bulunmaktadır. En fazla kullanılan ajanlar, hiç şüphesiz ki L-argininin guanidino mono- veya di-analogları olup, L-NG mono-metil arginin (L-NMMA), L-NG nitro arginine (L-NOARG) ve metil esteri (L-NAME) dir. İlk çalışmalar bu üç bileşiğin de L-arginin ile NOS üzerindeki substrat bağlanma bölgesine bağlanmak için yarıştıkları yolunda idi. Fakat son araştırmalar, L-NMMA'nin NOS tarafından henüz bilinmeyen bir reaktif ürüne dönüştürüldüğü ve NOS aktivitesinin irreversible olarak bu reaktif ürün tarafından inhibe edildiğidir.



Figür 5: Değişik canlılarda NOS izoenzimleri arasındaki amino asit sekans benzerlikleri.

Kesin etki mekanizmaları ne olursa olsun, L-NMMA, L-NOARG, L-NAME gibi ajanlar; tek bir NOS izoenzimi üzerine selektif etki göstermemekte, in-vivo olarak çok geniş bir etki alanları olmaktadır. Örneğin L-NAME'nin ratlarda, nNOS aktivitesinin inhibisyonundan dolayı antinosiseptif etki gösterdiği belirlenmiş, ayrıca eNOS aktivitesinin inhibisyonundan dolayı da kan basıncında artış gözlenmiştir. Bu non-selektif etkiden dolayı, bu maddeler klinik kullanım için iyi birer aday değildirler. Örneğin diphenyleneiodonium gibi kalmodulin antagonistleride, ko-faktörlerin NOS'a bağlanmasını engellemelerinin yanı sıra, diğer NADPH ve kalmodulin bağımlı enzim aktivitelerini de inhibe etmektedirler. 7-nitro indazol (7-NI) gibi indazol türevi NOS inhibitörleri, ratlarda kan basıncında artışa neden olmadan ratlarda nNOS inhibisyonu sonucu antinosiseptif etki göstermişlerdir. In-vitro olarak 7-NI, NOS selektivitesi göstermese de, in-vivo olarak NOS-selektif etki yapmıştır.

NOS inhibitörlerinin, literatürde belirtilmiş birçok terapötik etkisi bulunmaktadır. Bu etkilerden bir çoğu, MSS üzerine odaklanmıştır. NOS inhibitörlerinin; strok gibi akut, AIDS, demans, Parkinson hastalığı gibi kronik nöron hasarına yol açan patolojilerin tedavisinde kullanılabilir olacağı ihtimalini artırmaktadır. Fakat birkaç istisnai durum hariç, NOS inhibitörlerinin potansiyel terapötik etkileri hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalara dayandırılmaktadır. Henüz insanlar üzerinde yapılmış kapsamlı bir çalışma mevcut değildir. NOS inhibisyonunun potansiyel

terapotik etkisinden de, ancak izoform-selektif inhibitörlerin tanımlanmasından sonra bahsedilebilecektir.

C-2)-PEROKSİNİTRİT

Peroksinitrit (ONOO^-), nitrojen monoksit ve süperoksitten oluşmaktadır.



Reaksiyon çok hızlı olup hız sabiti $k = 6.7 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sn}^{-1}$ dir. ONOOH sadece ksantin oksidazın veya aktive nötrofillerin hızlı süperoksit oluşturmaları ve NOS aktivasyonu sonucu olmaktadır. ONOOH in şok, enflamasyon ve iskemi-reperfüzyondaki rolü gösterilmiştir. ONOOH oldukça hasar verici bir oksijen radikali olup nötrofillerden kemiluminesans oluşumunu arttırmıştır.

6-LİPİD PEROKSİDASYONU

Yağların korunması ve saklanması insanoğlunu uzun yıllar meşgul etmiştir. Yağlar okside olduğu zaman karakteristik renk, tad ve kokuları değişir. Halk arasında acıma, ekşime, bozulma yada kokma denen bu olay, 1940'lı yıllarda kimyasal olarak oto-oksidatif serbest radikal zincir reaksiyonu olarak adlandırılmıştır. Biyolojik sistemlerde PUFA'ların serbest radikaller tarafından oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak adlandırılmıştır (45).

Toksikoloji ve hastalıklarda, lipid peroksidasyonunun belirlenmesi ve ölçülmesi, serbest radikal hasarının bir göstergesi olmuştur. Oksidasyonun göstergesi olarak birçok teknik geliştirilmiş, fakat hiçbirisi oksidasyonun tüm aşamalarını göstermek için yeterli olamamıştır (46).

Membranlarda veya PUFA'larda lipid peroksidasyonu; serbest radikallerin metilen grubundan ($-\text{CH}_2-$) bir hidrojen atomu ($\text{H}^\bullet$) çıkartması ile başlar. Hidrojen atomu sadece bir elektron içerdiğinden karbon atomu üzerinde eşleşmemiş tek bir elektron kalır, $-\dot{\text{C}}\text{H}-$. Yağ asitlerindeki çift bağ varlığında, çift bağa komşu karbon atomu üzerindeki C-H bağı zayıflar ve

H[•] nin ayrılması hızlanır. Böylece, membran lipidlerindeki PUFA yan zincirleri peroksidasyon için duyarlı hale gelir. Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile konjüge dienleri oluşturur. Oluşan konjüge dien ise, oksijen ile birleşerek, peroksil radikalini oluşturur. Oluşan bu radikal, diğer bir yağ asitinden hidrojen atomu çıkartarak zincir reaksiyonu başlatır. Peroksidasyon, Vit E gibi zincir kırıcı antioksidanların ortama eklenmemesi durumunda, substrat kullanılıp bitinceye kadar devam eder. Lipid peroksidasyonu, diğer zincir reaksiyonları gibi 3 aşamadan oluşur: Başlama, ilerleme, sonlanma. Bu terminolojide başlama aşaması ile, yağ asidinden ilk hidrojen atomunun çıkartılması ile zincir reaksiyonunun başlaması kastedilmektedir. İlk hidrojen atomunu çıkartan serbest radikaller; hidroksil ([•]OH), alkoksil (RO[•]), peroksil (ROO[•]) ve HO₂[•] radikalleridir. H₂O₂ ve O₂⁻'nin bir etkisi gözlenmemiştir. Zincir reaksiyonunun son ürünleri, birçok hidroperoksitler ve siklik peroksitlerdir (47).

Lipid peroksitleri, fiyolojik şartlarda oldukça stabil moleküllerdir. Ancak transizyon metalleri veya metal kompleksleri varlığında dekompoze olurlar. Örneğin; in-vivo Fenton Reaksiyonuna katılan tüm redoks-aktif demir kompleksleri, lipid peroksit dekompozisyonunu hızlandırabilmektedirler. Hemoglobin ve sitokromlarda, direkt olarak Fenton reaksiyonunu katalizlemeselerde, peroksit dekompozisyonunu hızlandırmaktadırlar. Ancak hem içeren proteinler, chelatable demir salarak, Fenton Reaksiyonuna katılmaktadırlar. Ferritin ve hemosiderin, lipid peroksidasyonunu başlatmakta oldukça etkilidirler. Buna karşın, transferrin veya laktoferrinin 2 yüksek afiniteli bağlanma bölgesine bağlanan demir, peroksit dekompozisyonuna yol açmamaktadır (48).

Redükte metal kompleksleri (Fe⁺², Cu⁺¹) lipid peroksitlerle birleşerek (LOOH), alkoksil radikallerini oluştururken,

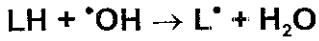


okside metal kompleksleri (Fe⁺³, Cu⁺²) daha yavaş reaksiyona girerek peroksil ve alkoksil radikallerini oluştururlar. Alkoksil ve peroksil

radikalleride yağ asitlerinden diğer hidrojen atomlarını çıkartarak, lipid peroksidasyonunu devam ettirirler. Ayrıca Ca^{+2} , Al^{+3} ve Pb^{+2} gibi iyonlarda bazı durumlarda demir bağımlı lipid peroksidasyonunu hızlandırmaktadırlar.

A)-FERRÖZ İYONLARI İLE PEROKSİDASYONUN BAŞLAMASI

Demir iyonlarının kendileri serbest radikal olup, ferröz iyonlar, moleküler oksijen ile elektron transfer reaksiyonuna girerler. Herhangibir kaynaktan süperoksit oluşumu, demir iyonları varlığında, Fenton Reaksiyonu ile hidroksil radikali oluşumuna neden olur. Yüksek enerjili radyasyon çalışmaları, serbest solüsyonlarda oluşan $\cdot OH$ radikallerinin lipid peroksidasyonunu, yağ asitlerinden hidrojen atomu çıkartarak yaptığını göstermiştir (49).



Doymamış yağ asidi içeren biyolojik numunelerin demir kompleksleri ile muamelesiyle,peroksit dekompozisyonu sonucunda alkoksil ($LO\cdot$) ve peroksil ($LO_2\cdot$) radikalleri oluşumuyla peroksidasyon uyarılmaktadır.

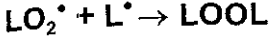
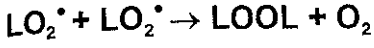


Bu reaksiyonun hız sabiti, ferröz iyonları için $1.5 \times 10^3 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ olarak hesap edilmiştir. Bu hız sabiti, Fenton Reaksiyonundaki ferröz demirin H_2O_2 ile olan reaksiyon hız sabitinden oldukça yüksektir ($76 \text{ mol}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Böylece demir komplekslerinin peroksidasyonu, yeterli miktarda hidroperoksit mevcut olduğundan, lipid dekompozisyonu reaksiyonları ile uyardıkları muhtemeldir.

B)-NON-ENZİMATİK LİPİD PEROKSİDASYONU

Doymamış yağ asidinin (LH) metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkartmaya yeterli enerjisi bulunan herhangi bir serbest radikal ($R\cdot$),

lipidlerde zincir reaksiyonunu başlatabilir. Bu serbest radikal zincir reaksiyonu, 2 serbest radikal birbirini yok edinceye kadar devam eder.



Oluşan LOOL ise siklik peroksittir. Non-enzimatik lipid peroksidasyonunda, peroksil radikalleri, yeni yağ asidi moleküllerini etkileyebilecek zamana kadar aktivitelerini korurlar. Ayrıca demirin redoks siklusu lipid peroksidasyonunu devam ettirir. Sitokrom p450 gibi enzimler NADPH varlığında demir komplekslerini indirgerler.

C)-ENZİMATİK PEROKSİDASYON

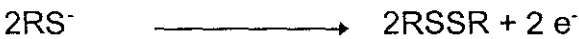
Enzimatik peroksidasyon, bir enzimin aktif merkezinde oluşan lipid peroksitleri için kullanılmaktadır. Üretilen hidroperoksitlerin ve endoperoksitlerin biyolojik fonksiyonları vardır. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimleri örnek olarak verilebilir. Serbest radikaller büyük bir ihtimalle reaksiyon ara ürünleri olmakta, fakat proteinlerin aktif merkezlerine lokalize olmaktadır. Siklooksijenaz ile endoperoksitlerin oluşumu sırasında güçlü bir oksidan oluşmakta ve bazı anti-oksidanlar tarafından ortadan kaldırılmaktadır (50).

Biyolojik membranlarda yoğun lipid peroksidasyonu, akışkanlık kaybı, membran potansiyellerinde düşüş, H^+ ve diğer iyonların permeabilitesinde artışa ve sonuçta hücre membranının yırtılarak, organellerin dışarı sızmasına neden olur. Bazı peroksit fragmentasyonunun son ürünlerinde sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Her zaman lipid peroksidasyon prosesi zararlı olmamaktadır. Arakidonik asit kaskadı veya bitkilerde yara iyileşmesine cevapta olduğu gibi, lipid peroksidasyonunun da faydalı tarafları bulunmaktadır. Lipid peroksitlerin oluşumu ve karbonil gruplarına fragmentasyonu, bitki dokularındaki hasarda, bakterilerin ve fungal sporların öldürülmesinde rol oynamaktadır.

7-TİYOLLER

Tiyol veya sülfhidril terimi, SH gruplarını kastetmektedir. Biyolojik tiyoller, sülfür metabolizması ürünleridir. S-H bağının fiziksel özellikleri, reaktivitesini ve kimyasal özelliklerine yön verir. Biyolojik açıdan; pK, redoks potansiyeli ve serbest radikal oluşturma kapasitesi, tiyol biyokimyasının anahtar noktalarıdır. Tiyoller (R-SH), H₂O dan türeyen bazı alkoller (R-OH) ile bazı kimyasal özellikleri paylaşırlar. Fakat fiziksel olarak S-H ve O-H bağları farklılık göstermektedir. O-H bağı S-H bağına göre kısa olup, daha kuvvetli bir bağlantı gerçekleştirmektedir. Oksijen ile karşılaştırıldığında, sülfürün daha düşük elektronegativitesine karşın, S-H bağının dissosiyasyon enerjisi alkollere göre daha az olmakta ve alkollerin asiditesi daha fazla olmaktadır. Tiyoller RS⁻ olarak reaksiyona girdiklerinden, reaksiyon hızı, pH artışı ile artmaktadır. pH ve tiyol reaktivitesi arasındaki bu ilişki sonucu, tiyol reaktivitesinin indikatörü olarak tiyol pK'sı kullanılmaktadır. pK ve reaktivite arasındaki bu ilişki, thiolate iyonlarının nükleofilik oluşları ve yüksek pK'ya sahip zayıf asitlerin thiolate anyonlarının elektronlarını, reaksiyonu hızlandırmak için kolayca vermeleri ile açıklanabilir. Özellikle sistein üzerindeki karboksil gruplarının tiyol pK'sı üzerine negatif etkisi vardır (51).

Zayıf olan S-H bağının oksidasyonu O-H bağına göre daha kolay olmaktadır. Böylece, tiyoller ve alkoller oksidan ajanlara karşı farklı davranmaktadırlar. Karbonun oksidasyon seviyesinin arttığı alkol oksidasyonuna karşı, tiyol oksidasyonu, sülfürün oksidasyonu üzerinden olmaktadır. Tiyoller önce disülfidlere (RSSR) oksitlenir. Daha kuvvetli oksidasyon durumlarında ise, sülfenik (RSOH), sülfirik (RSOOH) ve sülfonik (RSOOOH) aside oksitlenir. Biyolojik sistemlerde tiyol-disülfid redoksu önemlidir. Biyolojik amino tiyollerin ve disülfidlerin redoks potansiyelleri benzerdir. Tam olmayan bir reaksiyonda, tiyol-disülfid değişimi,



potansiyeli (-) 0.2 - (-) 0.4 volt kadardır (51).

Tiyoller, flavoproteinler, sitokromlar, askorbat, reaktif oksijen türleri, amino asitler gibi intraselüler moleküllerle reaksiyon sonucu disülfidlere oksitlenirler. Amino tiyollerin oto-oksidasyonu ise bir metal kataliste ihtiyaç duymakta ve unstabil thiyl radikallerini (RS) oluşturmaktadır. RS⁻, solüsyonda serbest olan veya metaller ile kompleks yapan bir elektron kaybetmiştir (51).

Fizyolojik şartlarda, alkil ve aril halidlerle olan reaksiyonda, halidlerin yerini alarak sülfidleri oluşturur (RSR⁻). Tiyollerin alkilasyonu, alkenlerin (-C=C) eklenmesi sonucunda da oluşmaktadır. Biyolojik olarak bu reaksiyonun karşılığı; RS⁻ nin alfa-beta unsature karbonil gruplarına (-C=C-C=O) beta pozisyonunda nükleofilik eklenmesidir. Tiyoller ile vit K ve norepinefrin arasındaki reaksiyon sonucu oluşan ürün bu reaksiyona örnektir. Tiyollerin izole karbon-karbon çift bağına eklenmesi, serbest radikal mekanizması açısından fazla önem taşımamaktadır. Tiyoller siyanatlardaki çift bağ (C=N) ile de reaksiyona girerek tiyokarbonatları (NH₂-CO-SR) oluşturmaktadır (51).

Biyolojik amino tiyollerin karbonil (-C=O) grupları ile olan reaksiyonları sonucu oluşan ürünler, alkollerle olan reaksiyon sonucu oluşan ürünlerden farklıdır. Tiyoller karbonil grupları ile reaksiyona girerek tiyazolidinleri oluştururlar. Bu stabil halka türevlerinin oluşumu, serbest amino grubu, sülfhidril grubundan ne kadar uzaklaşırsa, o kadar zor olmaktadır. Glutatyon örneği düşünülürse, karbonil gruplarının eklenmesi ile hemimerkaptal oluşmaktadır. Bazı pridoksal fosfata bağımlı enzimlerin inhibisyonu biyokimyasal olarak tiyazolidin oluşumu ile orantılıdır. Diğer taraftan izomerizasyon, dehidrojenasyon ve hidrasyon reaksiyonlarında, glutatyonun ko-faktör rolü, hemimerkaptal oluşturma mekanizmasına bağlıdır (51,52).

Tiyoller, karboksilik asit ile (RCOOH) birleşerek tiyol esterlerini oluştururlar. Koenzim A, bu yolla reaksiyona girerek RS-açıl bileşiklerini oluşturarak biyolojik asetilasyon reaksiyonlarında görev alır. Diğer bir reaksiyonda ise, asidik pH' ta homosistein halka yapısına dönerek tiyolaktonu oluşturur (51,52).

Alifatik amino tiyoller, nitrojen dioksit (NO_2) , dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve dinitrojen tetraoksit (N_2O_4) gibi nitrojen oksitlerle (NO_x) olan reaksiyonlarında değişiklik gösterirler. Aynı özellik, tiyollerin hem proteinleri gibi metal-nitrozil kompleksleri (M-NO) ile gerçekleştirdiği reaksiyonlar içinde geçerlidir. Bu NO_x bileşiklerinin kimyası, elektrondan zengin bazların eklenmesi ve çıkarılması reaksiyonları ile karakterizedir. Bu bileşikler NO^+ yu nükleofilik substratlara transfer ederler. Her durumda da S-nitrozotiyol (RS-NO) veya tiyonitrit oluşur. Bu bileşikler guanilat siklazı aktive ederek EDRF metabolizmasında önemli rol oynarlar. EDRF'nin vazodilatör ve antiplatelet fonksiyonlarını redükte tiyollerle gerçekleştirdiği bu görüşü doğrulamaktadır. Tiyonitrit dekompozisyonu, diğer metal veya tiyol içeren enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Metal içeren enzimlerin aktiviteleri ya NO -metal bağlanması veya S-metal bağlanması ile metal iyonlarının asit-stabil şelatör komplekslerini oluşturmaları ile değişebilir. Tiyol içeren enzim aktiviteleri ise, RS-NO nun proteinlerin aktif veya allosterik tiyol bölgeleri ile transnitrozasyon reaksiyonuna katılarak NO^+ transferi yapması sonucu olur. Gerçekte bu şekildeki RS-NO dekompozisyonunun heterolitik yolları, NO 'nun homolitik salınımından daha üstün olmakta ve bir çok metabolik aktivitede rol oynamaktadır (53).

