

70000

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

**SEREBRAL İSKEMİ VE REPERFÜZYONDA L-NAME
VE STEROİDLERİN DEĞİŞEN NO DÜZEYLERİ VE
ENFARKT HACİMLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. A. SERHAT EROĞLU

Tez Danışmanı

Prof. Dr. ŞÜKRÜ AYKOL

ANKARA - 1998

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince kazandığım tüm bilgi ve becerileri borçlu olduğum kıymetli hocam Prof. Dr. Hızır Alp başta olmak üzere, Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. Necdet Çeviker, Prof. Dr. Aydın Paşaoğlu, Prof. Dr. Kemali Baykaner, Prof. Dr. Şükrü Aykol, Doç. Dr. Toygun Orbay' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında, çalışmamın başından sonuna kadar gerek fikir ve önerileriyle, gerekse sağladığı imkanlarla bana her zaman destek olan sayın hocam Prof. Dr. Şükrü Aykol' a özellikle teşekkür ederim.

Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Deniz Erbaş'a çalışmam sırasındaki önemli yardımları için teşekkür ederim.

Son olarak asistanlık yaşamım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Uzm. Dr. Fikret Doğulu, Uzm. Dr. Memduh Kaymaz ve diğer asistan arkadaşlarıma hayat boyu başarılar dilerim.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	1
KISALTMALAR	3
TABLolar VE ŞEKİLLER	5
GİRİŞ VE AMAÇLAR	6
GENEL BİLGİLER	9
NİTRİK OKSİT	9
• Tarihçesi	9
• Doğadaki Döngüsü	9
• NO Sentezi	11
• NOS Çeşitleri	12
• NO Sentez Regülasyonu	13
• NO Sentezi Üzerine Etkili Ajanlar	14
• NO'nun Hücresel Etkileri	15
• NO'nun Çeşitli Sistemlerdeki Etkileri	17
• NO'nun Santral Sinir Sistemindeki Rolü	21
SEREBRAL İSKEMİ VE REPERFÜZYON	25
• Genel Bilgiler	25
• Serbest Radikaller	27
• Glutamat ve Diğer Eksitatör Aminoasitler	30
• Glutamat-NO İlişkisi	31
• Kalsiyum	32
• Reperfüzyondaki Enzimatik Reaksiyonlar	33
STEROİDLER	35

MATERYAL VE METOD	38
• Genel Protokol	38
• Akut Fokal Serebral İskemi Modeli	39
• NO Düzeyi Ölçümü	41
• Enfarkt Alanı Tayini	41
• Enfarkt Alanının Hesaplanması	42
• İstatistik Metodlar	42
DENEY SONUÇLARI	44
• Enfarkt hacimleri	44
• Nitrit düzeyleri	44
TARTIŞMA VE SONUÇ	53
• Deneysel Metod	53
• NO Düzeyindeki Değişmeler	54
• Enfarkt Hacimleri Üzerine NO'nun Etkisi	57
• L-NAME ve Kortikosteroidlerin Etkilerinin Karşılaştırılması	60
ÖZET	62
KAYNAKLAR	63

KISALTMALAR

SAK	: Subaraknoid Kanama
NO	: Nitrik Oksit
EDRF	: Endotelial Derived Relaxing Factor
NOS	: Nitric Oxide Synthase
ENO	: Endothelial Nitric Oxide
eNOS	: Endotelial Nitric Oxide Synthase
nNOS	: Neuronal Nitric Oxide Synthase
L-NAME	: Nitro L-Arginine Methyl Ester
cNOS	: Constitutive Nitric Oxide Synthase
iNOS	: Inducible Nitric Oxide Synthase
ecNOS	: Endotelial Constitutive Nitric Oxide Synthase
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
GSH	: Redükte Glutasyon
FAD	: Flavın Adenin Dinüleotit
FMN	: Flavın Mononüleotit
BH4	: Tetrahidrobiopterin
L-LMMA	: Monomethyl-L-Arginine
L-ADMA	: Asymmetric Dimethyl-L-Arginine
L-NNA	: Nitro L-Arginine
TGF	: Tumor Growth Factor
IL-4	: İnterleucin 4
IL-8	: İnterleucin 8
EGF	: Epidermal Growth Factor
PDGF	: Platelet Derived Growrh Factor
LPS	: Lipopolisakkarid
INF alfa	: Alfa Interferon
INF gama	: Gama Interferon
İL-1	: İnterleucin 1
İL-2	: İnterleucin 2
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
cGMP	: 3' 5' Guanozin Monofosfat
HbNO	: Nitrozo Hemoglobin
MetHb	: Methemoglobin
CD 11	: Cluster of Differaniation 11
CD 18	: Cluster of Dfferaniation 18
ICAM	: Inter Cellular Adhesion Molecule
CAM	: Cellular Adhesion Molecules
NGF	: Nerve Growth Factor
NK	: Natural Killer
İF	: İnterferon
Th 1	: T Cell Helper 1
Th 2	: T Cell Helper 2
NMDA	: N-Methyl- D- Aspartat
MCA	: Midlle Cerebral Arter
CBF	: Cerebral Blood Flow
ICA	: İnternal Carotid Artery
SF	: Serum Fizyolojik