Tiyol grupları tokoferil radikalleriyle reaksiyona girerek tokoferolü tekrar oluşturmaktadırlar. Tokoferoller de, tiyol radikalleriyle birleşerek tiyolleri oluştururlar. Hücre içinde GSH, düşük moleköl ağırlıklı en önemli tiyoldür. Dihidrolipoat gibi lipid solubl ve güçlü redükten non-GSH tiyollerde mikrozomal peroksidasyonu inhibe ederler ve tokoferolü korurlar fakat tripsinizasyon veya ısıtılma sonrasında da kaybolmazlar (51,52,53).

GSH, fosfolipid hidroperoksitleri indirgeyen membran bağımlı GSH-Px üzerinden aktivite gösterir. GSH eksikliğinde hidroperoksitler hızlı ve irreversible zincir reaksiyonları ile hızlıca birikirler. Tokoferol daha fazla zincir reaksiyonlarının oluşmasını engelleyerek hidroperoksit oluşturur ve peroksidazın azalmasını engeller. Alternatif olarak, eğer tokoferol cysteinyl veya diğer radikaller tarafından kullanılırsa, lipidlerin otokatalitik peroksidasyonuna karşı koruma potansiyeli azalır. Protein tiyol gruplarının

oksidasyonu, mikrozomlarda tokoferol kaybı ile de paralel olmaktadır (51,52).

Hücrede birçok biyolojik ve farmakolojik-toksikolojik olaylar, sinyal iletimi ile ilişkili olan tiyol-redoks değişiklikleri aracılığıyla gerçekleşmektedir. N-asetil sistein, penisilamin, merkaptopropionit glisin, dihidrolipoat ve kaptopril gibi farmakolojik olarak reaktif ajanların geliştirilmesi ile, bu ajanların bazı spesifik özellikleri gözlenmiştir. Bazı sülfür içeren ajanlar, antioksidan özelliklerinden dolayı tedavide kullanılmaktadır. Tiyoller, doku hasarını önlemek için proteinaz inhibitörlerinin oksidasyonunun baskılanmasında kullanılmaktadırlar. Okside olduklarında sülfhidril grupları kalsiyum salınımına neden olmaktadır (51).

A)-GLUTATYON

Redukte glutatyon (GSH), bir tripeptid olup, gama-glutamil-sistein-glisin; tüm hücrelerde bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyoldür. Hücre içi konsantrasyonu 0.5 mM olup, 10 mM konsantrasyona kadar da ulaşmaktadır. GSH, redukte tiyol grubu ve peptidaz ataklarına dirençli gama-glutamil bağı ile karakterizedir. H_2O_2 , süperoksit ve hidroksil radikali ile birleşerek, radikalleri indirger, ayrıca birçok detoksifikasyon mekanizmasında da rol oynamaktadır.

GSH, hidroksil ve karbon radikalleriyle birleşir ve H^+ atomu verir. Böylece serbest radikal hasarının esas kaynağı olan hidroksil radikali nötralize edilmiş olur. Membranlarda lipid peroksidasyonunun GSH bağımlı faktör ile inhibe edildiği öne sürülmüştür. Diğer antioksidan sistemlerde olduğu gibi, yaşlılık gibi fizyolojik durumlarda veya bazı neoplastik hastalıklarda GSH seviyeleri değişmektedir.

8-PROTEİN KARBONİL İÇERİĞİ

Metallerin katalizlediği oksidasyonun proteinlerin post-translasyonal kovalan modifikasyonunda rol aldığı belirlenmiş ve bu olayın yaşlanma, intraselüler protein turnoverı, artrit, pulmoner hastalıklar gibi birçok fizyolojik

ve patolojik prostedede önemli olduğu gözlenmiştir. Proteinlerin amino asit rezidülerinde karbonil gruplarının bulunması, oksidatif modifikasyonun bir göstergesidir. Bu grupların, karbonil-spesifik reaktiflerle reaksiyonu, metallerin katalizlediği oksidasyonun belirlenmesi ve kantitasyonuna imkan vermektedir. Proteinlerdeki diğer değışikliklerde, oksidatif modifikasyonun bir göstergesi olarak kullanılabilir. Bunlar; katalitik aktivite kaybı, histidin rezidüsü kaybı, yüzey hidrofobisinde değışiklikler, proteinlerin ultraviyole spektrumundaki değışiklikler olarak özetlenebilir. İnaktivasyon haricinde bu alternatif metodlar, sadece pürifiye proteinlerde kullanılabilir. Proteinlerin karbonil içeriklerinin tayini, metal-katalize oksidasyon için kesin bir göstergedir. Karbonil içeren rezidü, tam olarak tanımlanmamış olsa dahi, γ -glutamil semialdehit, major rezidü olarak gözükmeaktadır (54).

Karbonil grupları proteinlerde; enzimatik veya non-enzimatik glikozilasyon sonucunda bulunmaktadır. Örneğin glukoz, proteine bağılı amino grupları ile reaksiyona girerek Schiff Bazı (aldimin) oluşturur ve bu bileşik Amadori düzenlenmesi ile daha stabil olan ketoamine dönüşür. Hem Schiff Bazı hem de ketoamin borotritid metodu ile işaretli proteini oluşturur. 2,4-DNPH ile Schiff Bazı; proteine bağılı hidrazon oluşturmaz iken, ketoamin yavaş bir şekilde oluşturmaktadır (54).

Redoks siklusüne sahip olabilen bir katyon (Fe^{+2}/Fe^{+3}), protein üzerindeki divalen katyon bağlanma bölgesine bağlanır. O_2 veya H_2O_2 ile reaksiyon, reaktif oksijen türlerini oluşturur. Oluşan bu serbest radikaller, katyon bağlanma bölgesindeki veya yakınındaki amino asit rezidülerini oksitler. Bu reaksiyon genelde proteinleri, esansiyel katyon bağlanma bölgelerini hasara uğratarak inaktive eder. Oksidatif modifikasyon birçok enzimatik veya non-enzimatik sistemlerce modifiye edilirken, proteinler üzerindeki katyon bağlanma bölgelerinden dolayı, bölgeye spesifik serbest radikal reaksiyonları oluşur (54). Non-enzimatik model; askorbik asit, oksijen ve demirden oluşmaktadır. E.Coli glutamin sentetazı gibi proteinlerin oksidatif modifikasyonunun belirlenmesinde kullanılmıştır (54).

A) PROTEİN KARBONİL GRUPLARININ ORJİNİ

Bazı amino asit rezidüleri, metal katalize oksidasyon veya iyonize radyasyon sonucu, aktif reaktif oksijen türleri tarafından karbonil türevlerine dönüşürler. Sadece amino asit yan zincirlerinin direkt oksidasyonu, protein karbonil gruplarının oluşumu için tek sebep değildir. Glikasyon sonucunda indirgen şekerlerin lizin (Lys) rezidülerinin ϵ amino grubuyla reaksiyonu sonucu Schiff bazları oluşur ve Amadori reaksiyonu ile ketoaminler oluşur. Alternatif olarak, şeker molekülü okside olarak ketoaldehit oluşturabilir. Daha sonra ketoaldehit türevleride Lys rezidüleri ile birleşerek, karbonil fonksiyonu içeren Schiff bazlarını oluşturabilir. Bu glikasyon ürünleri daha sonra oldukça floresan kahverengi pigmentler olan Maillard ürünlerini oluştururlar. Hayvanlarda Maillard ürünlerinin yaşla arttığı bulunmuştur (57).

Esterbauer ve arkadaşları, PUFA'ların serbest radikal bağımlı oksidasyonu sonucu α,β -doymamış aldehitlerinin, özellikle 4-hidroksinonenalin oluştuğunu ve bu moleküllerin proteinlerin sülfidril grupları ile 'Michael addition tip' mekanizması ile reaksiyona girerek, karbonil fonksiyonunu içeren daha stabil tiyoeter türevlerini oluşturduklarını göstermişlerdir. Ayrıca bu α,β -doymamış aldehitleri histidin ve lizin rezidüleri ile reaksiyona girerek, karbonil grubu içeren molekülleri oluşturmaktadırlar (57).

B) OKSİDE PROTEİN BİRİKİMİNİN MOLEKÜLER TEMELİ

Protein oksidasyonunda artış, birçok faktörden en az birindeki değişikliği yansıtabilir:

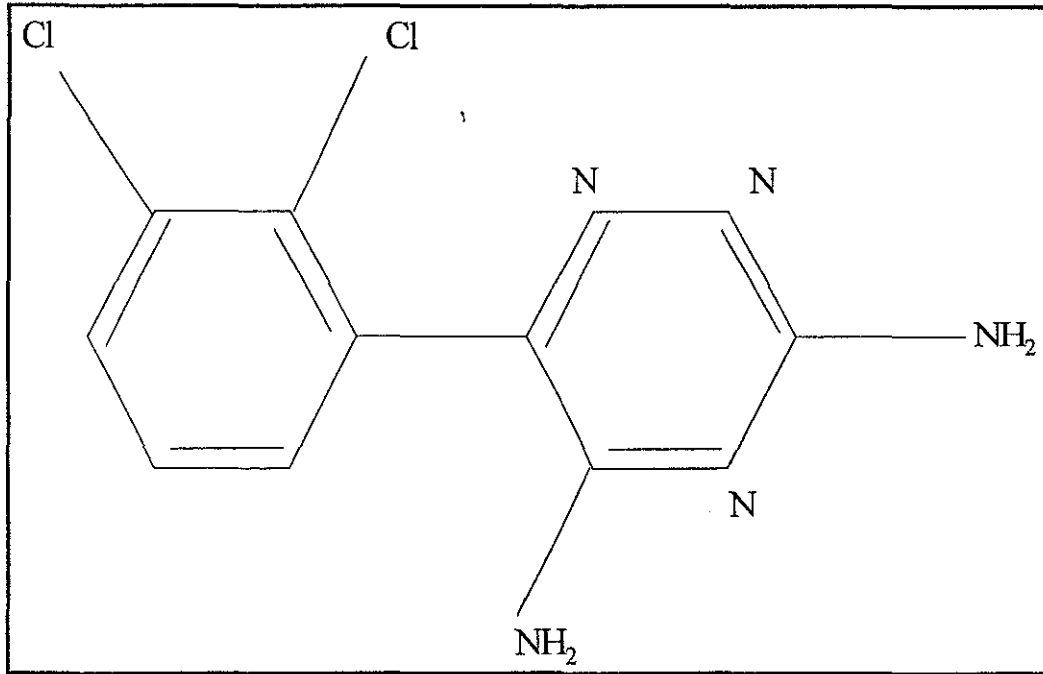
1- Hücrelere O_2 dağıtılması, hemoglobinin O_2 'ye bağlanma afinitesindeki artış, 2-Elektronların transferinde yetersizlik, 3-Metal bağlayıcı proteinler ve şelatör ajanların yokluğunda, Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metallerin artmış konsantrasyonu, 4-GSH-Px'in H_2O_2 ve alkil peroksitlerini scavenge edecek yeteneğini kısıtlayan redükte glutatyon miktarındaki düşüş, 5-SOD, katalaz, GSH-Px, bilirubin, Vitamin E, karotenoidler, ürik asit gibi aktif O_2

scavengerlerinin konsantrasyonunda düşüş, 6-Enzimleri oksidatif modifikasyondan koruyan substrat konsantrasyonlarında değişiklik (57).

Okside proteinlerin yıkımının azalması da, proteaz aktivitesindeki azalmayı veya proteaz aktivitesini inhibe eden maddelerin konsantrasyonundaki artışı yansıtır. Proteaz aktivitesinin önemi, Carney ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir. Okside protein birikimi, nötral alkale protein aktivitesi ile ters orantılıdır. Yaşlı gerbillerin uzun süreli tert-bütill- α -fenilnitron (PBN) ile tedavisiyle, beyinlerindeki nötral proteaz aktivitesinde artış, hafıza fonksiyonlarının yerine gelmesi ve okside protein miktarının genç hayvanlarla aynı bulunması gibi sonuçlar elde edilmiştir. PBN tedavisinin kesilmesi ile, tüm test edilen parametreler tekrar eski haline dönmüştür (57).

9-LAMOTRIGINE

Lamotrigine (3,5-diamino-6[2,3-dichlorophenyl]-1,2,4 triazine) feniltriazine grubuna ait bir bileşik olup, kimyasal olarak diğer antiepileptiklerle benzerlik göstermemektedir. Günümüzde parsiyel veya generalize tonik-klonik epileptik vakaların klinik tedavisinde kullanılmaktadır (58).



Figür 7: Lamotriginin kimyasal yapısı.

Son alışmalar, Lamotriginin, voltaj-bağımlı sodyum kanallarını bloke ederek, presinaptik nöronal membranların stabilizasyonunu sağladığı ve glutamat gibi eksitatuvar nörotransmitterlerin salınımını engelleyerek aktivitesini gösterdiği yolundadır. Beyindeki en önemli EAA olan glutamat ve aspartat; epileptik aktivitenin başlaması, devam etmesi ve korunmasından, yakından sorumlu tutulan moleküllerdir. Lamotrigine; rat serebral kortikal kesitlerinde, sodyum bağımlı glutamat ve aspartat salınımını; izole spinal kord da elektriksel uyarıya karşı gelişen glutamat salınımını ve ratlarda iskemiye bağımlı striatal glutamat salınımını gl bir şekilde inhibe etmiştir. Lamotrigine glutamat salınımının modülasyonu haricinde sodyum bağımlı GABA salınımını da inhibe etmektedir (59).

Voltaj bağımlı elektrofizyolojik özelliklerinden dolayı, devamlı bir depolarizasyonda selektif olarak sodyum kanalları ile ilişkili olmakta ve normal elektrofizyolojik aktivitede herhangi bir fonksiyon göstermemektedir. Bu özelliğinin göstergesi olarak, rat kortikal sinir hcreti kültürlerinde ve izole spinal kord kesitlerinde tekrarlayan ve ani nöronal ateşlemeyi bloke etmiş, rat hippokampal kesitlerinde ise normal sinaptik iletiyi engellememiştir (60).

İn vitro olarak, D1 ve D2 dopaminerjik, α ve β adrenerjik, A1 ve A2 adenosin, muskarinik ve σ reseptörlerine karşı herhangi bir afinitesi belirlenmemiştir. Fakat [^3H] batrachotoxinin-A-20- α -benzoate ve [^3H] quizapine ile voltaj sensitif sodyum kanalları ve serotonin 5-HT $_3$ reseptör ligandları ile bağlanmak için yarışmaktadır. Rat hippokampal ve kortikal nöron membranlarında GABA, glutamat, NMDA ve KA bağımlı iyonik akımlar üzerine minimal etkisi vardır. İn vivo olarak da glutamat reseptörleri üzerine herhangi bir antagonistik etki yaptığı bulunamamıştır (59,60).

Glutamat bağımlı nörotoksisite, serebral iskemideki hücre hasarı ve nekrozundan sorumlu tutulmakta ve EAA salınımının engellenerek iskemik hasarın sınırlandırılacağı düşünülmektedir. Lamotriginin ratlarda kalıcı sol orta serebral arter oklüzyonu sonrası, enfarkt hacmini azaltarak nörolojik defisitleri ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (37,61,62,63).

Lamotriginin farmakokinetik özellikleri sağlıklı yetişkin gönüllülerde ve antiepileptik tedavi alan yetişkin hastalarda tanımlanmıştır. Çocuklar üzerinde tanımlanmış data çok azdır (58).

Lamotrigine oral alımdan sonra tamamıyla absorbe olur. Pik plazma konsantrasyonlarına 1-3 saat içinde ulaşır. Oral dozdan 4-6 saat sonra, ilacın gastrik resiklüsünden dolayı 2. bir pik gözlenmiştir. Lamotriginin % 55'i plazma proteinlerine bağlanır. N-glukuronidasyon aracılığıyla metabolize olur ve bu basamak ilacın eliminasyonunda hız kısıtlayıcı basamaktır. Tek oral dozun yaklaşık % 70'i 6 gün sonra idrarla; % 80-90'i 2-N-glucuronide ve geri kalanı 5-N-glucuronide ve esas ilaç olarak atılır. Tekrarlanan doz alımlarında; Lamotriginin metabolizmasında klinik açıdan önemli herhangi bir otoindüksiyona rastlanmamıştır. Bu sebeple hepatik sitokrom p450 enzim aktivitesinde herhangi bir değişikliğe rastlanmamıştır (58).

Tek oral doz sonrası, plazmadan ortalama eliminasyon yarı ömrü 22.8-37.4 saat olarak hesap edilmiştir. Multipl dozların ise bu süre üzerine pek fazla etkisi yoktur. Ancak valproik asit ile beraber alındığında bu süre uzayabilir ve enzim-indükleyen antiepileptiklerle bu süre kısaltılabilir (58).

Glukuronidasyon aktivitesindeki azalma, yaşa bağlı olarak, Lamotriginin plazma klerensini düşürmektedir. Lamotriginin yaşlılardaki plazma klerensi, gençlere göre % 37 daha az bulunmuştur (58).

III-MATERYAL VE METODLAR

1-CERRAHİ PROSEDÜR

Bu çalışmada 50 adet 270-350 gram ağırlığında yetişkin, erkek Swiss-Albino rat kullanıldı. Ancak iskemi veya reperfüzyon sırasında ölen hayvanlar çalışma dışı tutuldu. Her grupta 8 adet rat olmak üzere, 32 rat ile çalışma tamamlandı.

Operasyon öncesi ratlar yaklaşık 12 saat aç bırakıldı. Bir gr/kg üreteran intraperitoneal uygulandıktan sonra, ratlar sırtüstü yatırılarak dört ekstremitelerinden operasyon masasına tespit edildi. Kafaları ekstansiyon pozisyonunda sabitleştirildi. Çene altından başlayarak sternuma kadar orta hatta, insizyonla cilt, cilt altı, platisma superfisyal fasiası geçildi. Her iki musculus sternohyoideus ekartör ile birbirinden ayrıldı. Trakea gözlendi. Her iki musculus sternomasteideus medialinde ve trakea lateralinde nervus vagus ile seyreden arteria carotis communis ortaya çıkartılarak nervus vagustan ayrıldı. Kontrol (Sham) grubunda operasyon bu aşamaya kadar gerçekleştirildi. Iskemi grubunda her iki arteria carotis communis 5/0 ipek ile bağlanarak 30 dakika süresince iskemi oluşması sağlandı. Ayrıca kuyruk veninden yaklaşık 4 ml kan alınarak hipotansiyon indüklendi. Reperfüzyon grubunda ise, 30 dakikalık iskemi ve hipotansiyon periyodunu takiben, bağlı olan arterler çözülerek 1 saat süresince re-oksijenasyon sağlandı. Tedavi grubunda ise, iskemi ve hipotansiyon oluşturulmasından hemen sonra Lamotrigine 20 mg/kg intraperitoneal verilerek iskemi ve reperfüzyon aşamaları aynen uygulandı.

Ratlar dekapite edildikten sonra beyinleri çıkartılarak kan ve diğer kontaminantlardan arındırıldı. Beyin; kortikal, subkortikal ve serebellar dokularına ayrılarak, her bir doku örneği, içerisinde 1 ml soğuk 100 mmol/L potasyum fosfat tamponu (pH:7.5) bulunan plastik tüplere konuldu. Tüm dokular buz içeren ortamda homojenize edildi (TRI-R STIR-R Model K43). Homojenizasyon aşamasında, dokuların daha iyi homojenizasyonunu sağlamak için 2 ml soğuk tampon yavaş yavaş ilave edilerek toplam homojenat hacmi 3 ml'ye tamamlandı.

Homojenizasyon sonrası, her bir numune ependorflara ayrılarak, 14.000 rpm, +4°C de 20 dakika santrifuj edildi (SIGMA 3K10, Laborzentrifugen). Ependorflardan süpernatantlar hemen ayrılarak, nitrit ölçümü için ilk 30 dakika içinde kullanıldı. Diğer biyokimyasal analizler için, süpernatant alikuatlara bölünerek - 60°C de saklandı.

2-NİTRİT TAYİNİ

Beyin dokusu nitrit düzeyleri Ohta ve arkadaşlarının fluorometrik metoduna göre belirlenmiştir (64).

Prensip:

Nitrit, asidik ortamda fenolik bileşiklerle hızlı bir reaksiyona girerek nitrozo türevlerinin oluşmasına neden olur. Normalde nitrozo grubunun elektron çekme özelliğinden dolayı bu bileşikler non-fluoresandır. Bu bileşiklerin alkalen ortamda aromatik amine indirgenmesi ile fluorometrik olarak nitrit tayini mümkündür. Bu metodla; 4-hidroksikumarinin asidik ortamda nitrozasyonu ve alkalen ortamda fluoresan 3-amino-4-hidroksikumarine indirgenmesi ile nitrit tayini yapılmıştır.

Reaktifler:

- 4-hidroksikumarin: % 0.04
- Dimethylformamide
- Sodium thiosulfate: % 8
- HCl: 2N
- NaOH: 1.5 N
- Sodium Nitrite

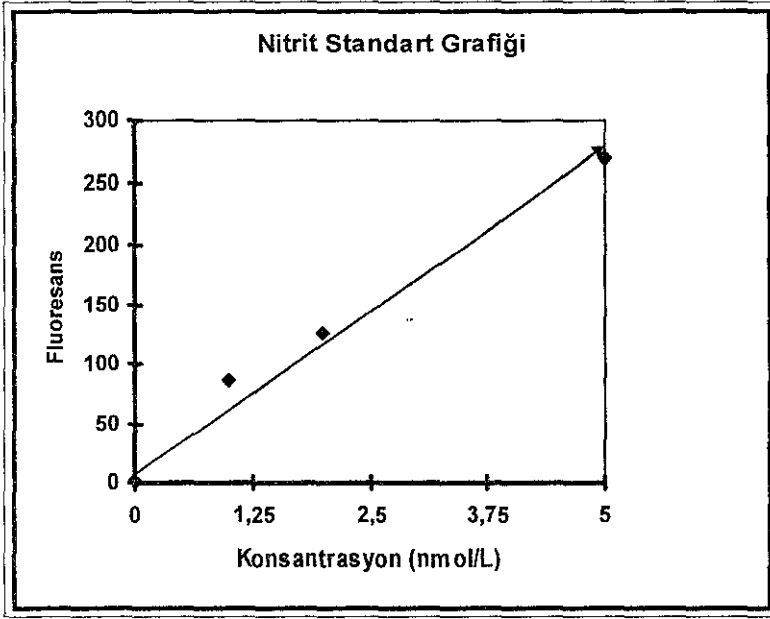
Prosedür:

1 ml süpernatant üzerine 0.5 ml % 0.04 4-hidroksikumarin [1:1 (v:v) dimethylformamide: 2N HCL içinde çözöldü.] eklendi. Vortekslelendikten sonra 5 dakika 0 °C de buz içinde bekletildi. 50 µL %8 sodium thiosülfat eklendi. Beş dakika oda ısısında bekletildikten sonra 0.5 ml 1.5 M NaOH eklenerek numuneler oda ısısında 10 dakika daha bekletildiler. 340 nm

eksitasyon, 453 nm emisyon dalga boyları kullanılarak, numunelerin floresansı Shimatzu RF-5000 spektrof luometresinde ölçüldü. Sonuçlar piko mol nitrit / mg protein olarak verildi.

Nitrit standart grafiği:

Nitrit standart solüsyonu, sodyum nitritin 110 °C de 4 saat kurutularak, 1 mg/ml olacak şekilde deiyonize su içerisinde çözülmesiyle elde edildi. Standart solusyon haftalık yapılarak +4 °C de saklandı. Dilüsyonlar gerekli olduğu zaman günlük olarak hazırlandı.



Figür 8:Nitrit standart grafiği

3-NİTRAT TAYİNİ

Doku nitrat düzeyleri, tek basamaklı end-point enzimatik yöntem ile ölçülmüştür (65).

Prensip:

Beyin dokusu nitrat düzeyleri; nitratın nitrite, nitrat redüktaz ile indirgendiği reaksiyonda β -NADPH'in oksidasyonu sonucu 340 nm de absorbansdaki düşüş ile değerlendirildi. Ortama FAD elektron taşıyıcısı olarak eklendi.

Reaktifler:

- Nitrat Redüktaz (Aspergillus): 500 U/L
- FAD: 0.2 mM
- β -NADPH: 12 mM
- NaNO₃:
- Potasyum fosfat tamponu: 100 mM, pH=7.5

Prosedür:

İçerisinde 250 μ L 100 mM potasyum fosfat tamponu, 50 μ L distile su, 50 μ L FAD, 10 μ L β -NADPH ve 100 μ L numune bulunan tüpler 25 °C de dengeye getirildi. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için 40 μ L Nitrat Redüktaz eklendi. FAD nin fotolabilitesinden dolayı reaksiyonun karanlık ortamda gerçekleşmesi sağlandı. 45 dakika sonra numunelerin absorbansı 340 nm de Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde ölçüldü.

Numune körü:

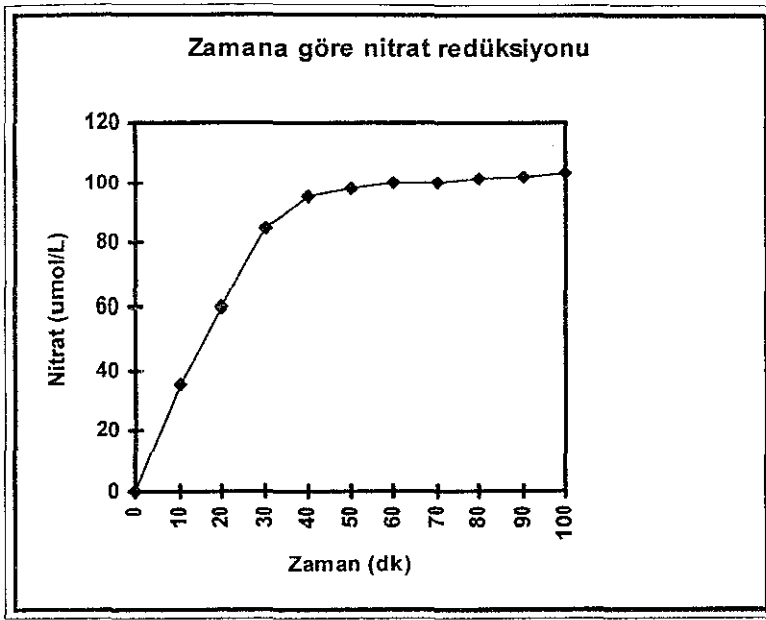
Her bir numune için numune körü, nitrat redüktaz yerine distile su kullanılarak hazırlandı.

Reaktif körü:

Aynı prosedür, 100 μ L numune yerine 100 μ L distile su kullanılarak hazırlandı

İnternal standartlı numuneler:

Aynı prosedür, 50 μ L distile su yerine 50 μ L standart nitrit solüsyonu eklenerek yapıldı.



Figür 9: Zamana göre nitratın nitrite indirgenmesi

Hesaplama:

Doku nitrat konsantrasyonu aşağıdaki formül ile hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein olarak verildi.

$$C = \Delta A \times \text{faktör}$$

$$\Delta A = A_{\text{numune körü}} - A_{\text{numune}} - A_{\text{reaktif körü}}$$

$$\text{Faktor} = V_T / V_N \times 1 / l \times 1 / \epsilon_{340} \times 10^3 = 0.8$$

$$V_T = \text{Reaksiyon total hacmi} \quad (500 \mu\text{L})$$

$$V_N = \text{Numune hacmi} \quad (100 \mu\text{L})$$

$$l = \text{Işık yolu} \quad (1 \text{ cm})$$

$$\epsilon_{340} = \beta\text{-NADPH in } 340 \text{ nm de milimolar absorptivitesi} \quad (6.22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1})$$

$$10^3 = \text{mmol/L den } \mu\text{mol/L ye çevirme faktörü}$$

4-MDA TAYİNİ

Beyin dokusu MDA düzeyleri Wasowicz ve arkadaşlarının fluorometrik metoduna göre yapılmıştır (66)

Prensip:

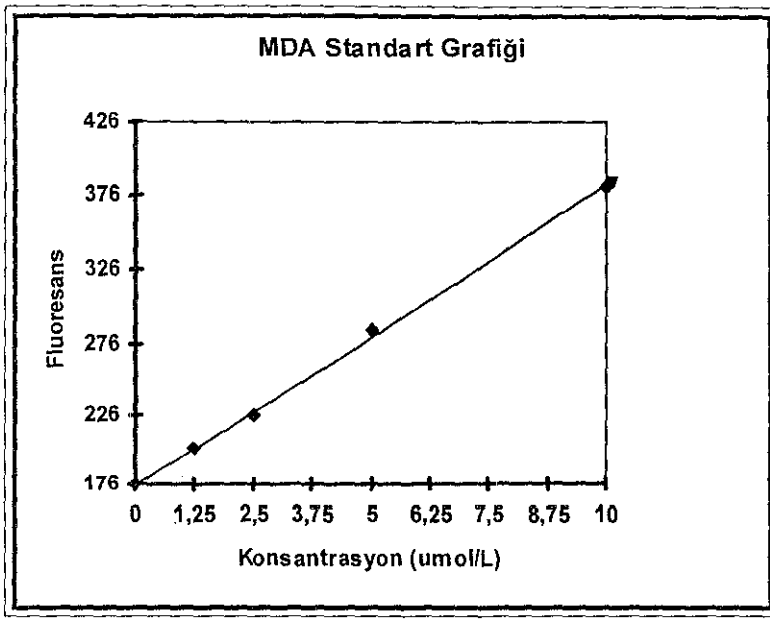
Bu metod ile MDA tayini, MDA'nın TBA ile MDA-TBA bileşimini oluşturmaya ve oluşan bileşimin asidik ortamda n-Butanol ile ekstraksiyonuna ve n-Butanol fazının 525 nm eksitasyon, 547 nm emisyon dalga boylarında fluoresansının ölçülmesine dayanmaktadır.

Reaktifler:

- Thiobarbiturik asit (TBA): 29 mM
- Asetik asit: 8.75 M
- 1,1,3,3 -tetramethoxypropane:
- n-Butanol:
- HCl: 5 M

Prosedur:

50 µL numune, içinde 1 ml distile su bulunan cam tüplere kondu. 1 ml TBA (8.75 M asetik asit içinde) (reaksiyon karışımı pH=2.4-2.6) eklendikten sonra tüpün ağzı sıkı bir şekilde kapatılarak 1 saat 100 °C kaynar su banyosunda tutuldu. Numuneler çeşme suyu altında soğutulduktan sonra 25 µL HCl eklenerek son pH'nın 1.6-1.7 olması sağlandı. 3.5 ml n-Butanol eklenerek, numuneler 5 dakika vortekslendi. Butanol fazı, numunelerin +4 °C de 5 dakika 1500 xg de santrifügasyonu sonucu elde edildi. Butanol fazının fluoresansı 525 nm eksitasyon, 547 nm emisyon dalga boyları kullanılarak Shimatzu RF-5000 spektrofotometresinde ölçüldü. Sonuçlar nmol/mg protein olarak verildi.



Figür 10: MDA standart grafiği

5-KONJÜGE DİEN TAYİNİ

Doku konjuge dien düzeyleri Recknagel ve Glende'nin spektrofotometrik metoduna göre yapılmıştır (67).

Prensip:

Konjuge dien içeren organik moleküller, « **K bantı** » denilen 215 ve 250 nm arasında absorbans piki yaparlar. Peroksidize lipidler ise 233-234 nm'deki yoğun K bantı ile karakterizedirler. Peroksidize doymamış yağ asitlerinde konjuge dien oluşumu; bu moleküldeki çift bağları ayıran metilen grubundaki hidrojenler üzerine serbest radikal atağı sonucundadır.

Reaktifler:

- Kloroform:
- Metanol:
- Cyclohexane: (spektrofotometrik grade)
- Nitrojen gazı: (HABAŞ)

Prosedür:

0.5 ml numune üzerine 0.5 ml kloroform:metanol (2:1, v:v) solüsyonu eklendi 5 dakika vortekslendikten sonra nitrojen gazı altında

kloroform:metanol fazının evaporasyonu sağlandı. Kloroformdan arınmış olan ekstrakt, 2 ml cyclohexane içinde çözüldü. Numunelerin absorbanşı 234 nm de cyclohexane körüne karşı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu. Sonuçlar $\epsilon_{\max} = 2.52 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak nmol hidroperoksit / mg protein olarak verildi.

6-DOKU SÜLFHİDRİL (SH) GRUPLARI TAYİNİ

Doku SH grupları Koster ve arkadaşlarının spektrofotometrik metoduna göre belirlenmiştir (68).

Prensip:

Protein sülfhidril grupları, DTNB tarafından indirgenir ve disülfid bağı oluşturarak bir kromofor açığa çıkartırlar (**5-merkapt-2-nitrobenzoik asit**). Oluşan kromoforun intensitesi 412 nm'de ölçülür.

Reaktifler:

- DTNB {5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)}: 2 mM
- Potasyum fosfat tamponu: 0.1 M, (pH:7.4)
- Sodyum sitrat: %1

Prosedür:

100 µl numune, 1500 µl fosfat tamponu ile karıştırıldı. 400 µl DTNB (sodyum sitrat içinde) ilave edildikten sonra 5 dakika 37 °C'de bekletildi. Numunelerin absorbanşı 412 nm de reaktif körüne karşı Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu. Sonuçlar $\epsilon_{\max} = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak µmol/mg protein olarak verildi.

7-DOKU PROTEİN KARBONİL GRUPLARI TAYİNİ

Protein karbonil grupları, Levine ve arkadaşlarının spektrofotometrik metoduna göre belirlenmiştir (69)

Prensip:

Proteinler ile kullanılan klasik bir karbonil reaktifi olan 2,4-dinitrofenilhidrazin, karbonil grupları ile birleştğinde renkli bir hidrazon oluşturmakta ve oluşan bu hidrazonun intensitesi 360 nm de okunmaktadır



Reaktifler:

- DNP (2,4-dinitrofenilhidrazin): 10 mM
- HCl: 2 N
- TCA: %10, %20
- NaOH: 1 M

Prosedür:

500 µl numune 500 µl %20 TCA ile karıştırıldı. 14000 rpm de 15 saniye santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü. Pelet 500 µl DNP (2 N HCl içinde 50 °C de çözülecek) ile karıştırıldıktan sonra karanlıkta oda ısısında 1 saat bekletildi. Her 10 dakikada bir vortekslenerek peletin DNP ile muamelesi sağlandı. 500 µl %20 TCA ile karıştırıldıktan sonra 2-3 dakika oda ısısında bekletildi 14000 rpm de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant döküldü ve aynı işlem %10 TCA ile 3 defa tekrarlandı. Presipitat 2 ml NaOH içinde 37 °C de 30 dakika bekletilerek çözüldü. Numunenin absorbansı NaOH körüne karşı 360 nm'de Shimadzu UV-1601 spektrofotometresinde okundu. $\epsilon_{\text{max}}=22000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak sonuçlar mol karbonil / mg protein olarak verildi.

8-DOKU PROTEİN TAYİNİ

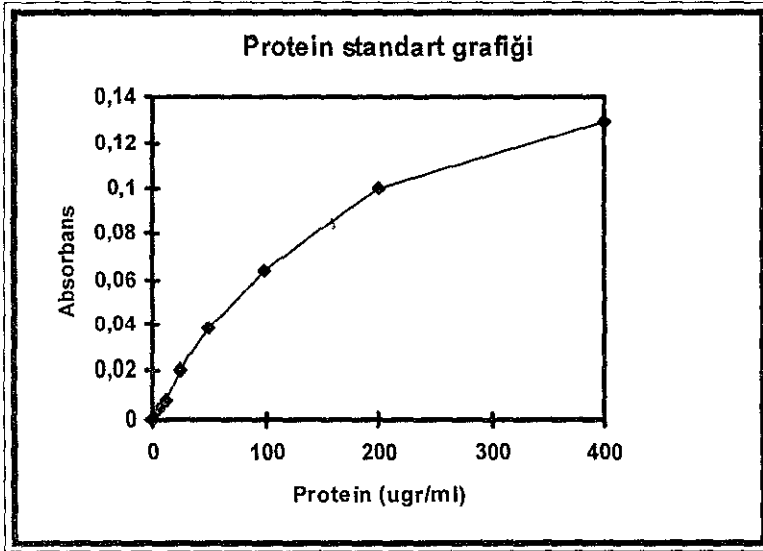
Doku protein içeriği Lowry metoduna göre tayin edilmiştir (70).