EEG	: Electroencephalography
ATP	: Adenosine Triphosphate
ROS	: Reactive Oxygen Substrates
ACTH	: Adrenocorticotrophic Hormone
cAMP	: 3' 5' Cyclic Adenosine Monophosphate
CCA	: Common Carotid Artery
ECA	: External Carotid Artery
TTC	: Triphenyl Tetrazolium Chloride Monohydrate



TABLÖLAR

Tablo I : NOS çeşitleri	12
Tablo II : NOS özellikleri	13
Tablo III: Gruplara göre deneklerin mm ³ olarak enfarkt hacimleri	48
Tablo IV: Gruplara göre deneklerin % olarak enfarkt hacimleri	49
Tablo V: Grupların mm ³ ve % olarak ortalama enfarkt hacimleri	50
Tablo VI: Grupların ortalama microM cinsinden plazma nitrit konsantrasyonları	52

ŞEKİLLER

Şekil 1 : Nitrik oksit üzerine yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı	10
Şekil 2 : NOS sentezini arttıran faktörler	15
Şekil 3 : Kawamura'nın fokal serebral iskemi modeli	40
Şekil 4 : TTC boyası ile enfarktlı alanların gösterilmesi	43
Şekil 5 : Kontrol grubuna ait beyin kesitleri	45
Şekil 6 : L-NAME grubuna ait beyin kesitleri	46
Şekil 7 : Deksametazon grubuna ait beyin kesitleri	47
Şekil 8: Gruplara göre deneklerin mm ³ olarak enfarkt hacimleri	48
Şekil 9 : Gruplara göre deneklerin % olarak enfarkt hacimleri	49
Şekil 10: Grupların % olarak ortalama enfarkt hacimleri	50
Şekil 11: Grupların mm ³ olarak ortalama enfarkt hacimleri	51
Şekil 12: Grupların plazma nitrit düzeyleri	52

GİRİŞ ve AMAÇLAR

Serebral iskemi ve reperfüzyon esnasında oluşan beyin hasarı ve bunun doğurduğu klinik sonuçlar halen Nöroşirürji ve Nöroloji kliniklerinin önemli sorunları arasında yer almaktadır. SAK (subaraknoid kanama) sonrası gelişen vazospazm, anevrizma cerrahisi sırasındaki geçici klip uygulamaları, atherotrombotik ve tromboembolik arteriyel oklüzyonlar bunlara örnek olarak verilebilir.

İskemi ve reperfüzyonda hücresel düzeyde gelişen fizyopatolojik değişiklikleri aydınlatmak üzere kalsiyum, eksitatör aminoasitler (Glutamat, Aspartat), nitrik oksit (NO) gibi bir çok madde üzerinde çalışmalar yapılmış olmakla birlikte, bunlardan NO en güncel ve bize göre bu süreçte rol alan en önemli ajanlardan biridir (1-6).

NO üzerindeki ilk çalışma 1772'de Joseph Priestly tarafından yapılmıştır. İn vivo olarak varlığı 1914 de Sir Henry Dale tarafından rapor edilmiş, Jelliffe'nin 1962 de yayınladığı makalede NO'nun aort üzerindeki gevşeme cevabını gösterilmiş ve 1987'de EDRF olarak bilinen maddenin NO olduğu ortaya çıkarılmıştır (7). Yine aynı yılda NO hakkında toplam 500 yayın bildirilmişken, daha sonraki yıllar hızla artan çalışmalar ve organizmadaki rolünün önemli olduğunun anlaşılması üzerine 1992'de NO yılın molekülü olarak seçilmiştir. 1996'da NO üzerine yapılan çalışmalar da 4500'ü bulmuştur (7, 8).

Bugün santral sinir sistemi, dolaşım sistemi (koronerler, periferik arter ve venler), solunum sistemi, ürogenital sistem, immün sistem ve bunun gibi bir çok sistemin fizyoloji ve fizyopatolojisinde NO'nun yer aldığı bilinmektedir (9, 10).

NO üzerindeki çalışmaların hızla artması ve organizmadaki rolünün öneminin anlaşılması nedeniyle serebral iskemi ve reperfüzyon fizyopatolojisinde de NO'nun önemli rol oynadığını düşündük ve bu anlamda çalışmaya değer bulduk.

Nitrik Oksit (NO) memeli dokularında yaygın olarak bulunan inorganik gaz yapısında bir mediyatördür. L-argininden Nitrik Oksit Sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenir. Sentezlendikten sonra depolanmayıp hemen difüzyon yoluyla dağılır ve çevre hücrelerde etki gösterir. Demir ve TiyoI gruplarına olan yüksek afinitesi nedeniyle çeşitli biyomoleküllere bağlanarak kan basıncı, vasküler tonus, permeabilite, nörotransmisyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda düzenleyici rol alır. NO'nun hemen hemen tüm sistemlerinde fizyolojik etkilerinin olmasının yanı sıra patolojik durumlarda aşırı miktarda yapımının hücre hasarında rol alabileceği gösterilmiştir (11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki, serebral iskemi sonrası artan intrasellüler kalsiyum, beraberinde NO düzeyinde de artışa yol açmakta ve NO düzeyi reperfüzyondan 4 saat sonra maksimuma çıkmakta ve 7 gün boyunca yüksek kalmaktadır (18, 19, 20).

Bugüne kadar yapılan çalışmalar NO'nun santral sinir sisteminde birbirine zıt iki temel etkisi olduğunu göstermiştir. eNOS enzimi aracılığıyla sentezlenen endotelial NO, serebral damarlarda vazodilatasyon yaparak serebral kan akımını arttırmak suretiyle nöroprotektif rol oynarken, nöronal NOS enzimi aracılığıyla sentezlenen nöronal NO superoksit radikali (O_2^-) ile birleşip güçlü nörotoksik etkileri olduğu bilinen peroksinitrit ($ONOO^-$) radikalini oluşturarak nörotoksik etki yaratmaktadır (12, 13, 15, 16, 17, 21, 22, 23).

İnvivo koşullarda NO'ya bağlı nöroprotektif etkilerin, nörotoksik etkilerle maskelenmesi nedeniyle, iskemi reperfüzyon sürecinde sadece nörotoksik etkileri görmektediriz. Bu anlamda güçlü nöroprotektif etkiler elde edebilmek için selektif enzim inhibitörlerine ihtiyaç vardır (24).

Bu çalışmadaki amaçlar şu şekilde sıralanabilir:

1. İskemi ve reperfüzyonda NO düzeyinde meydana gelen değişikliklerin NO düzeyi tayini ile gösterilmesi.

2. L-NAME ve steroidlerin NO sentezi üzerine olan etkilerinin NO düzeyi tayini ile karşılaştırılması.

3. Halen birçok patolojik süreçte, olumlu etkilerinden dolayı klinik kullanıma giren steroidlerin, iskemi ve reperfüzyonda değişen NO düzeyleri ve akut fokal serebral iskemi sonrası oluşan beyin hasarına olan etkilerinin gösterilmesi.

4. Nonspesifik enzim inhibisyonu yoluyla (endotelial ve nöronal) Nitrik Oksit sentezini önlediği bilinen, L-NAME'in akut fokal serebral iskemi ve reperfüzyon sonrası değişen NO düzeyleri ve gelişen enfarkt hacimleri üzerine olan etkilerinin gösterilmesi.

5. Çalışmada kullanılan L-NAME'in nonselektif enzim inhibisyonuna yol açması nedeniyle iskemi reperfüzyon sürecinde nörotoksik mi yoksa nöroprotektif etkilerinin mi hakim olduğunun belirlenmesi.