Prensip:

Proteinler alkali ortamda Cu^{+2} ile reaksiyona girerek bakır-peptid bağı-protein kompleksini oluştururlar. Folin Ciocalteu reaktifi eklendiğinde, bakır-protein kompleksleri tirozin ve triptofan kalıntıları ile birleşerek renkli bir kompleks oluştururlar. Bu renkli kompleksin absorbansı 750 nm'de okunur.

Reaktifler:

- BSA (Bovin serum albumini):
- NaOH: 1N
- D reaktifi:
 - a-%2 Na_2CO_3 anhidr (10 ml)
 - b-%1 CuSO_4 (0.1 ml)
 - c-%2 Na-K tartarat (0.1 ml)
- Folin Ciocalteu reaktifi:



Figür 11: Protein (BSA) standart grafiği.

Prosedür:

0.1 ml numune üzerine 0.1 ml NaOH ve 1 ml D reaktifi eklendi. 20 dakika oda ısısında karanlıkta bekletildi. 0.1 ml Folin Ciocalteu reaktifi eklendikten

sonra 30 dakika daha oda ısısında karanlıkta bekletildi 2 ml distile su eklenerek numunenin absorbansı distile suya karşı 750 nm'de okundu.

9-İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler MICROSTA paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ SD olarak ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık One-way analysis of variance (ANOVA) testi kullanılarak belirlenmiştir Student's *t* testi kullanılarak beyin bölgeleri arasındaki istatistiksel anlamlılık test edilmiştir.

IV-SONUÇLAR

1-DOKU NİTRİT DÜZEYLERİ

Her dört deney grubundaki, kortikal, subkortikal ve serebellar nitrit düzeyleri **Tablo 4**'te görülmektedir.

Tablo 4:Doku nitrit düzeyleri (pmol/mg protein)

GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	0.40±0.03	0.39±0.03	0.57±0.07 ^d
İSKEMİ	4.19±0.52 ^{a,e}	5.16±0.56 ^a	4.94±0.71 ^a
REPERFÜZYON	12.78±1.07 ^{a,b}	12.71±1.84 ^{a,b}	11.94±1.18 ^{a,b}
TEDAVİ	7.66±0.92 ^{a,c}	8.08±0.91 ^{a,c}	8.23±0.91 ^{a,c}

n=8 (Herbir deney grubunda)

Data ortalama±SD olarak verilmiştir.

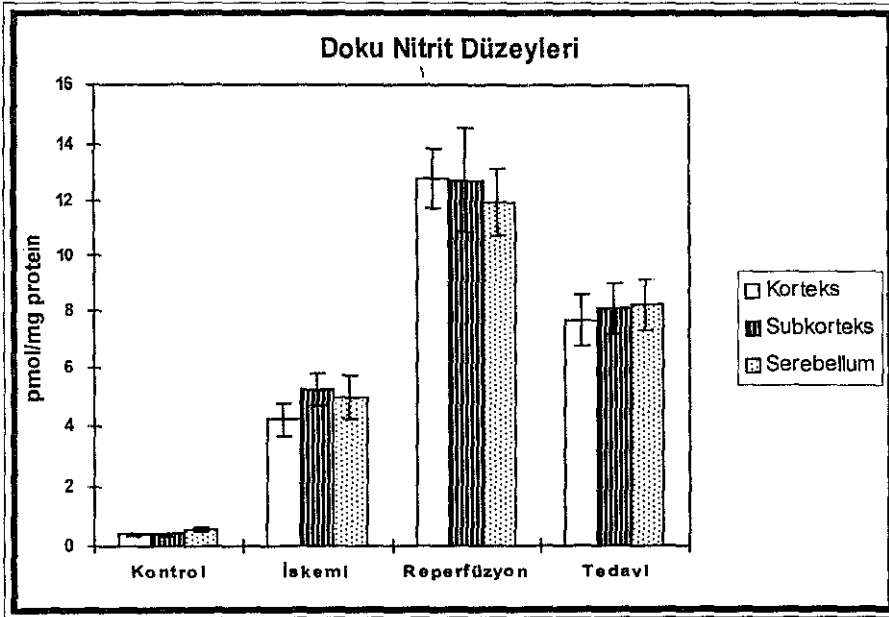
a p<0.001 İskemi, Reperfüzyon, Tedavi vs Kontrol

b p<0.001 Reperfüzyon vs İskemi

c p<0.001 Tedavi vs Reperfüzyon

d p<0.001 Serebellum vs Korteks ve Subkorteks

e p<0.05 Korteks vs Subkorteks ve Serebellum



Figür 12: Doku nitrit düzeyleri

Nitrit düzeyleri, korteks, subkorteks ve serebellumda; iskemi, reperfüzyon ve tedavi gruplarında, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). İskemik periyodu takiben reperfüzyon grubunda nitrit düzeyleri istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). Tedavi grubunda ise, reperfüzyon grubuna göre, nitrit düzeylerinde önemli düşüş gözlenirken ($p < 0.01$), nitrit değerleri kontrol grubunun çok üzerinde bulunmuştur.

Her üç beyin bölgesi grup içerisinde karşılaştırıldığı zaman; kontrol grubunda, serebellar nitrit düzeyleri, kortikal ve subkortikal nitrit değerlerine göre yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca iskemi grubunda kortikal nitrit düzeyleri, subkortikal ve serebellar nitrit düzeylerinden istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$).

2-DOKU NİTRAT DÜZEYLERİ

Her dört deney grubundaki kortikal, subkortikal ve serebellar nitrat düzeyleri **Tablo 5**'te görülmektedir.

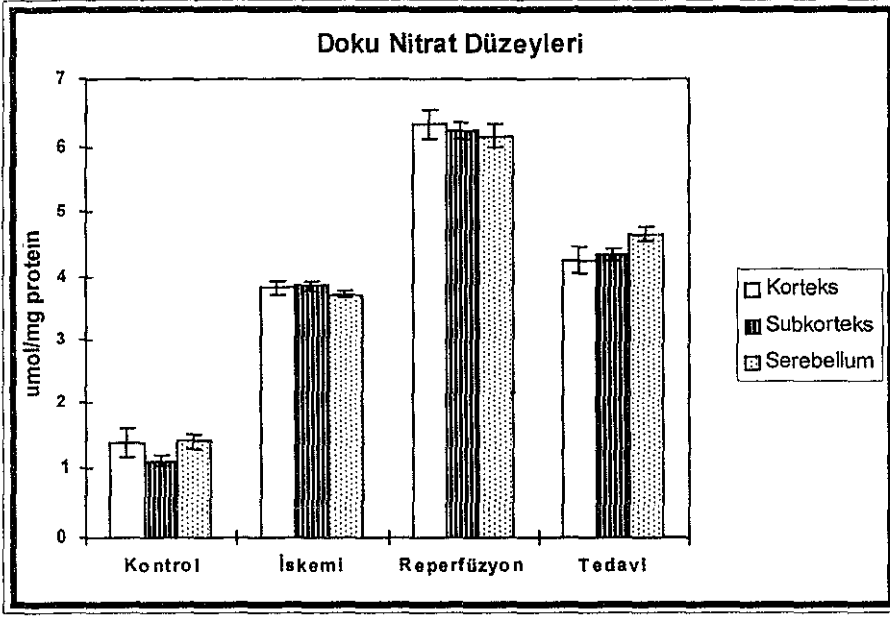
Tablo 5:Doku nitrat düzeyleri ($\mu\text{mol/mg protein}$)

GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	1.39 $\pm$ 0.21	1.12 $\pm$ 0.08	1.40 $\pm$ 0.11
İSKEMİ	3.83 $\pm$ 0.11	3.86 $\pm$ 0.07	3.73 $\pm$ 0.06
REPERFÜZYON	6.33 $\pm$ 0.22	6.22 $\pm$ 0.12	6.15 $\pm$ 0.17
TEDAVİ	4.24 $\pm$ 0.20	4.33 $\pm$ 0.09	4.64 $\pm$ 0.11

n=8 (Herbir deney grubunda)
Data ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

- a** $p < 0.001$ İskemi, Reperfüzyon, Tedavi vs Kontrol
- b** $p < 0.001$ Reperfüzyon vs İskemi
- c** $p < 0.001$ Tedavi vs Reperfüzyon
- d** $p < 0.05$ Subkorteks vs Korteks ve Serebellum
- e** $p < 0.05$ Serebellum vs Korteks
- f** $p < 0.001$ Serebellum vs Korteks ve Subkorteks

Ötüz dakikalık iskemi periyodunu takiben elde edilen nitrat düzeyleri, kontrol grubuna göre iskemi grubunda istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). İskemiye takiben reperfüzyon grubunda ise nitrat düzeyinde artış hem kontrol grubuna hem de iskemi grubuna göre devam etmiştir ($p < 0.001$). Lamotrigine ile tedavi edilen grupta, nitrat düzeyleri kontrol ve iskemi grubuna göre yüksek bulunmuş olsa da ($p < 0.001$), reperfüzyon grubuna göre istatistiksel olarak azalmış bulunmuştur ($p < 0.001$)



Figür 13: Doku nitrat düzeyleri

Her üç beyin bölgesi grup içerisinde karşılaştırıldığında; kontrol grubunda subkortikal nitrat düzeyleri, kortikal ve serebellar nitrat düzeylerine göre istatistiksel olarak daha az bulunurken, iskemi grubunda subkortikal nitrat değerleri kortikal ve serebellar bölge nitrat değerlerinden daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Reperfüzyon grubunda ise, serebellar nitrat düzeyleri kortikal nitrat düzeylerinden daha az bulunurken ($p < 0.05$), tedavi verilen grupta serebellar nitrat düzeyleri, kortikal ve subkortikal nitrat düzeylerinden daha fazla bulunmuştur ($p < 0.001$).

3-DOKU MDA DÜZEYLERİ

Beyin dokusu MDA değişiklikleri **Tablo 6**'da görülmektedir.

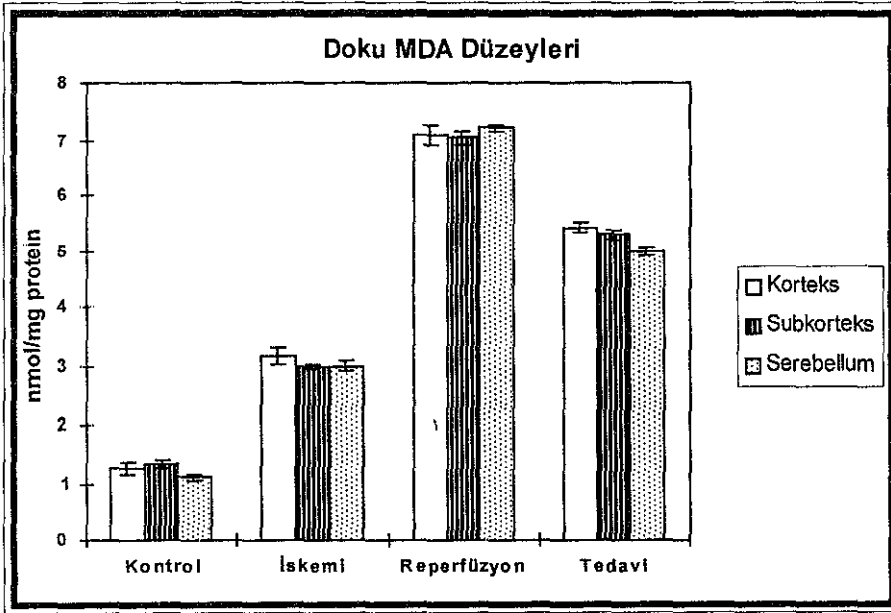
Tablo 6: Doku MDA düzeyleri (nmol/mg protein)

GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	1.26±0.10	1.34±0.06	1.22±0.05 ^d
İSKEMİ	3.17±0.14 ^{a,e}	2.97±0.04 ^a	3.00±0.08 ^a
REPERFÜZYON	7.09±0.19 ^{a,b}	7.04±0.12 ^{a,b}	7.22±0.06 ^{a,b,f}
TEDAVİ	5.42±0.09 ^{a,c,e}	5.29±0.08 ^{a,c}	4.98±0.07 ^{a,c}

n=8 (Herbir deney grubunda)

Data ortalama±SD olarak verilmiştir.

- a** p<0.001 İskemi, Reperfüzyon, Tedavi vs Kontrol
b p<0.001 Reperfüzyon vs İskemi
c p<0.001 Tedavi vs Reperfüzyon
d p<0.05 Serebellum vs Korteks ve Subkorteks
e p<0.01 Korteks vs Subkorteks ve Serebellum
f p<0.01 Serebellum vs Korteks ve Subkorteks



Figür 14:Doku MDA düzeyleri

Otuz dakika iskemi uygulanan grupta, kontrol grubuna göre doku MDA konsantrasyonunda anlamlı bir artış gözlenmiştir (p< 0.001). Bu artış reperfüzyon grubunda, kontrol ve iskemi grubu ile karşılaştırıldığında devam etmiştir (p< 0.001). Lamotrigine ile tedavi sonrasında, reperfüzyon grubuna göre, MDA konsantrasyonunda anlamlı bir düşüş gözlenirse de (p< 0.001), bu değerler kontrol ve iskemi grubu MDA konsantrasyonlarının çok üzerinde bulunmuştur (p< 0.001).

Her bir beyin dokusu, grup içerisinde kendi arasında kıyaslandığında, kontrol grubunda serebellar MDA konsantrasyonu diğer dokulara göre daha az bulunurken ($p < 0.05$), iskemi ve tedavi grubunda kortikal MDA değerleri , reperfüzyon grubunda ise serebellar MDA düzeyleri diğer dokulara göre anlamlı derecede fazla bulunmuştur ($p < 0.01$).

4-DOKU KONJÜGE DİEN DÜZEYLERİ

Beyin dokusu konjüge dien içeriğinin iskemi ve reperfüzyona göre değişimi **Tablo 7'**de görülmektedir

Tablo 7: Doku konjüge dien düzeyleri (nmol hidroperoksit/mg protein)

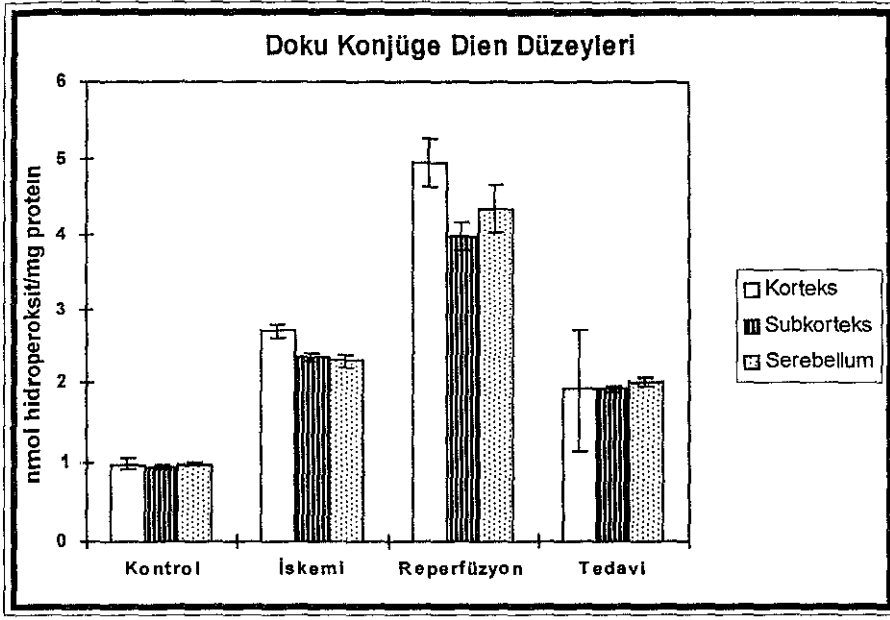
GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	0.98±0.06	0.95±0.03	0.98±0.01
İSKEMİ	^{a,d} 2.70±0.10	^a 2.33±0.06	^a 2.28±0.09
REPERFÜZYON	^{a,b,d} 4.95±0.31	^{a,b} 3.98±0.19	^{a,b} 4.35±0.32
TEDAVİ	^{a,c} 1.91±0.79	^{a,c} 1.91±0.03	^{a,c,e} 2.01±0.05

n=8 (herbir deney grubunda)

Data ortalama±SD olarak verilmiştir.

- a** $p < 0.001$ İskemi, Reperfüzyon, Tedavi vs Kontrol
b $p < 0.001$ Reperfüzyon vs İskemi
c $p < 0.001$ Tedavi vs Reperfüzyon
d $p < 0.001$ Korteks vs Subkorteks ve Serebellum
e $p < 0.01$ Serebellum vs Korteks ve Subkorteks

Otuz dakikalık iskemi periyodunu takiben her üç beyin dokusu konjüge dien miktarında istatistiksel olarak bir artış meydana gelmiştir ($p < 0.001$). Reperfüzyon grubunda ise bu artış hem kontrol grubuna hem de iskemi grubuna göre devam etmiştir. İskemi oluşturulmasından hemen sonra Lamotrigine tedavisi ile, hem iskemi hemde reperfüzyon grubuna göre konjüge dien miktarında anlamlı bir düşüş gerçekleşmiştir ($p < 0.001$) fakat tedavi grubunda konjüge dien miktarları, kontrol grubunun çok üzerinde bulunmuştur ($p < 0.001$).



Figür 15:Doku konjüge dien düzeyleri

Kortikal, subkortikal ve serebellar bölge konjüge dien konsantrasyonları her dört grup içerisinde kendi arasında kıyaslandığında; iskemi ve reperfüzyon grubunda kortikal konjüge dien konsantrasyonu, subkortikal ve serebellar konjüge dien konsantrasyonlarından yüksek bulunurken ($p < 0.001$), tedavi grubunda serebellar konjüge dien konsantrasyonu, diğer bölgelere göre anlamlı derecede artmış bulunmuştur ($p < 0.001$).