6. Serebral iskemi ve reperfüzyonda oluşan beyin hasarını önlemek veya azaltmak için uygulanacak tedavi protokolünde L-NAME veya benzeri NOS inhibitörlerinin mi yoksa steroidlerin mi uygulanmasının daha başarılı olacağının belirlenmesi.

7. Bugüne kadar yapılmış çalışmalarda, akut fokal serebral iskemi sonrası uygulanan NO sentez inhibitörleri ile elde edilen sonuçların, tek parametreyle (enfarkt hacmi) gösterilmiş olması nedeniyle, çalışmada sonuçların, hem enfarkt hacmi hem de NO düzeyi ölçümüyle gösterilmesi.

GENEL BİLGİLER

NİTRİK OKSİT

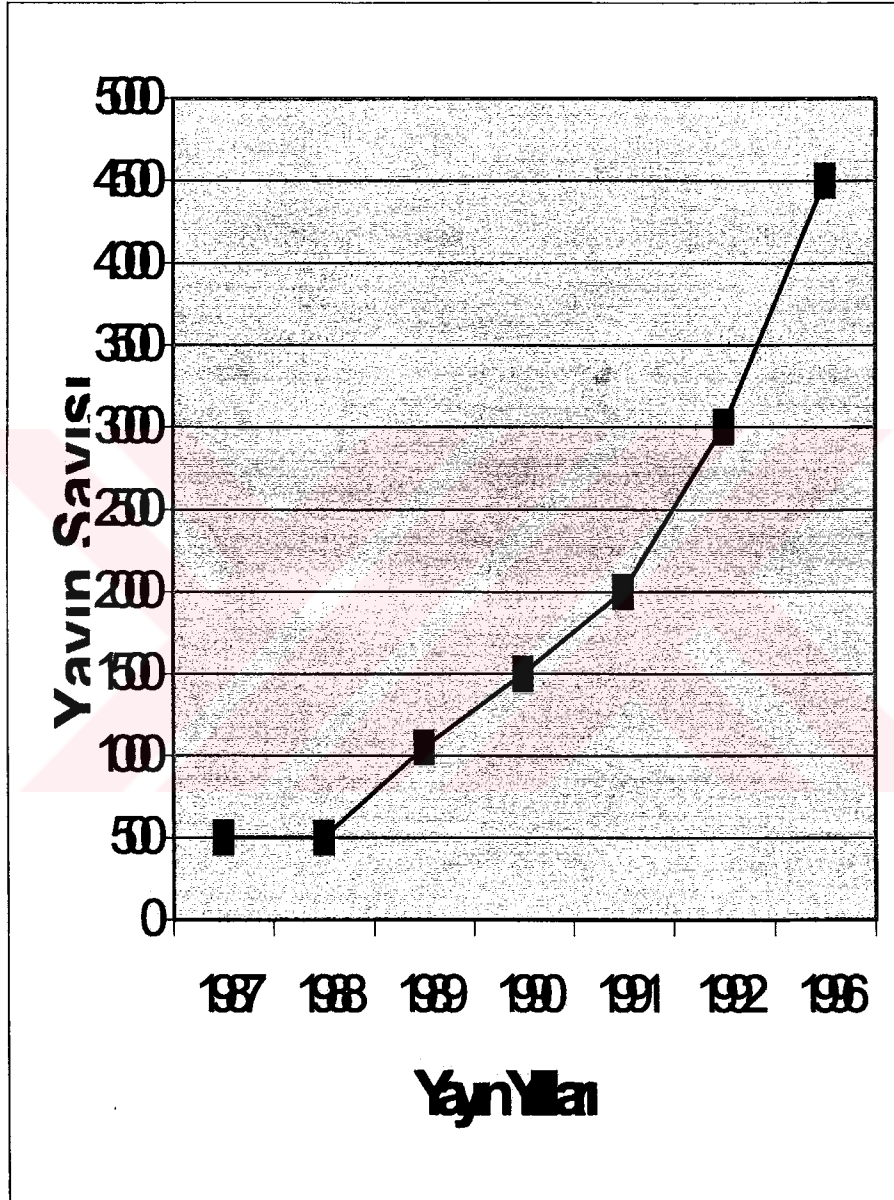
Tarihçesi

Nitrik Oksidin kimyasal özelliklerine ilişkin ilk yayın 1772’de Joseph Priestly tarafından yapılmış ve invivo olarak varlığı 1914’de Sir Henry Dale tarafından rapor edilmiştir. Araştırmacı intravenöz uyguladığı Asetilkolinin tavşan kulağında kan akımını arttırdığını gözlemiştir. Daha sonraki çalışmalar invitro olarak Asetilkolin etkisini gözlemeye yönelmiş ancak bir sonuç alınamamıştır. Çünkü damar invitro koşullarda gevşeme yerine kasılma ile cevap vermiştir. İlk kez Jelliffe’nin 1962’de yayınladığı makalede Aort’un gevşeme ile yanıt verdiği belirtilmiştir. Fuchgott çalışmalarını sürdürürken biraz da şansının yardımı ile halka şeklinde hazırladığı aort preparatında gevşeme cevabını almış ve bunun nedenini daha önce heliks şeklinde hazırladığı preparatlarda endotelyumun harabiyete uğramasına bağlamıştır. Bu nedenle endotelden kaynaklanan bir maddenin bu etkiyi yarattığını belirterek Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) adını vermiştir (7). Uzun bir süre EDRF’nin etkisini neyin oluşturduğu araştırılmış ve Nitrik Oksit ya da benzeri ürünler olduğu 1987’de ortaya çıkarılmıştır. Daha sonraki yıllar hızla artan çalışmalar ve organizmadaki rolü nedeni ile Nitrik Oksit 1992’de yılın molekülü olarak tanımlanmıştır (Şekil 1) (7, 8).

Doğadaki Döngüsü

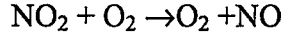
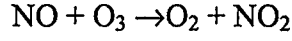
Normal havada NO konsantrasyonu, süpersonik uçak ve araba egzoz atıklarına, endüstriyel atıklara bağlı olarak artmaktadır. Örneğin saf su 1 saat süreyle şehir

süreyle şehir atmosferik havası ile muamele edildiğinde 300 nmol nitrit oluştuğu gözlenmiştir. NO'nun atmosferde geçirdiği döngü aşağıdaki gibidir.

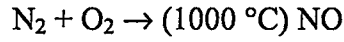


Şekil 1: Nitrik oksit üzerine yapılan çalışmaların yıllara göre dağılımı

NO Döngüsü:



Bu etki Ozon tabakası için zararlı olabilmektedir. (11) NO normal atmosferde aşağıdaki reaksiyona göre de oluşabilmektedir.



NO'nun özellikleri redoks formuna da bağlı olmaktadır.

Neutral nitric oxide $\rightarrow (\text{NO}^\cdot)$

Bir elektron kaybederek

Nitrosonium cation $\rightarrow (\text{NO}^+)$

Bir elektron alarak

Nitroksyl anion $\rightarrow (\text{NO}^-)$

Günde alınan gıda miktarına eşit oksijeni organizma kullanmakta (0.64 kg gıda ve 0.7 kg O), bunun da %1-5 kadarı superoksit radikale dönüşmektedir (25, 26).

NO Sentezi

Nitrik Oksit L-Argininden çeşitli formlardaki Nitrik Oksit Sentaz (NOS) enzimi tarafından oluşturulan, inorganik gaz yapısında bir mediyatördür. Sentezlendikten sonra depolanmayıp, çevre dokulara difüzyon yoluyla dağılır.

Nitrik Oksit, nöronlar, perivasküler sinirler ve serebrovasküler endotel tarafından sentezlendiği gibi, beyne giden inflamatuvar hücreler de NO oluşumuna katkıda bulunurlar (16, 17, 27, 28).