5-DOKU TİYOL GRUPLARI KONSANTRASYONU

Beyin dokusunda tiyol gruplarının iskemi ve reperfüzyona göre değişimleri Tablo 8'de görülmektedir.

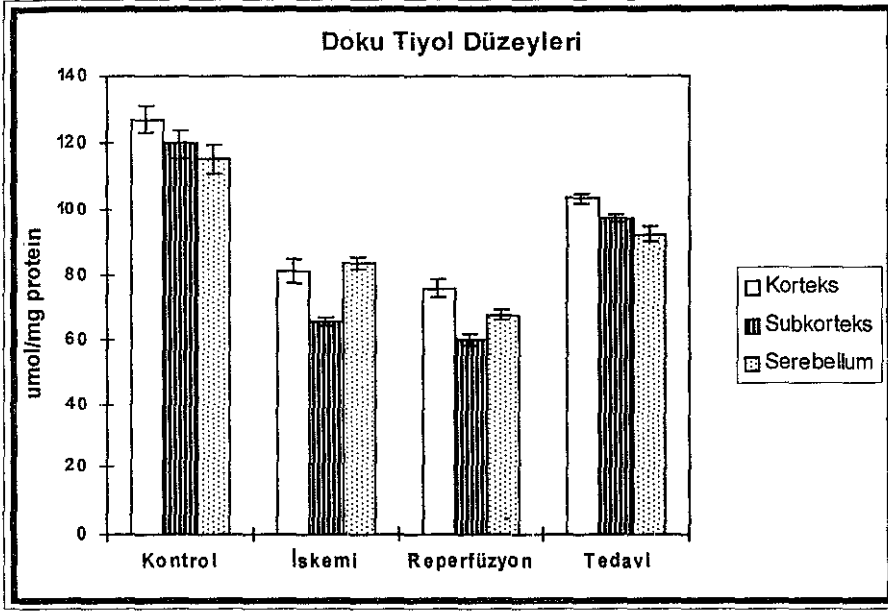
Tablo 8: Doku tiyol düzeyleri ($\mu\text{mol/mg}$ protein)

GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	126.63 ± 3.87	119.67 ± 3.97	115.29 ± 4.07
İSKEMİ	81.16 ± 3.74	65.50 ± 1.28	83.33 ± 1.97
REPERFÜZYON	75.79 ± 2.84	60.09 ± 1.71	67.80 ± 1.60
TEDAVİ	103.58 ± 1.63	96.90 ± 1.26	92.21 ± 2.06

n=8 (herbir deney grubunda)

Data ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir

- a** $p < 0.001$ İskemi, Reperfüzyon, Tedavi vs Kontrol
b $p < 0.05$ İskemi vs Reperfüzyon
c $p < 0.001$ Tedavi vs İskemi ve Reperfüzyon
d $p < 0.05$ Korteks vs Subkorteks ve Serebellum
e $p < 0.001$ Subkorteks vs Korteks ve Serebellum
f $p < 0.001$ Korteks vs Subkorteks ve Serebellum



Figür 16:Doku tiyol düzeyleri

Otuz dakikalık iskemi periyodunu takiben, her üç beyin dokusu tiyol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p < 0.001$). Tiyol gruplarındaki bu düşüş, reperfüzyon grubunda, kontrol grubu ve iskemi grubuna göre istatistiksel olarak devam etmiştir ($p < 0.001$, $p < 0.05$ sırasıyla).

Lamotrigine tedavisi ile, doku tiyol gruplarında, iskemi ve reperfüzyon gruplarına göre artış meydana gelse de ($p < 0.001$), bu konsantrasyonlar kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulunmuştur ($p < 0.001$).

Kontrol ($p < 0.05$), reperfüzyon ve tedavi ($p < 0.001$) gruplarında, kortikal bölge tiyol grupları konsantrasyonu subkortikal ve serebellar bölgeye göre yüksek bulunurken, iskemi grubunda subkortikal tiyol konsantrasyonları, kortikal ve serebellar bölgeye göre daha az bulunmuştur.

6-DOKU KARBONİL DÜZEYLERİ

Beyin dokusu karbonil içeriği'nin iskemi ve reperfüzyona göre değişimi Tablo 9'da görülmektedir.

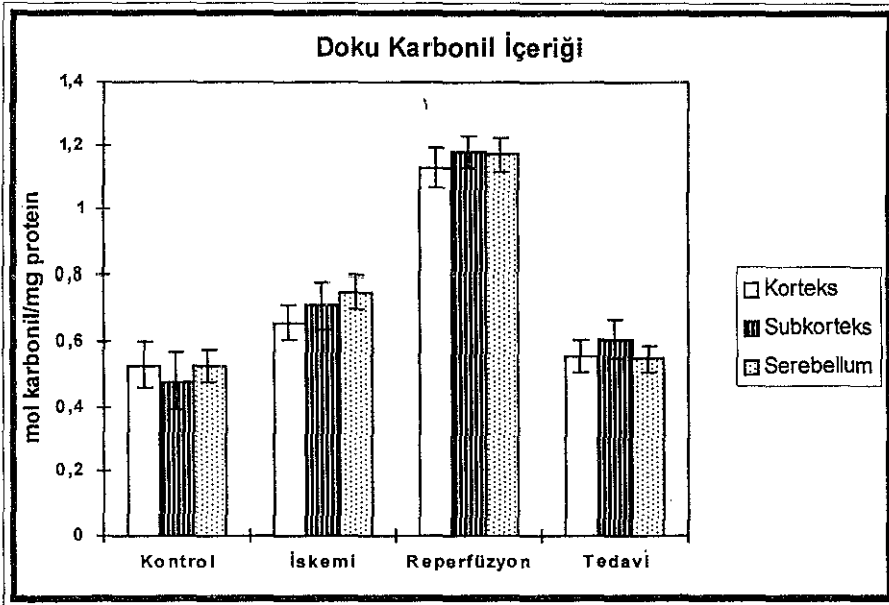
Tablo 9: Doku karbonil düzeyleri (mol karbonil/mg protein)

GRUPLAR	KORTEKS	SUBKORTEKS	SEREBELLUM
KONTROL	0.53±0.07	0.48±0.09	0.53±0.05
İSKEMİ	0.66±0.05 ^{a,f}	0.71±0.07 ^a	0.75±0.05 ^a
REPERFÜZYON	1.13±0.06 ^{a,b,f}	1.18±0.05 ^{a,b}	1.17±0.05 ^{a,b}
TEDAVİ	0.56±0.05 ^{c,d}	0.61±0.06 ^{c,d,e,g}	0.55±0.04 ^{c,d}

n=8 (Herbir deney grubunda)

Data ortalama±SD olarak verilmiştir.

- a** p<0.001 İskemi, Reperfüzyon vs Kontrol
b p<0.001 Reperfüzyon vs İskemi
c p<0.001 Tedavi vs Reperfüzyon
d p<0.05 Tedavi vs İskemi
e p<0.05 Tedavi vs Kontrol
f p<0.05 Korteks vs Subkorteks ve Serebellum
g p<0.05 Subkorteks vs Korteks ve Serebellum



Figür 17: Doku karbonil düzeyleri

Otuz dakikalık iskemi periyodunu takiben her üç beyin dokusunda da karbonil içeriği kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.001$). Reperfüzyon grubunda ise bu artış, kontrol ve iskemi grubuna göre istatistiksel olarak devam etmiştir ($p < 0.001$). Tedavi grubunda ise, her üç beyin bölgesinde, karbonil oluşumunda reperfüzyon grubuna göre ($p < 0.001$) ve iskemi grubuna göre ($p < 0.05$) istatistiksel olarak bir azalma belirlenmiştir. Sadece subkortikal bölgede, kontrol grubuna göre daha fazla karbonil içeriği tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Her üç beyin bölgesindeki karbonil kontenit oluşumu, deney grubu içerisinde karşılaştırıldığında; iskemi ve reperfüzyon grubunda kortikal karbonil konsantrasyonu, subkortikal ve serebellar karbonil konsantrasyonundan daha düşük bulunurken ($p < 0.05$), tedavi grubunda subkortikal karbonil konsantrasyonu diğer bölgelere göre daha fazla bulunmuştur ($p < 0.05$).

V-TARTIŞMA

Strok, kafa travması veya kardiyak areste bağılı olarak meydana gelen serebral iskemi, en önemli kalıcı sakatlık sebebidir. Global serebral iskeminin prototipi kardiyorespiratuvar arestir. Olayı başlatan sebepler dikkate alınmazsa; kardiyak arest, vital organlara özellikle beyine oldukça zarar vermektedir. Klinisyenin dikkat etmesi gereken bir husus, başarılı bir resüsitasyonun sadece normal kardiyak ritmin veya hemodinamiğin sağlanması demek olmadığıdır. Resüsitasyonun bilinç, kuvvet ve hayatın yeniden sağlanması olduğu ve esas amacın mentalitenin yeniden kazanılması olduğu unutulmamalıdır. Bu sebepten, kardiyopulmoner resüsitasyon fenomeninin, kardiyopulmoner serebral resüsitasyon fenomenini de içine alacak bir şekilde genişletilmesi gerekmektedir (71).

Son yıllarda resüsitasyon alanında yeni gelişmeler olmuştur, fakat bununla beraber nörolojik iyileşme, resüsitasyon tıbbını kısıtlayan en önemli faktör olma özelliğini korumaktadır. Ülkemizde bu alandaki istatistiksel bilgiler kısıtlıdır. ABD’de yılda 800.000 den fazla kardiyak resüsitasyon gerçekleştirilmektedir. Hastaneden taburcu olma oranına bakılarak hastaların yaşama şansı % 20 nin altında olup % 12 ye kadar düşmektedir. **"Brain Resuscitation Clinical Trial I"** adlı çalışmadan alınan bilgilere göre; arest zamanının 6 dakikadan daha uzun olmadığı ve resüsitasyon zamanının 30 dakikayı aşmadığı vakalarda, hastaların % 50 si nörolojik olarak herhangi bir defisit göstermemişlerdir. Resüsitasyon zamanı 30 dakikayı aştığında, hastaların sadece % 3 ü nörolojik düzelme göstermiştir. Arest zamanı 6 dakikayı aşan fakat resüsitasyon işlemlerinin 5 dakikadan daha kısa sürdüğü vakalarda da, hastaların % 50 sinde olumlu sonuçlar alınmıştır. Tüm vakalar ele alındığında, arest zamanının 15 dakikayı geçtiği durumlarda hiçbir hastada iyileşme gözlenmemiştir. Kardiyopulmoner resüsitasyon, tam bir standartta sahip olmayan, yeterince gelişmemiş bir tıbbi müdahale olma özelliğini korumakta ve araştırmaya dayanan yeniliklere ihtiyaç duymaktadır. Klinisyenin dikkat etmesi gereken bir konu da; incomplete serebral iskeminin sıklıkla oluştuğudur. Özellikle laktat birikimi, beyinde iyileşme periyodunu geciktirmektedir. Yetersiz kan

akımı asidoza neden olmakta, aerobik olarak metabolize olamayan glukoz da asidozu arttıracaktır (1,72)

Beyin total vücut ağırlığının % 2 sini oluştursa da, bir kardiyak atımın % 20 sini almaktadır. Beyin, serebral kan akımını (**CBF**) koruyabilmek için sabit bir şekilde glukoz ve oksijene ihtiyaç duymaktadır. Beyin hemen hemen tüm enerji ihtiyacını glukozun oksidasyonundan sağlamaktadır. Kan akımının herhangi bir sebepten dolayı kesilmesi durumunda, beyinde iki fizyolojik mekanizma önem kazanmaktadır. Bunlardan en önemlisi otoregülasyondur. Normal bir beyinde otoregülasyon; 50 ml / 100 gram beyin / dk lik CBF yi korumaktadır. İkinci protektif mekanizma "**Cerebral metabolic requirement for oxygen (CMRO₂)**" dir. Bu mekanizma ile kan, metabolik ihtiyaçları daha önemli olan fokal beyin bölgelerine kanalize olmaktadır. Patolojik olaylar kaskadı iskemiyi başlatması ile dakikalar içinde oluşmaya başlamaktadır. 6-8 dakika içinde, santral iskemik bölgede kalıcı nöronal hasar olmaktadır. Fakat global serebral iskemide, nöronların bir kısmı iskemiden korunurken, bir kısım nöronların subpopülasyonlarında kayıp meydana gelmektedir. Nöronal dejenerasyon yalnızca iskemik periyod ile irreversible olarak belirlenemez. Arest sırasında veya sonrasında nöronal hasara neden olan bazı metabolik ve hemodinamik düzensizlikler oluşmaktadır. Bu mekanizmalardan hangisinin iskemiyi patofizyolojisinde en önemli rolü oynadığını kestirmek güçtür (73,74).

Enerji ve iyon dengesinin kaybı bir çok değişikliğe neden olmakla birlikte, bunlardan en önemlisi beyinde eksitatuvar cevaptan sorumlu olan nörotransmitter glutamatın ekstraselüler akümüülasyonudur. Glutamat iskemisi süresince ilk 10 dakikada 5 kat, 20. dakika sonunda ise 10-15 kat artmaktadır (73).

Kardiyak arest sonrası serebral perfüzyonun kesintiye uğraması, " **no-reflow** " denilen, hiçbir kan akımının olmadığı bir periyoda neden olacaktır. Bu periyodu multifokal iskemik, kısa global hiperemi periyodu ve uzamış hipoperfüzyon ve sonuçta rezolüsyon fazı izleyecektir. Global beyin iskemisi sırasında veya sonrasındaki bu değişiklikler kompleks olup tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak bununla beraber nöronal hasarın

büyük bir kısmının reperfüzyon sırasında olduğu kesinlik kazanmıştır. Kısa bir reaktif hiperperfüzyon periyodu olmasına rağmen, yeterince perfüze olmamış, oksijene ihtiyacı ve sağlanması arasındaki dengelerin olmadığı beyin bölgeleri olacaktır. Bu patolojinin muhtemel nedenleride; kan viskozitesindeki artış, damar lumeninin fizyolojik kompresyonu, endotelial mikrovillus oluşumu ve yetersiz perfüzyon basıncıdır. İskemi sonrasındaki " re-flow "; yaşamı ve kardiyak arest sonrası iyileşmenin kalitesini belirleyen en önemli faktördür (75). Klinik tecrübeler organ reperfüzyonunun doku hasarını arttırdığı yolundadır. Global beyin iskemisine neden olan herhangi bir olay, hastada kortikal veya tüm beyin yetersizliğine neden olacaktır. Klinisyen böyle bir potansiyel patolojinin varlığından mümkün olduğunca haberdar olmak mecburiyetindedir ve resüsitasyondan hemen sonra; kortikal, beyin sapı veya serebellar fonksiyonları kontrol altına alacak seri nörolojik muayeneler yapılmalıdır. Nörolojik bulgulardaki değişiklikler prognoz açısından önemlidir (76).

Diğer organ sistemleriyle kıyaslandığında, serebral yetersizliğin derecesini gösterecek standart bir marker yoktur. Serebral perfüzyon basıncı (CPP), CMRO₂ hesaplanması, kreatin kinaz-BB (CK-BB) izoformunun ölçümü veya elektrofizyolojik çalışmalar yapılmaktadır (77).

CPP, CBF'nin yeterliliği hakkında kaba bir fikir vermektedir. CPP; ortalama arterial basınç ile ortalama intrakraniyal basıncın farkıdır ve normal olarak 60-90 mmHg kadardır. CPP, 30 mmHg'nin altına düştüğü zaman, nöronlar tehdit altındadır. Normal CBF, 50-60 ml / 100 gr beyin / dk'dır ve normal bir yetişkin beyinde 700-840 ml / dk'dır. Basınç akım ile eş anlamlı olmadığından CPP ve CBF arasındaki ilişki önemlidir. CPP, 50 mmHg nin altına düştüğü zaman, CBF azalacaktır. Kritik CBF normalin % 20 si kadar düşünülmektedir. Herhangi bir akım olmamasına göre, beyinin, normalin % 10'undan fazla olan kan akımını tolare edebildiği gösterilmiş olsada, herhangi bir akım olmaması, çok az akım (normalin % 10 undan az) olmasına göre daha iyidir (74)

Klinik olarak ilgi CMRO₂ üzerinde olmasına rağmen, kolayca ölçülememektedir. Normal değerleri 3-4 ml / 100 gr beyin / dk'dır. CBF'nin

arteriyovenöz oksijen farkına bölümüdür. Ekstraserebral kan kontaminasyonunu minimumda tutmak için, $CMRO_2$ hesaplanırken, vena jugularis superior bulbundan kan alınmaktadır. Son yıllarda CK-BB de ölçülebilmektedir. Kardiyak arest sonrasındaki nörolojik hasarın belirlenmesinde bu testin önemi vardır. CK-BB nin büyük bir kısmı beyinde bulunsa da, gastrointestinal sistem, mesane, uterus, prostat ve damarlarda da bulunmaktadır. CK-BB maksimum seviyelerine iskemiden 0.5-2 saat sonra ulaştığından, kısa süre içerisinde ölçülmesinde yarar vardır (77,78).

Postkardiyak arest ensefalopatinin patolojisi kompleks olup tek bir mekanizma içermemektedir ve postiskemik nöronal koruma da tek bir tedavi yönteminden ziyade multipl tedavilerle daha iyi olacaktır. Beyine yönelik terapötik modeller şöyle özetlenebilir:

a) Kardiyopulmoner serebral resüsitasyon, b) Re-flow, c) Ventilatuvar destek, d) Hipotermi, e) Farmakolojik destek, f) Hemodilüsyon, g) Metabolik manipölasyon, h) Epileptik aktivitenin kontrolü ve önlenmesi, i) Serbest radikal bağımlı hasarın önlenmesi.