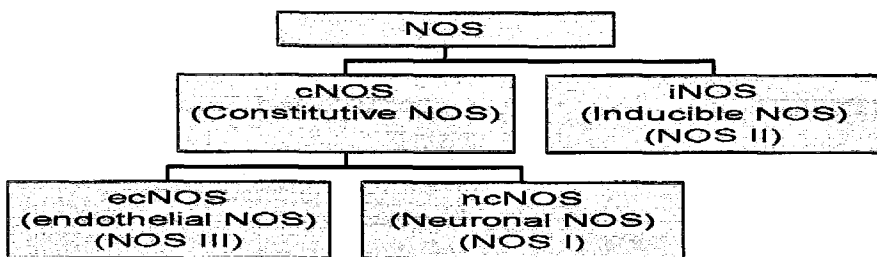
Yakın geçmişe kadar vasküler endotel hakkında yeterli bilginiz yoktu. Sadece damar duvarında bir bariyer olarak bilinen endotel organizmada en büyük organ niteliği taşımaktadır. Altı adet tenis kortuna eşit alana sahip olup, 1-1.5 kg. toplam ağırlıktadır. Vazomotor tonüsün sağlanmasının yanı sıra inflamasyon yanıtlarında homeostazisde, vasküler hücre büyümesinde önemli rollere sahiptir. Endotel fonksiyonların bozulmasıyla ateroskleroz, diabetes, hipertansiyon, immünolojik hastalıklar meydana gelmektedir. Uzun bir süre Endothelial Derived Relaxing Factor (EDRF) etkisini neyin oluşturduğu araştırılmış ve Nitrik Oksit (NO) ya da benzeri ürünler olduğu 1987’de ortaya çıkarılmıştır (7, 8, 29).

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Çeşitleri

Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Constitutive NOS (cNOS) ve Inducible NOS (iNOS: NOS II) olmak üzere iki çeşittir.

cNOS da kendi arasında Endothelial Constitutive NOS (ecNOS: NOS III) ve neuronal constitutive NOS (ncNOS: NOS I) olmak üzere ikiye ayrılır (Tablo I). Bu enzimlerde Tablo 1’de de görüldüğü üzere kofaktör olarak NADPH, GSH (Redükte Glutasyon), FAD, FMN, Tetrahidrobiopterin (BH₄), Calmoduline bulunur (Tablo II) (30, 31, 32).

Tablo I: NOS Çeşitleri



Tablo II: NOS özellikleri

Type	Cosubstrates, Cofactors	Regulated by	M of Denatured Protein (SDS-PAGE)	Present
Ia	NADPH,BH ₄ , FAD/FMN	Ca ²⁺ /calmodulin	155 kDa	Brain, cerebell., NIE-115 neuroblast. Cells
Ib	NADPH	Ca ²⁺ /calmodulin	Unknown	Endothelial cells
Ic	NADPH,BH ₄ ,FAD	Ca ²⁺ (not calmodulin)	150 kDa	Neutrophils
II	NADPH,BH ₄ ,FAD/FMN, GSH (thiols)	Unknown	125 to 135 kDa 150 kDa	Macrophages
III	NADPH,BH ₄	Ca ²⁺ /calmodulin	135 kDa	Endothelial cells
IV	NADPH	Unknown	Unknown	Macrophages

NO Sentez Regülasyonu

NO kendisi (yeni sentezlenen ya da dışarıdan verilen) negatif geri besleme etkisi sonucu NOS'a ait hem molekülü ile birleşerek NO sentezini ihhıbe eder. nNOS ve eNOS, iNOS'tan daha fazla bu geri besleme mekanizmasından etkilenmektedir. NO'nun hemdeki Fe⁺⁺⁺ formuna inhibitör etkisinin daha fazla olduğu gözlenmektedir. Tetrahidobiopterin'de (BH₄) Fe⁺⁺ formuna dönüşü gerçekleştirerek, inhibitör etkiyi sağlamaktadır (31, 32).

Nöronal ve Endotelyal form constitutive olup Ca⁺⁺ /Calmoduline bağımlıdır ve intrasellüler Ca⁺⁺ artışı ile aktive olur. İndüklenen formu ise intrasellüler Ca⁺⁺ değişikliklerinden bağımsızdır ve sitotoksik inflamatuvar yanıt oluşturan NO'yu sentezler (21, 33, 34).

NO Sentezi Üzerine Etkili Ajanlar

NO Sentezini azaltan faktörler:

NO sentezi bazı kompetitif inhibitörler tarafından inhibe edilir.

Bunlar: monomethyl-L-arginine (L-NMMA)

asymmetric dimethyl-L-arginine (L-ADMA)

nitro-L-arginine (L-NNA)

nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)

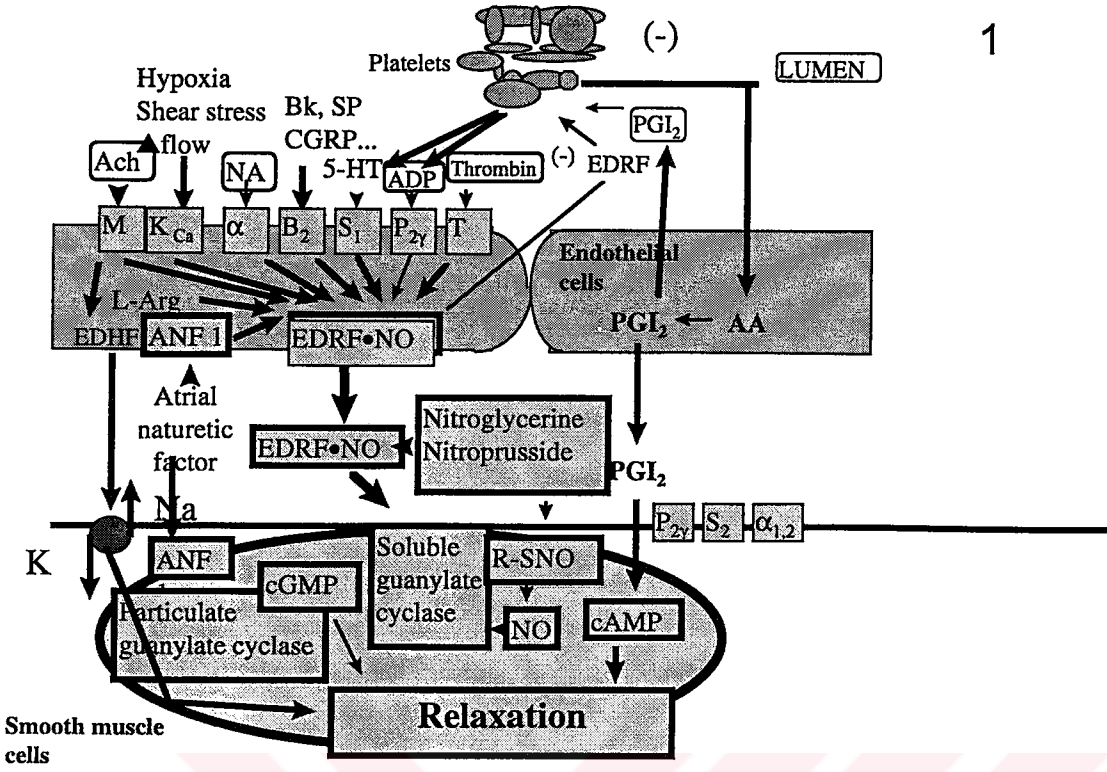
L-NAME (nitro-L-arginine methyl ester) daha çok cNOS için; L-NMMA (monomethyl-L-arginine) ise her iki NOS için inhibitördür. Yine L-NNA (nitro-L-arginine), NOS I ve III için daha etkilidir.

iNOS glukokortikoid, deksametazon, progesterone, TGF (Tumor Growth Factor) beta, IL-4 (İnterleucin 4), IL-8 (İnterleucin 8), EGF (Epidermal Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), sikloheksimid, aktinomisin D gibi maddeler tarafından inhibe edilir (31, 32, 35).

NO Sentezini Arttıran Faktörler:

Perfüzyon bozukluğu, parsiyel oksijen basıncında düşme, asetilkolin, adenosin difosfat, adenosin trifosfat, bradikinin, kalsiyum iyonofor (vasoactive substance), vazoaktif intestinal peptid, trombin, kalsitonin gene-related peptid, histamin, noradrenalin, substance P, serotonin ve insülin (Şekil 2) (32, 33).

Ayrıca iNOS, LPS, INF alfa, IFN gama, IL-1, IL-2 gibi sitokinler tarafından da uyandırılır (31, 32, 35)



Şekil 2: NOS sentezini arttıran faktörler

NO'nun Hücresel Etkileri

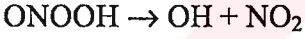
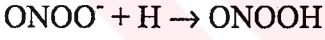
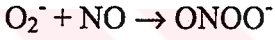
Geçici az miktarda NO salınımının hücre haberleşmesinde rolü olmasına rağmen yüksek miktarlardaki NO mitokondriyal solunumu inhibe edip, glikolizi deprese ederek ve intrasellüler glutatyon seviyesini azaltarak sitotoksositeye neden olur. Ayrıca ribonükleotid redüktaz aktivitesini azaltarak DNA sentezini inhibe eder (14). DNA nitrasyonu, oksidasyonu ve deaminasyonu ile de DNA yapısını zedeler (15). NO'nun programlı hücre ölümünde de rol aldığı gösterilmiştir. (Kondrositler, makrofajlar, mastositlerde) (16, 17).