$CMRO_2$ nin azalması, intra- ve postresüsitasyon nöronal korumayla ilgilidir. İndüklenen hipotermi nin $CMRO_2$ 'yi, enzimatik reaksiyon hızlarını ve ATP tüketim hızlarını azalttığı belirlenmiştir. Postkardiyak arest hipotermi nin beyni, reperfüzyon hasarından koruduğu fakat, prekardiyak arestte uygulanan hipotermide elde edilen sonuç kadar iyi olmadığı gösterilmiştir. 28 °C - 32 °C lik hipotermi, nöronlarda protektif olmuş fakat ventriküler fibrilasyona neden olmuştur. 34 °C lik hipotermi, kardiyak yan etkileri olmaksızın hayvan modellerinde protektif olmuştur. Hipotermi nin serebral proteksiyondaki rolü multifaktoriyeldir. Bu koruma serbest radikal oluşumunun, bazı enzimatik aktivitenin, eksitotoksisitenin baskılanması ve membranların direkt proteksiyonu ile olmaktadır. Beyin ısısının düşürülmesi, intrakarotid soğuk salin bolus enjeksiyonu veya kafa çevresine buz torbası yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir (78).

Bir çok hasta tıbbi müdahaleyi, iskemiden dakikalar veya saatler sonra aldığından, etkili bir tedavi protokolünün uygulanması şarttır. Hayvan

deneyleri; ciddi iskemide dakikalar, orta dereceli iskemide ise saatlerin enfarkta yol açan olaylar zincirini başlattığını göstermiştir. Bununla beraber ciddi iskemiden saatler hatta günler bazen de haftalar sonra doku hasarı gerçekleşmektedir. Yoğun iskemik alan ile, normal perfüzyonun devam ettiği bölge arasındaki peri-infarkt bölge; yüksek ekstraselüler nörotransmitter konsantrasyonu, yaygın depresyon ve anoksik depolarizasyon ile karakterize depolarizasyon dalgalarıyla, serbest radikal oluşumu ve enflamasyon ile karakterizedir. Birçok nöroprotektif ajan, bu bölgedeki bu tür patolojilerin baskılanması amacıyla kullanılmaktadır.

NMDA reseptör antagonistleri veya kanal blokerleri, hayvan modellerinde fokal iskemide başarılı olmuşlar fakat global iskemide bu başarıyı gösterememişlerdir. Kanalin büyük bir ihtimalle açık olduğu yüksek glutamat konsantrasyonunda, NMDA reseptör kanalını bloke eden ajanlar, reseptöre bağlanmak için glutamatla yarışma içinde olan ilaçlardan teorik olarak üstündürler. Glisin bölgesi (MDL105572, AEE1021, L687414) veya potansiyel poliamin modulatuar bölgesi (eliprodil) antagonistleri, glisin veya poliaminlerin farklı allosterik bölgelere bağlanması, NMDA reseptör kanal açılmasını etkileyeceğinden, nöroprotektif olabilirler. Kanal blokerlerinin prototipi olan dizocilpine, 1980'lerde strok çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Fakat hayvanlarda cingulate gyrus nöronlarında vacuolar değişikliklerin bulunması, bu ilaç ile ilgili gelişmeleri yavaşlatmıştır. Bu patoloji yüksek dozda diğer NMDA reseptör antagonistlerinin kullanılması ile de gösterilmiştir. Non-NMDA reseptör aktivasyonu, iskemi sırasında belirgin bir iyon fluksı ve eksitotoksisiteye neden olmaktadır. NMDA reseptörlerinin aksine, iskemik bölgedeki asidik pH'tan dolayı inhibe olmamaktadırlar. NBQX gibi quinoxaline ve quinoxaline-dione türevleri hem fokal hem de global iskemi modellerinde başarılı olmuşlardır. Özellikle NBQX, NMDA reseptör antagonistlerinin başarılı olamadığı ciddi global iskemide oldukça başarılı olmuştur (79,80,81).

Serbest oksijen radikalleri; lipid, DNA, karbohidrat ve proteinlere zarar vererek eksitotoksik nöronal hasara katkıda bulunmaktadırlar. Serbest radikal oluşumu ile kan-beyin bariyeri bozulacak, beyin ödemi ve

lökositlerin iskemik bölgeye hareketi ile, kan akımında değişiklikler meydana gelecektir. Serbest radikal scavengerları ve lipid peroksidasyon inhibitörleri iskemi sonrasında özellikle reperfüzyonda beyin hasarını azaltmaktadırlar. 21-aminosteroid olan U74006F, iskemi / reperfüzyon modellerinde nöron hasarını azaltmıştır. U74006F, kafa travması, stroke ve subaraknoid kanama sonrası vazospazmdan kaynaklanan iskemik beyin hasarında kullanılmıştır. Vazospazm çalışmalarında kadınlar, ilacı erkeklere göre daha hızlı metabolize ettiklerinden, ilaç erkeklerde daha başarılı olmuştur (82,83). Stroke çalışmaları hala devam etmektedir. Polietilen glikol konjüge SOD (PEG-SOD), hayvan modellerinde, reperfüzyona bağlı nöron hasarını azaltmıştır (84). Kafa travmasına bağlı gelişen stroke çalışmalarında hastalar, travmadan sonraki ilk 4 saat içerisinde PEG-SOD ile tedavi edilmişler 3 ay sonra yapılan değerlendirilmede, plasebo grubundaki hastaların % 44'ü ölmüş veya bitkisel hayata girmiş iken bu oran tedavi grubunda % 20 olarak bulunmuştur. Spin traplar veya diğer serbest radikal scavengerları, kan-beyin bariyerini daha iyi geçtiklerinden, damar içerisinde fonksiyona sahip olacaklardır ve PEG-SOD veya trilasaddan daha iyi sonuç vereceklerdir. Serbest radikal scavengerları hayvanlarda geçici iskemi modellerinde oldukça başarılı olmuşlardır. Fakat insanlarda, trombolitik ajanlar gibi reperfüzyonu sağlayacak ajanlar ile beraber kullanıldığında etkilerinin nasıl olacağını görmek gerekir.

Nadroparin adlı düşük molekül ağırlıklı heparin benzeri antikoagülanın stroke çalışmalarında başarılı olduğu gösterilmiştir. Urokinaz, streptokinaz veya rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) gibi trombolitik ajanlar, M.I. hastalarında erken verildiğinde başarılı olmuşlardır ve % 70-80 damar rekanalizasyonunu sağlamışlardır. Fakat % 0.6 gibi düşük bir ihtimal de olsa fatal beyin kanamasına yol açmaktadırlar (85).

İskemiden saatler sonra, beyaz kan hücreleri iskemik bölgedeki damar yüzeyine yapışarak kapillerlerin oklüzyonuna ve reperfüzyonda dahi bölgesel kan akımının tıkanmasına yol açmaktadırlar. Beyaz hücreler kan-beyin bariyerini iskemiden yaklaşık 12-48 saat sonra geçmektedirler. PMN veya makrofajlardan salgılanan sitokinler ve diğer kemoattraktan

kimyasallar, damar duvarı hasarına, hemoraji, ödem ve doku nekrozuna neden olmaktadır. İskemik hasar, nötropeni yapan ajanlarla veya ICAM veya P-selectin gibi beyaz hücrelerin endotel yüzeyindeki reseptörlere yapışmasını engelleyecek antikorlarla azaltılabilir

Nörotransmitter salınımı, Na^+ kanal aktivasyonu ile depolarize olmuş akson terminalindeki Ca^{+2} kanallarının açılması ile olmaktadır. Klinik olarak sadece L tipi

(Nimodipine) kanal blokerleri kullanılmıştır (86). Sitoplazmik veya mitokondrial yoğun Ca^{+2} inflüksünü engelleselerde, klinik açıdan önemli sonuçlar elde edilmemiştir. Örümcek zehirinden veya deniz hayvanlarından elde edilen N kanal blokeri peptidler, nörotransmisyonu etkili bir şekilde bloke etmişlerdir (87). SNX111, klinik olarak geliştirilmeye çalışılan bir ajan olup, hipotansiyon gibi yan etkileri bulunmakta ve bu da, strok hastaları için kabul edilemez bir durumdur. Lamotigine, lubeluzole, riluzole ve fosphenytoin, Na^+ kanal blokajı ile iyon fluksını azaltmakta ve akson terminallerinden nörotransmitter salınımını azaltmaktadır (88).

Akut iskemik strokta, iskemi oluşmasından sonraki ilk 48 saat içerisinde, GSH-Px benzeri anti-oksidan aktiviteye sahip olan seleno organik bileşik ebselen verilmiş ve tedavi 2 hafta süresince devam etmiştir. Mathew skalası ve Barthel indeksi kullanılarak, plasebo ve tedavi grubu karşılaştırıldığında, ilk 24 saat içerisinde ebselen tedavisine başlamanın faydalı olabileceği düşünülmüştür. Diğer bir çalışmada, nootropik bir ajan olan piracetam'ın ilk 12 saat içerisinde verilmesi ile başarılı sonuçlar elde edilmemiştir, ancak ilk 7 saat içerisinde verilmesi ile yarar sağlanabileceği düşünülmektedir (88).

Görüldüğü gibi; global serebral iskemi modellerinde; nöroprotektif etkileri belirlenen çok az farmakolojik ajan bulunmaktadır ve ilgili çalışmalar henüz pre-klinik aşamadadır. Fokal iskemi modellerinde, global iskemi modellerine göre daha fazla çalışma gerçekleştirilmiştir ve daha fazla farmakolojik ajanın nöroprotektif etkisi denenmiştir, fakat bu ajanların klinikte kullanımı yine çok kısıtlıdır. Bu çalışmada amacımız, fokal iskemi modellerine göre fazla denenmemiş olan, fakat fokal iskemi modellerine

göre uygulanması daha kolay olan, global iskemi modelini kullanarak, glutamat salınım inhibisyonunun biyokimyasal etkilerinin beyin dokusunda gösterilmesidir. Bu amaç ile; bilateral karotid arter oklüzyonu ile iskemi oluşturulmuş ancak kollaterallerden kan akımı olabileceği düşünülerek ratın kuyruk veninden bir miktar kan alınarak hipotansiyon indüklenmiş ve iskeminin daha iyi oluşması sağlanmıştır. Özellikle büyük şehirlerde, kardiyak arrest hastalarının hastaneye ulaştırılmaları zaman almakta ve hastalar ilk yarım saat içerisinde iskemik periyotta olmakta, eğer resüsitasyon başarılı ise, hastalar reperfüzyon periyoduna geçmektedirler. Ayrıca iskeminin ilk 10 dakikasında normalin 5 katı kadar artan glutamat, 20. dakikada normalin 10-15 katını bulmaktadır. Eksperimental prosedürde iskemi süresini 30 dakika tutarak, glutamat salınımının nörotoksik etkiyi oluşturabilecek düzeylere ulaşmasını ve kardiyak arrest hastalarında da böyle bir patolojinin, pre-resüsitasyon dönemindeki etkilerini araştırmayı amaçladık. Reperfüzyon periyodunun 1 saat tutulmasındaki amacımızı da şöyle özetleyebiliriz: Yapılan hayvan deneylerinde, reperfüzyonun günler hatta haftalar sonraki geç etkileri araştırılmış ve gecikmiş nöron ölümü olarak da adlandırılan apoptotik değişikliklerin, reperfüzyonun geç dönemdeki etkilerinden sorumlu olabileceği belirtilmiştir. Ancak reperfüzyonun ilk anlarındaki biyokimyasal değişikliklerin araştırıldığı çalışmalar kısıtlıdır. Bu sebeple; erken reperfüzyon dönemindeki biyokimyasal değişiklikleri araştırarak, geç reperfüzyon dönemindeki değişikliklere ne tür etkide bulunabileceklerini ortaya koymayı hedefledik.

Çalışmamızda doku nitrit düzeylerini Ohta ve ark. nın fluorometrik yöntemine göre ölçtük. Bu metodun Griess reaksiyonu ile ölçülen nitrit düzeylerine göre avantajı bulunmaktadır. Belirtilen eksitasyon ve emisyon dalga boyları nitrit için spesifik olup, pikomol düzeyinde sonuç vermektedir. Griess reaksiyonu ile nitrit düzeyleri ancak mikromolar düzeylerde ölçülebilmektedir, ayrıca fluorometrik metoda göre daha fazla numune hacmine ihtiyaç duymaktadır. Fluorometrik ölçüm ile numuneler 1/10 oranında dilüe edildiklerinde bile kesin sonuç alınmaktadır. Bilindiği gibi NO, yarı ömrü çok kısa olan bir moleküldür. Nitrit (NO_2) aerobik şartlarda NO'nun major yıkım ürünüdür ve NO_2 , nitrata (NO_3) yavaş bir

şekilde oksitlenmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, 37°C de beyin homojenatlarında nitrit inkübasyonu yapılmış ve 3 saat süresince nitritin stabil olduğu gözlenmiştir (89). Çalışmamızda; beyin dokusunun çıkartılarak, homojenizasyon ve santrifügasyon işlemleri yapılarak nitrit ölçümüne hazır hale gelmesi, 1 saatten az bir sürede, ortalama 40-50 dakika içerisinde gerçekleşmektedir ve tüm işlemler buz içerisinde yapıldığından, bulunan değerlerin nitrite ait olduğundan şüphemiz yoktur.

Nitrit düzeyleri; iskemi grubunda kontrol grubuna göre, reperfüzyon grubunda ise hem kontrol grubu hem de iskemi grubuna göre anlamlı derecede artmış bulunmuştur. Kontrol grubunda ise serebellar nitrit düzeyleri diğer dokulara göre daha fazla bulunurken, iskemi grubunda kortikal nitrit değerleri, diğer dokulara göre daha düşük bulunmuştur. Bu durum şu şekilde açıklanabilir: Endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) iskeminin oluşması ile artmaktadır. Bunun nedeni de, bu enzimlerin Ca^{+2} -Calmodulin'e bağımlı olarak aktive olmaları ve intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun iskemide artmış olmasıdır. Reperfüzyon grubunda ise, nitrit düzeyleri, iskemi grubuna göre 2-3 kat artmıştır. Reperfüzyon aşamasında, NOS enzim aktivitesinin hala korunduğu, membran hasarına bağımlı olarak intra- ve ekstraselüler iyon dengelerinin iskemik periyoda göre daha dramatik bir şekilde değişerek, intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonunun iskemik periyoda göre daha fazla bir şekilde artmış olması, nitrit seviyelerindeki artışı açıklayabilir. Ayrıca serebral iskemi sonrası reperfüzyon aşamasında gözlenen, nörotransmitter re-uptake taşıyıcılarının pertürbasyonu sonucu oluşan sekonder glutamat artışı, NO oluşumuna yol açabilir ve reperfüzyon sırasında NO_2 ve NO_3 seviyelerindeki artış bu şekilde açıklanabilir. Global iskemi ve reperfüzyonda sekonder glutamat artışının etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Kontrol grubunda, serebellar nitrit düzeylerinin diğer dokulara göre daha fazla olması, nNOS'un serebellar lokalizasyonundan kaynaklanmaktadır (90).

Fokal serebral iskemi modellerinde beyinde NO oluşumu gösterilmiştir. Daha önce, fokal serebral iskemi modelinde, nitritin iskemik kortekste, iskeminin ilk 10 dakikasında artarak maksimuma ulaştığını ve 1 saat sonunda da normal seviyelerine döndüğünü göstermiştik. NOS

aktivitesindeki bu azalma; hızlı NO oluşumunun NOS inhibisyonuna neden olabileceği, ayrıca NO'nun NOS üzerindeki SH gruplarının nitrozilasyonuna neden olarak NOS aktivitesinde inhibisyona neden olabileceği şeklinde açıklanmıştı (91,92,93).

Global serebral iskemi / reperfüzyon modellerinde, beyin NO oluşumu indikatörlerinin biyokimyasal olarak gösterildiği çalışmalar çok azdır. Fokal iskemi modellerinde, NOS inhibitorlerinin kullanılması hem iskemi hem reperfüzyon modellerinde olumlu sonuçlar vermiştir. 21-aminosteroid trilazad mesylate'in global serebral iskemi modelinde NOS inhibisyonu yaptığı ilk defa gösterilmiştir (94). Shibata ve ark tarafından global iskemide NO oluşumu gösterilmiş ve L-NAME ile NOS inhibisyonu yapılmıştır (95). İmmünohistokimyasal bir çalışmada, eNOS ve nNOS'un beyindeki lokalizasyonları belirlenmiş, siklooksijenaz inhibitörü indometazin ile iskemi öncesi tedavi ile iskemiyeye bağımlı eNOS artışı bloke edilmiştir (96). Ayrıca NOS inhibitörleri kullanılarak, biyokimyasal ve morfolojik olarak değişik beyin bölgelerinde, özellikle hippokampal CA1 bölgesindeki nöroprotektif etkiler gösterilmiştir.

Biz bu çalışmamızda, voltaj bağımlı sodyum kanallarının blokajı ile presinaptik membran stabilizasyonu ile glutamat salınımını engelleyen Lamotrigini tedavi amacıyla kullandık. Lamotrigine iskemi oluşturulmasından hemen sonra intraperitoneal olarak 20 mg/kg olacak şekilde verildi. Nitrit oluşumunda reperfüzyon grubuna göre anlamlı bir düşüş meydana gelse de, bulunan değerlerin kontrol ve iskemi grubu değerlerinin oldukça üzerinde olduğu gözlemlendi. Bilindiği gibi NOS aktivasyonu glutamaterjik reseptörlere ve hücre içi artmış Ca^{+2} konsantrasyonuna bağlıdır. Lamotrigin ile tedaviyle, iskemiyeye bağımlı glutamat salınımı inhibe edilerek, glutamaterjik reseptörlere bağımlı NOS aktivasyonu inhibe edilmiş olabilir. Ancak sadece ligand-sensitif Ca^{+2} kanallarının, diğer bir deyişle NMDA reseptörüne bağımlı intraselüler Ca^{+2} birikiminin engellenmesi, NOS veya diğer Ca^{+2} -Calmoduline bağımlı enzim aktivitelerinin inhibisyonunu tamamen sağlamamaktadır. Intraselüler Ca^{+2} artışı, voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarından, Mg^{+2} - Ca^{+2} ATPaz pompasından, Na^{+} - Ca^{+2} antiporter sisteminden devam etmektedir. Ayrıca membranda

bulunan PLC aktivasyonu ile oluşan IP_3 , Ca^{+2} 'un endoplazmik retikulumdan mobilizasyonuna, sitozolik asidoz da ATP kaybı ile birlikte Ca^{+2} 'un mitokondriden mobilizasyonuna neden olacaktır. Ayrıca reperfüzyon aşamasında eNOS aktivitesinde de artış meydana gelebilmektedir. Görüldüğü gibi, global serebral iskemi ve reperfüzyon modellerinde, sadece glutamat salınım inhibisyonu ile NO oluşumu azaltılamamakta, NOS inhibitörleri ve / veya Ca^{+2} kanal blokerleri ile kombine tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır.

Lamotrigin anti-epileptik bir ajan olduğundan, iskemi modellerinde kullanıldığı çalışmalar çok azdır. Lamotriginin post-iskemik 10 mg / kg i.v. verildiği bir çalışmada, hippokampal hücre popülasyonundaki hasarda % 50 den fazla bir azalma meydana gelmiştir (97). Diğer bir çalışmada ön beyin iskemisinden 30 dakika önce ve diğer bir gruba 30 dakika sonra Lamotrigine verilmiştir ve ratlar 7 ve 28. günlerde hem histolojik hem de davranışsal olarak incelenmişlerdir (98). Her iki grupta Lamotrigine ile tedavi ile nöron popülasyonlarının korunduğu ve tedavi alan grubun kontrol grubuna göre davranışsal olarak daha iyi sonuç verdiği gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada, 5, 10 ve 15 dakikalık BCSO yapılan gerbillerde, 21 günlük reperfüzyon sonrası Morris Water Maze hafıza testi uygulanmış ve hippokampal pyramidal hücreler incelenmiştir. 5 dakikalık BCSO, hippokampal CA1 ve CA2 nöronlarında ciddi iskemik dejenerasyona neden olurken, 100 mg / kg p.o. Lamotrigin'in hemen reperfüzyon aşamasından sonra verilmesi ile nöronlardaki bu kayıp engellenmiştir (99).

Proteinlerin metal-katalize oksidatif modifikasyonları, birçok fizyolojik ve patolojik prosesten sorumlu tutulmaktadır. Bu reaksiyonun bölgeye özgü - proteinlerin katyon bağlanma bölgesine- serbest radikal hasarı ile olduğu düşünülmektedir. Oksidasyon, amino asit yan zincirlerinde karbonil gruplarının tesbit edilmesi ile karakterizedir (100). Ratlarda, akciğer iskemi-reperfüzyon hasarında akciğer dokusu protein karbonil içeriğinin iskemi ve reperfüzyon ile arttığı gösterilmiştir (101). Diğer bir çalışmada, akciğer dokusu protein oksidasyonu 2-mercaptopropionylglycine ile tedavi sonucu, reperfüzyon grubunda %65 oranında azalmıştır (102).

Tavşanlarda oluşturulan myokardiyal iskemi ve reperfüzyon modelinde, myokard dokusu karbonil içeriğinde iskemi ve reperfüzyon ile bir artış gözlenmiş, antitrombotik ve fibrinolitik aktiviteye sahip defibrotid ile tedaviyle protein oksidasyonu azaltılmıştır (103). Ratlarda yapılan bir çalışmada, yaşlı ratların hippokampal bölgelerinde genç ratlara göre %19 oranında daha fazla protein oksidasyon ürünlerine rastlanmıştır (104). Folbergrova ve arkadaşları, ratlarda fokal serebral iskemi ve reperfüzyon modelinde, 1-3 saat arasında değişen iskemi periyodu ve 6 saate kadar süren reperfüzyon periyodu uygulamışlar ve beyin dokusunda proteinlerin oksidasyonunu gösteren bulguya rastlamamışlardır (105). Ayrıca kardiyak arest ve reperfüzyon sonrasında beyin solubl ve ribozomal protein fraksiyonlarında da proteinlerin oksidasyonu gösterilememiştir (106).

Çalışmamızda iskemi ve reperfüzyon sırasında artmış protein karbonil içeriği, iskemi sırasında demir depolarından salınan demir konsantrasyonundaki artış ve doku proteinleri oksidasyonuna, oksijenasyonun özellikle reperfüzyon aşamasında sağlanması ile neden olabileceği şeklinde açıklanabilir. Glutamat salınım inhibisyonu ile protein oksidasyonu hem reperfüzyon hem de iskemi grubuna göre anlamlı ölçüde azalmıştır. Literatürde global serebral iskemi ve reperfüzyon modelinde protein oksidasyonunun gösterildiği çalışmalar yoktur. Ayrıca glutamat salınım inhibisyonunun protein oksidasyonu üzerine olan etkisinin gösterildiği fokal veya global iskemi-reperfüzyon modelleride bulunmamaktadır.

Kan ve doku örneklerinde lipid peroksidasyonunun belirlenmesi lipid hidroperoksit içeriğinin analizi ile olmaktadır. Konjüge dienler, okside doymamış yağ asitleri olup, oksidasyon 230-235 nm de UV absorbans artışı ile karakterizedir. Diğer bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ise, TBA ile olan reaksiyonu ile karakterizedir.

İskemik beyin hasarı kompleks ve multifaktoriyel bir proses olup, enerji ihtiyacı ve karşılanması arasındaki dengeizlik temel mekanizmayı oluşturmaktadır (107).

İskemik hasarda asidoz, demir depolarından demir mobilizasyonuna neden olmaktadır. Mobilize demir ise reperfüzyon aşamasında serbest radikal bağımlı lipid peroksidasyon hasarına neden olmaktadır. Hayvanlarda gerçekleştirilen fokal ve global iskemi modellerinde değişik kimyasal ajanların lipid peroksidasyonuna olan etkileri incelenmiştir.

Post-iskemik U-101033E tedavisi, 15 dakikalık global serebral iskemi sonrası hippokampal CA1 ve kortikal nöronları lipid peroksidasyonundan korumuştur (108). Lipid peroksidasyon ve PLA₂ inhibitörü EPC-K1 in iskemi sonrası hemen verilmesi, CA1 bölgelerindeki nöron hasarını azaltmıştır fakat reperfüzyondan sonra verilmesinin hasar önleme açısından bir faydası bulunamamıştır (109).

Köpeklerde yapılan bir çalışmada in vitro lipid peroksidasyonu inhibitörü 21-aminosteroid trilazad mesylate (U 74006F), ciddi iskemi asidozuna sekonder metabolik bozukluğu erken reperfüzyon dönemde engellemiştir (110). Diğer bir lipid peroksidasyon inhibitörü U 78517F gerbillerde tek taraflı karotid arter oklüzyonu sonrası intraperitoneal verilmiş ve postiskemik kortikal nöronal nekrozu engellediği lipid peroksidasyon ürünlerindeki azalma ile gösterilmiştir (111).

Horakova ve ark. BCAA ve takiben reperfüzyon sonrası, maksimum konjüge dien ve MDA seviyelerini, reperfüzyonun 30. dakikasında artmış bulmuşlardır. Kısa süreli incomplete iskemiyeye tabi tutulan ratlarda oksijen eksikliği, hem beyin hem de kalp dokusunda çok az miktarda MDA oluşumuna neden olmuş fakat reperfüzyon aşamasında ölçülebilen MDA konsantrasyonunda bir artış belirlenmiştir (112,113).

Çalışmamızda lipid peroksidasyon ürünlerinden doku MDA ve konjüge dien düzeylerini belirledik. İskemik grupta doku lipid peroksidasyon ürünlerinin artışı, iskemi sırasında salınan serbest oksijen radikalleri ve daha çok NO oluşumu ile ilgili olabilir. Nitrit ve nitrat düzeylerindeki artış bu hipotezi desteklemektedir. Reperfüzyon grubunda ise iskemi grubuna göre lipid peroksidasyonu ürünlerinde yaklaşık 2-2.5 katlık bir artış, reoksijenasyon ile dokularda oluşan serbest radikal bağımlı hasarı

desteklemektedir. Reperfüzyon sırasında, oluşan serbest arakidonik asit radikal hasarı için uygun bir zemin oluşturmaktadır.

İskeminin, hücrenin tiyol havuzunda ve proteinlerin sülfidril grup içeriğinde belli bir düşüşe neden olduğu ve bu şartlar altında reperfüzyonun hücrenin mekanik fonksiyonlarında geri dönüşü zor bir oksidan hasara neden olacağı kesinlik kazanmıştır (114).

Tiyoller hücreyi oksidan hasara karşı koruyan önemli antioksidanlardır. Son yıllarda bu bileşiklerin NO bağlama ve biyolojik sistemlerde transport ile ilişkili yeni fizyolojik rolleri tanımlanmıştır (115)

Çalışmamızda 30 dakikalık iskemi ve 1 saatlik reperfüzyon periyodlarını takiben her üç beyin bölgesinde doku tiyol konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı düşüş meydana gelmiştir. Bu düşüş şu şekilde açıklanabilir:

Özellikle iskemi sırasında NO oluşumu tiyol kaybına neden olmaktadır. In vitro yapılan bir çalışmada NO-salan ajanlardan 3-morpholinesydnonimine (SIN-1) ve S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), N-asetil sistein, sistein ve glutatyonun sülfhidril gruplarını hızlı bir şekilde kullanmıştır. SIN-1 den nitrit salınım hızı, N-asetil sistein ve ve glutatyondan sülfidril kaybı ile paralellik göstermiştir (116). Böylece S-nitrozotiyol oluşumu ile NO'nun tiyoller ile stabilizasyonu gösterilmiştir (115). Çalışmamızda iskemi periyodunda NO indikatörlerinden nitrit ve nitratın artışı ve buna paralel olarak tiyol konsantrasyonundaki azalma bu görüşü desteklemektedir.

Reperfüzyon aşamasında da tiyol konsantrasyonundaki düşüş devam etmiştir. Peroksinitrit anyonu (ONOO^-) protein ve non-protein sülfidril gruplarının oksidasyonuna neden olan kuvvetli bir oksidandır. Özellikle reperfüzyon sırasında oluşan süperoksit radikali NO ile birleşerek ONOO^- oluşturmaktadır. Tiyolat iyonunu oksitleyen H_2O_2 'nin aksine, peroksinitrit anyonu dissosiye olmamış tiyol gruplarıyla reaksiyona girmektedir. Peroksinitröz asit ise, anyonundan daha az bir oksidan ajan olup oksidasyon hidroksil radikali ve nitrojen dioksit gibi dekompozisyon ürünleri vasıtasıyla oluşmaktadır (117).

Literatürde iskemi-reperfüzyon hasarında sülfidril konsantrasyonundaki değişikliklerin gösterildiği çalışmalar çok azdır. Myokard iskemi-reperfüzyon hasarında, myokard dokusu sülfidril grupları azalmış bulunmuştur (118). Ayrıca myokard dokusu kreatin kinaz ve pirüvat kinaz gibi enzimlerin demir bağımlı inhibisyonu, iskemi ve reperfüzyonda hücrel mikro ortamdaki redoks değişiklikleri düşük molekül ağırlıklı demirin mobilizasyonunu arttıracak ve demirdeki redoks değişiklikleri -SH grubu içeren enzimlerde yapısal modifikasyonlara neden olarak inhibisyona neden olacaktır (119).

Köpeklerde yapılan bir çalışmada myokard total -SH gruplarında, 90 dakikalık iskemi ve 5 saatlik reperfüzyon sonrası % 22 azalma olurken non-protein -SH gruplarında % 57 azalma olmuştur (120). Bindoli ve arkadaşları ratlarda myokard iskemisi sonrası myokard dokusu -SH grubu konsantrasyonunda bir değişiklik bulamamışlar ancak reperfüzyon periyodunda % 25 oranında bir azalma tesbit etmişlerdir (121). Chang ve arkadaşları, plazma total -SH grubu konsantrasyonlarını diğer antioksidanlar ve oksidan ürünlerle beraber iskemik strok hastalarında belirlemişlerdir. Total -SH grubu konsantrasyonlarında hasta ve kontrol grubu arasında herhangi bir fark gözlenmemiştir (122).

VI-REFERASLAR

- 1- White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: A theoretical perspective on membrane damage and repair **Neurology** 1993;43:1656-1665.
- 2- Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. I. Pathophysiology. **J Neurosurg** 1992; 77: 169-184
- 3- Ushijima K, Miyazaki H, Morioka T. Immunohistochemical localization of glutathione peroxidase in the brain of the rat. **Resuscitation** 1986; 13: 97-105.
- 4- Zaleska MM, Floyd RA. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron. **Neurochem Res** 1985; 10: 397-410.
- 5- Plum F, Pulsinelli W. Cerebra metabolism and Hypoxic-ischemic brain injury in **Diseases of the Nervous System Clinical Neurobiology**, edited by Asbury AK, McKhann GM, McDonald WI. 2nd edition, Volume 2, pp:1002-1015.
- 6- Hunter AJ, Green AR, Cross AJ. Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? **TIPS** 1995; 16: 123-133.
- 7- Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J Neurochem** 1984; 42(1): 1-11.
- 8- Watkins JC, Krogsgaard-Larsen P, Honore T. Structure-activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonists and competitive antagonists. **Trends Pharmacol Sci** 1990; 11(1): 25-33.
- 9- Schoepp DD, Johnson BG. Pharmacology of metabotropic glutamate receptor inhibition of cyclic AMP formation in the adult rat hippocampus. **Neurochem Int** 1993; 22(3): 277-283.
- 10- Wisden W, Seeburg PH. Mammalian ionotropic glutamate receptors. **Curr Opin Neurobiol** 1993; 3(3): 291-298.
- 11- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. **Science** 1993; 262: 689-695.

- 12- Olney JW, Ho OL, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. **Exp Brain Res** 1971; 14(1): 61-76
- 13- Olney JW, de Gubareff T. The fate of synaptic receptors in the kainate-lesioned striatum. **Brain Res** 1978; 140(2): 340-343.
- 14- McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. **Brain Res Rev** 1990; 15(1): 41-70.
- 15- Kato K, Puttfarcken PS, Lyons WE, Coyle JT. Developmental time course and ionic dependence of kainate-mediated toxicity in rat cerebellar granule cell cultures. **J Pharmacol Exp Ther** 1991; 256(1): 402-411.
- 16- Schwarcz R, Scholz D, Coyle JT. Structure-activity relations for the neurotoxicity of kainic acid derivatives and glutamate analogues. **Neuropharmacology** 1978; 17(2): 145-151.
- 17- Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ. In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neural cell bodies while sparing axons of passage. **J Comp Neurol** 1978; 180(2): 301-323.
- 18- Coyle JT. Neurotoxic action of kainic acid. **J Neurochem** 1983; 41(1): 1-11.
- 19- Schwarcz R, Brush GS, Foster AC, French ED. Seizure activity and lesions after intrahippocampal quinolic acid injection. **Exp Neurol** 1984; 84(1): 1-17.
- 20- Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ. In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neural cell bodies while sparing axons of passage. **J Comp Neurol** 1978; 180(2): 301-323.
- 21- Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J Neurosci** 1987; 7(2): 357-368.
- 22- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin JP, Bockaert J. NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurones. **Nature** 1988; 336(6194): 68-70
- 23- Lazarewicz JW, Wroblewski JT, Palmer ME, Costa E. Activation of N-methyl-D-aspartate-sensitive glutamate receptors stimulate arachidonic acid release in primary cultures of cerebellar granule cells. **Neuropharmacology** 1988; 27(7): 765-769.

- 24- Sun AY, Cheng Y, Bu Q, Oldfield F. The biochemical mechanisms of the excitotoxicity of kainic acid. Free radical formation. **Mol Chem Neuropathol** 1992; 17(1): 51-63.
- 25- Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical nitric oxide. **Ann Neurol** 1992; 32(3): 297-311.
- 26- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev** 1991; 43(2): 109-142.
- 27- Inagaki S, Suzuki K, Taniguchi N, Takagi H. Localization of Mn-superoxide dismutase (Mn-SOD) in cholinergic and somatostatin-containing neurones in the rat neostriatum. **Brain Res** 1991; 549(1): 174-177.
- 28- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature** 1993; 364(6438): 626-632.
- 29- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL, Coyle JT. Glutamate neurotoxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cysteine transport leading to oxidative stress. **Neuron** 1989; 2(6): 1547-1558.
- 30- Miyamoto M, Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT. Antioxidants protect against glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. **J Pharmacol Exp Ther** 1989; 250(3): 1132-1140.
- 31- Murphy TH, De Long MJ, Coyle JT. Enhanced NAD(P)H:quinone reductase activity prevents glutamate toxicity produced by oxidative stress. **J Neurochem** 1991; 56(3): 990-995.
- 32- Nagelhus EA, Lehmann A, Ottersen OP. Neuronal and glial handling of glutamate and glutamine during hypoosmotic stress: a biochemical and quantitative immunocytochemical analysis using rat cerebellum as a model. **Neuroscience** 1996; 72(3): 743-755.
- 33- Shupliakov O, Atwood HL, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Brodin L. Presynaptic glutamate levels in tonic and phasic motor axons correlate with properties of synaptic release. **J Neurosci** 1995; 15(11): 7168-7180.

- 34- Shupliakov O, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Brodin L. Glial and neuronal glutamine pools at glutamatergic synapses with distinct properties. **Neuroscience** 1997; 77(4): 1201-1212.
- 35- Bogdanov MB, Ramos LE, Xu Z, Beal MF. Elevated 'hydroxyl radical' generation in vivo in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. **J Neurochem** 1998; 71: 1321-1324.
- 36- Siesjö BK, Bengtsson F. Calcium fluxes, calcium antagonists and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia and spreading depression: a unifying hypothesis. **J Cereb Blood Flow Metab** 1989; 9: 127-140.
- 37- Choi DW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. **Annu Rev Neurosci** 1990; 13: 171-182.
- 38- Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87: 682-685.
- 39- Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc Natl Acad Sci USA** 1991; 88: 6868-6871.
- 40- Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86: 9030-9033.
- 41- Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87: 1620-1624.
- 42- Ogden JE, Moore PK. Inhibition of nitric oxide synthase-a potential for a novel class of therapeutic agent? **TIBTECH** 1995; 13: 70-78.
- 43- Knowles RG. Nitric oxide synthases. Keeping the cell reduced: enzymes influencing redox reactions. **Biochemical Society Transactions** 1996; 24: 875-878.
- 44- Crane BR, Arvai AS, Gachhui R, Wu C, Ghosh DK, et al. The structure of nitric oxide synthase oxygenase domain and inhibitor complexes. **Science** 1997; 278:425-431.

- 45- Farmer EH, Sutton DA. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds: V. Observations on fish-oil acids. **J Chem Soc** 1943; 24: 122-125
- 46- Gutteridge JMC, Halliwell B. The measurement and mechanisms of lipid peroxidation in biological systems. **Trends Biochem Sci** 1990; 15: 129-135.
- 47- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem** 1995; 41(12): 1819-1828.
- 48- Gutteridge JMC. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. **FEBS Lett** 1986; 20: 291-295.
- 49- Gutteridge JMC. The role of superoxide and hydroxyl radicals in phospholipid peroxidation catalysed by iron salts. **FEBS Lett** 1982; 150: 454-458
- 50- Kuehl FA, Egan RW. Prostaglandins, arachidonic acid and inflammation. **Science** 1980; 210: 978-984.
- 51- Stamler JS, Slivka A. Biological chemistry of thiols in the vasculature and in vascular-related diseases. **Nutrition Reviews** 1996; 54: 1-30.
- 52- Stamler JS. S-nitrosothiols and bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups. **Curr Top Microbiol Immunol** 1995; 196: 19-36.
- 53- Arnelle DR, Stamler JS. NO^+ , NO and NO^- donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch Biochem Biophys** 1995; 318: 279-285.
- 54- Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal catalyzed reactions. **Annu Rev Biochem** 1993; 62: 797-821.
- 55- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. **Science** 1992; 257:1220-1224.
- 56- Cole P, Harris M, Carney JM, Hall NC, Butterfield A. Methods for evaluating protein oxidation induced by ischemia/reperfusion injury. **Primer on Cerebrovascular Diseases** 1997; 57: 205-206.

- 57- Stadtman ER. Protein oxidation and aging. **Science** 1992; 257:1220-1224.
- 58- Fitton A, Goa KL. Lamotrigine: An updated of its pharmacology and therapeutic use in epilepsy. **Drugs** 1995; 50(4): 691-713
- 59- Cheung H, Kamp D, Harris E. An in vitro investigation of the action of lamotrigine on neural voltage-activated sodium channels. **Epilepsy Res** 1992; 13: 107-112
- 60- Lees G, Leach MJ. Studies on the mechanism of action of the novel anticonvulsant lamotrigine using primary neuroglial cultures from rat cortex. **Brain Res** 1993; 612: 190-199
- 61- Meldrum BS. Protection against ischemic neuronal damage by drugs acting on excitatory neurotransmission. **Cerebrovasc Brain Metab Rev** 1990; 2: 27-57.
- 62- Graham SH, Chen J, Sharp FR. Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. **J Cereb Blood Flow Metab** 1993; 13: 88-97.
- 63- Smith SE, Meldrum BS. Cerebroprotective effect of lamotrigine after focal ischemia in rats. **Stroke** 1995; 26: 117-122.
- 64- Ohta T, Arai Y, Takitani S. Fluorometric determination of nitrite with 4-hydroxycoumarine. **Anal Chem** 1986; 58: 3132-3135
- 65- Bories PN, Bories C. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. **Clin Chem** 1995; 41(6): 904-907.
- 66- Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. **Clin Chem** 1993; 39(12): 2522-2526.
- 67- Recknagel RO, Glende EA. Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. 1984; In **Methods in Enzymology**, (eds. Packer L), Academic Press, New York, vol:105, 331-337
- 68- Koster JF, Biemond P, Swaak JG. Intracellular and extracellular sulphydryl levels in rheumatoid arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**. 1986; 45: 44-46

- 69- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol** 1990; 186: 464-478.
- 70- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. **J Biol Chem** 193:265-275; 1951.
- 71- Tisherman SA, Grevnik A, Safar P. Cardiopulmonary-cerebral resuscitation: Advanced and prolonged life support with emergency cardiopulmonary bypass. **Anaesthesiol Scand** 1990; 94: 63-72.
- 72- Brain Resuscitation Clinical Trial II Study Group. A randomized clinical trial of calcium entry blocker administration to comatose survivors of cardiac arrest: Design, methods and patient characteristics. **Control Clin Trials** 1991; 12: 525-545.
- 73- Sims NR, Zaidan E. Biochemical changes associated with selective neuronal death following short-term cerebral ischemia. **Int J Biochem Cell Biol** 1995; 27: 531-550.
- 74- Takasu A, Yagi K, Ishihara S, Okada Y. Combined continuous monitoring of systemic and cerebral oxygen metabolism after cardiac arrest. **Resuscitation** 1995; 29: 189-194.
- 75- Hossmann KA. Ischemia-mediated neuronal injury. **Resuscitation** 1993; 26: 225-235.
- 76- Tremblay B. Clinical potential for the use of neuroprotective agents. A brief overview **Ann N Y Acad Sci** 1995; 765: 1-20.
- 77- Dietrich WD. Morphological manifestations of reperfusion injury in brain. **Ann N Y Acad Sci** 1994; 723: 15-24.
- 78- Karkela J, Bock E, Kaukinen S. CSF and serum brain-specific creatine kinase isoenzyme (CK-BB), neurone-specific enolase (NSE) and neural cell adhesion molecule (NCAM) as prognostic markers for hypoxic brain injury after cardiac arrest in man. **J Neurol Sci** 1993; 116: 100-109.
- 79- Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. **Ann Neurol** 1994; 36(4): 553-554.
- 80- Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. **Science** 1990; 247(4942):571-574.

- 81- Nellgard B, Wieloch T. Postischemic blockade of AMPA but not NMDA receptors mitigates neuronal damage in the rat brain following transient severe cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1992; 12(1):2-11.
- 82- Xue D, Slivka A, Buchan AM. Trilazad reduces cortical infarction after transient but not permanent focal cerebral ischemia in rats. *Stroke*. 1992;23(6):894-899.
- 83- Maruki Y, Koehler RC, Kirsch JR, Blizzard KK, Traystman RJ. Effect of the 21-aminosteroid trilazad on cerebral pH and somatosensory evoked potentials after incomplete ischemia. *Stroke* 1993; 24(5):724-730.
- 84- Kirsch JR, Helfaer MA, Haun SE, Koehler RC, Traystman RJ. Polyethylene glycol-conjugated superoxide dismutase improves recovery of postischemic hypercapnic cerebral blood flow in piglets. *Pediatr Res* 1993; 34(4): 530-537.
- 85- Kay R, Wong KS, Yu YL, Chan YW, Tsoi TH, et al. Low molecular-weight heparin for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333(24): 1588-1593.
- 86- Stys PK, Ransom BR, Waxman SG, Davis PK. Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87(11): 4212-4216
- 87- Valentino K, Newcomb R, Gadbois T, Singh T, Bowersox S, et al. A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(16):7894-7897.
- 88- Koroshetz WJ, Moscovitz MA. Emerging treatments for stroke in humans. *TIPS* 1996; 17: 227-233.
- 89- Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti RR. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 1709-1716
- 90- Matsumoto K, Lo EH, Pierce AR, Halpern EF, Newcomb R. Secondary elevation of extracellular neurotransmitter amino acids in the reperfusion phase following focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16(1): 114-124.
- 91- Balkan E, Balkan S, Özben T, Serteser M, Gümüşlü S, Oğuz N. The effects of nitric oxide synthase inhibitor, L-NAME on NO production during

focal cerebral ischemia in rats: Could L-NAME be the future treatment of sudden deafness? *Intern J Neuroscience* 1997; 89: 61-77.

92- Balkan S, Özben T, Balkan E, Oguz N, Serteser M, Gümüşlü S. Effects of lamotrigine on brain nitrite and cGMP levels during focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurol Scand* 1997; 95: 140-146

93- Gümüşlü S, Serteser M, Özben T, Balkan S, Balkan E. Inhibitory role of N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clin Chim Acta* 1997; 267: 213-223.

94- Del Pilar FRM, Belmonte A, Meisozo MJ, Garcia-Novio M, Garcia-Iglesias E. Effect of tirilazad on brain nitric oxide synthase activity during cerebral ischemia in rats. *Pharmacology* 1997; 54(2): 108-112.

95- Shibata M, Araki N, Hamada J, Sasaki T, Shimazu K, Fukuuchi Y. Brain nitrite production during global cerebral ischemia and reperfusion: an in vivo microdialysis study. *Brain Res* 1996; 734(1-2): 86-90.

96- Beasley TC, Bari F, Thore C, Thrikawala N, Louis T, Busija D. Cerebral ischemia/reperfusion increases endothelial nitric oxide synthase levels by an indomethacin-sensitive mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(1): 88-96.

97- Crumrine RC, Bergstrand K, Cooper AT, Faison WL, Cooper BR. Lamotrigine protects hippocampal CA1 neurones from ischemic damage after cardiac arrest. *Stroke* 1997; 28(11): 2230-2236.

98- Shuaib A, Mahmood RH, Wishart T, Kanthan R, Murabit MA, et al. Neuroprotective effects of lamotrigine in global ischemia in gerbils. A histological, in vivo microdialysis and behavioral study. *Brain Res* 1995; 702(1-2): 199-206.

99- Wiard RP, Dickerson MC, Beek O, Norton R, Cooper BR. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic lamotrigine in a gerbil model of global cerebral ischemia. *Stroke* 1995; 26(3): 466-472.

100- Climent I, Levine RL. Oxidation of the active site of glutamine synthase: conversion of arginine-344 to gamma-glutamyl semialdehyde. *Arch Biochem Biophys* 1991; 289(2): 371-375.

- 101- Zhao G, Ayene IS, Fisher AB. Role of iron in ischemia-reperfusion oxidative injury of rat lungs. **Am J Resp Cell Mol Biol** 1997; 16(3): 293-299.
- 102- Ayene IS, al-Mehdi AB, Fisher AB. Inhibition of lung tissue oxidation during ischemia/reperfusion by 2-mercaptopropionylglycine. **Arch Biochem Biophys** 1993; 303(2): 307-312.
- 103- Haklar G, Erşahin C, Moini H, Sungun M, Doğan N, Bilsel S, Emerk K, Yalçın AS. Involvement of free radicals in the cardioprotective effects of defibrotide. **Arzneimittelforschung** 1996; 46(4): 381-384.
- 104- Cini M, Moretti A. Studies on lipid peroxidation and protein oxidation in the aging brain. **Neurobiol Aging** 1995; 16(1): 53-57.
- 105- Folbergrova J, Kiyota Y, Pahlmark K, memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Does ischemia with reperfusion lead to oxidative damage to proteins in the brain? **J Cereb Blood Flow Metab** 1993; 13(1): 145-152.
- 106- Krause GS, DeGracia DJ, Skjaerlund JM, O'Neil BJ. Assessment of free radical-induced damage in brain proteins after ischemia and reperfusion. **Resuscitation** 1992; 23(1): 59-69.
- 107- Yasuda H, Nakajima A. Brain protection against ischemic injury by nifedipine. **Cerebrovasc Brain Metab Rev** 1993; 5(4): 264-276.
- 108- Soehle M, Heiman A, Kempinski O. Postischemic application of lipid peroxidation inhibitor U-101033E reduces neuronal damage after global cerebral ischemia in rats. **Stroke** 1998; 29(6): 1240-1246.
- 109- Block F, Kunkel M, Sontag KH. Posttreatment with EPC-K1, an inhibitor of lipid peroxidation and of phospholipase A2 activity, reduces functional deficits after global cerebral ischemia in rats. **Brain Res Bull** 1995; 36(3): 257-260.
- 110- Maruki Y, Koehler RC, Kirsch JR, Blizzard KK, Traystman RJ. Tirilazad pretreatment improves early cerebral metabolic and blood flow recovery from hyperglycemic ischemia. **J Cereb Blood Flow Metab** 1995; 15(1): 88-96.
- 111- Hall ED, Pazara KE, Braughler JM, Linseman KL, Jacobsen EJ. Nonsteroidal lazaroid U 78517F in models of focal and global ischemia. **Stroke** 1990; 21(11 suppl): 11183-11187.

- 112- Horakova L, Lukovic L, Uraz V, Stolc S. Time course of lipid peroxidation during incomplete ischemia followed by reperfusion in rat brain. *Physiol Bohemoslov* 1990; 39(6): 513-517.
- 113- Lazzarino G, Tavazzi B, Di-Pierro D, Vagnozzi R, Penco M, et al. The relevance of malondialdehyde as a biochemical index of lipid peroxidation of postischemic tissue in the rat and human beings. *Biol Trace Elem Res* 1995; 47(1-3): 165-170.
- 114- Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Ferrari R, Albertini A, et al. The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: effects of N-acetyl cysteine. *J Mol Cell Cardiol* 1988; 20(1): 5-13.
- 115- Foresti R, Clark JE, Green CJ, Motterlini R. Thiol compounds interact with nitric oxide in regulating heme oxygenase-1 induction in endothelial cells. Involvement of superoxide and peroxynitrite anions. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18411-18417.
- 116- Robak J, Gryglewski RJ. In vitro generation and decomposition of S-nitrosothiols from direct and indirect nitric oxide donors. *Pol J Pharmacol* 1995; 47(1): 63-67.
- 117- Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulphhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266(7): 4244-4250.
- 118- Haklar G, Ersahin C, Mohini H, Sungun M, Dogan N, et al. Protective effects of cilazapril against free radical injury in myocardial ischemia-reperfusion. *Pharmacol Res* 1995; 31(1): 33-36.
- 119- Korge P, Campbell KB. Iron effects on myocardial enzymes depend on redox state. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26(2): 151-162.
- 120- Lesnefsky EJ, Dauber IM, Horwitz LD. Myocardial sulfhydryl pool alterations occur during reperfusion after brief and prolonged myocardial ischemia in vivo. *Circ Res* 1991; 68(2): 605-613.
- 121- Bindoli A, Cavallini L, Rigobello MP, Coassin M, Di Lisa F. Modification of the xanthine-converting enzyme of perfused rat heart during ischemia and oxidative stress. *Free Rad Biol Med* 1988; 4(3): 163-167.

122- Chang CY, Lai YC, Cheng TJ, Lau MT, Hu ML Plasma levels of antioxidant vitamins, selenium, total sulfhydryl groups and oxidative products in ischemic-stroke patients as compared to matched controls in Taiwan. *Free Rad Res* 1998; 28(1): 15-24.

VII- ÖZET

İskemik serebrovasküler hastalıklar, gelişmiş ülkelerde üçüncü en önemli ölüm nedeni ve uzun süreli disabiliteye neden olan en önemli patolojilerdendir. Günümüzde serebral iskemiye bağımlı beyin hasarını önleyecek etkili bir tedavi metodu henüz mevcut değildir ve yapılan tüm müdahaleler semptomatik düzeyde kalmaktadır. Serebral iskemi ve reperfüzyondaki patofizyolojik mekanizmaların açığa çıkması ile, deneysel hayvan modelleri ile, insanlardaki klinik tablo benzeri kontrollü lezyonlar oluşturularak, patofizyolojik mekanizmalardaki basamaklara farmakolojik olarak müdahale edilmekte ve verilen ajanların nöroprotektif etkileri biyokimyasal veya fizyolojik olarak gösterilmektedir. Hayvanlardaki deneysel global serebral iskemi ve reperfüzyon modelleri, insanlardaki kardiorespiratuvar arrest ve kardiyopulmoner resüsitasyonu temsil etmektedir. İskemi ve reperfüzyona bağımlı hasarın oluşumunda iki hipotezin önemi büyüktür. Bunlardan birincisi; iskemi sırasında membran depolarizasyonu sonucu oluşan ekzitotoksik amino asit glutamatın salınımı, diğeri ise; reperfüzyon aşamasında oluşan serbest radikal bağımlı hasardır.

Bu çalışmada ratlarda global serebral iskemi ve reperfüzyon modeli oluşturularak beyin dokusu NO oluşumu, lipid peroksidasyonu, protein karbonil ve tiyol içeriğindeki değişiklikler biyokimyasal olarak gösterilmeye çalışılmıştır. Lamotrigine ile tedaviyle, erken reperfüzyon dönemde glutamat salınım inhibisyonunun etkileri belirlenmeye çalışılmıştır. NO indikatörlerinden NO_2 ve NO_3 , iskemi sonrasında kortikal, subkortikal ve serebellar bölgede artmış bulunmuştur. NO_2 ve NO_3 seviyelerindeki bu artış reperfüzyon aşamasında da devam etmiştir. Lamotrigine ile tedavi edilen grupta NO indikatör seviyelerinde reperfüzyon grubuna göre azalma olsa da, iskemi grubu NO indikatörlerinden yüksek bulunmuştur. Lipid peroksidasyon ürünlerinden MDA ve konjüge dienler, iskemi ve reperfüzyon grubunda, kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuşlardır. Tedavi verilen grupta ise lipid peroksidasyon ürünlerinde reperfüzyon grubuna göre bir azalma gözlenirse de, değerler kontrol ve iskemi grubunun üzerinde bulunmuştur. Protein karbonil gruplarında, kontrol grubuna göre

iskemi ve reperfüzyon grubundaki artış, tiyol konsantrasyonunda ise kontrol grubuna göre, iskemi ve reperfüzyon grubundaki azalış, doku proteinlerinin iskemi ve reperfüzyon sırasındaki oksidasyonunu desteklemiştir.

VIII- ABSTRACT

Ischemic cerebrovascular diseases are the third most common cause of death and first most common cause of long-term disability in developed countries. There isn't any clinically effective treatment of cerebral ischemia but only the symptomatic interventions are possible. After clarification of the pathophysiologic mechanisms of cerebral ischemia and reperfusion, controlled lesions, which mimic clinical and pathologic conditions in human beings, are being performed on animals. By the administration of pharmacologic agents on different steps of the pathophysiologic mechanism, the neuroprotection is being shown biochemically or physiologically.

Experimental global cerebral ischemia and reperfusion models in animals represent cardiorespiratory arrest and cardiopulmonary resuscitation in human beings. Two hypothesis are of great importance in the generation of ischemia and reperfusion damage. The first one is the release of excitotoxic glutamate as a result of membrane depolarization during ischemia and the second one is the free radical mediated damage during reperfusion. This study was designed to show the NO production, lipid peroxidation and the change in protein carbonyl and thiol content, in rats prone to global cerebral ischemia and reperfusion. By treating the animals with Lamotrigine, a glutamate release inhibitor, the effects of glutamate release has been shown in early reperfusion period. NO indicators, NO_2 and NO_3 have been shown to be increased in cortical, subcortical and cerebellar brain regions after ischemia. This increase in NO_2 and NO_3 levels persisted and continued during reperfusion. Although NO indicators were found to be decreased in Lamotrigine-treated group, they were still higher than ischemic group. Lipid peroxidation products were found to be higher in all brain regions during ischemia and reperfusion relative to controls. Increased protein carbonyl content and decreased sulphhydryl concentrations confirmed the oxidation of tissue proteins during ischemia and reperfusion.