İskemide intrasellüler Ca^{++} artışını takiben NO aktiviteleri artar. cNOS istirahat değerinden hafif yüksek Ca^{++} seviyelerinde aktive olur. 0.5 M konsantrasyonlarında maximum aktivite sağlanır (36,37).

NO guanilat siklaz'ın hem molekülüne bağlanarak cGMP artışına ve sonuçta hücre içi Ca^{++} azalışına; Ca^{++} la aktive olan K^+ kanal açılışına neden olur. K^+ hücre dışına çıkarak hiperpolarizasyon oluşur ve düz kas gevşemesi meydana gelir. cGMP'den bağımsız olarak da NO etkisini göstermekte, P53 (tümör baskılayıcı gen) gen artışına neden olarak apopitozis sonucu hücre ölümüne neden olmaktadır. Ayrıca mitokondrial hem içeren enzimlerin inaktivasyonunu sağlamakta bu yolla da tümör gelişimini önlemektedir (32, 38, 39).

Superoksit radikali O_2^- ile NO radikali reaksiyona girerek peroksinitrit

(ONOO⁻) oluşturur. Fizyolojik pH da peroksinitrit hızla hidroksil ve nitrojendioksit radikaline çevrilir (12, 13).



Peroksinitrit güçlü bir peroksidan madde olup NO'ya bağlı hücre ölümünde ana mekanizmayı oluşturur. Süperoksit dismutaz ile reaksiyona girerek sellüler proteinlerin trozinlerini nitrolize eder. Böylece disfonksiyona neden olur. Hipokside meydana gelen hücre hasarı da peroksinitritin mitokondri DNA'sı, lipitler ve proteinleri disfonksiyone etmesine bağlıdır (12, 13, 23).

Özellikle süper oksitten zengin ortamda NO intrasellüler Fe^{++} salınımına neden olur ve Haber-Weiss reaksiyonunu tetikler. Böylece reaktif oksijen türleri oluşur (Hidroksil radikali) (12).

Damar duvarında yapılan NO kana geçer, oksijen ve redükte Hb ile bağlanır. Oksijen hemoglobiniyle birleşen NO nitrat iyonuna dönüşür ve metHb oluşur. NO redükte Hb ile nitrozohemoglobin (HbNO) bileşimini de oluşturur ve bu da oksijenin fazla olduğu ortamlarda metHb ile nitrata dönüşür. NO sadece hem molekülü ile birleşmesine karşın, nitrit hemoglobinin globin bölümü ile de reaksiyona girebilmektedir (40, 41).

NOS inhibisyonu nötrofillerde CD11 a, b, c./CD 18 ekspresyonunu artırarak damar duvarına yapışmalarına neden olur. NO P-selektin yapımını ve ICAM-1'in de yüzeyde oluşumunu inhibe eder. Mikrosirkülasyon, reperfüzyonu takip eden 2.5-5 dk. içinde endotelde fonksiyon bozukluğuna ve dolayısı ile NO azalışına yol açar. NO azalışı hücresel adezyon molekülleri (CAM) özellikle P-Selektin'in reperfüzyonun 20. dakikasında oluşumuna neden olur. Bu dakikadan itibaren lökosit adezyonu başlar. 2-3 saat içinde nötrofiller damar altı dokulara infiltre olur, böylelikle 3 saatten itibaren reperfüzyon hasarı başlar. Ağırlıklı olarak da 4.5 saatte meydana çıkar. Bu nedenle reperfüzyon öncesi verilecek olan NO reperfüzyon hasarını ihhabe edecektir (9).

NO ayrıca siklooksijenaz aktivitesini de uyarır (42). Endotelin-1 Endotel üzerindeki reseptörlerini etkileyerek NO ve prostosiklin salınımını arttırdığı halde NO, endotel hücrelerinden endotelin-1 salınımını inhibe eder (43, 44, 45).

NO'nun Çeşitli Sistemlerdeki Etkileri

Genelde arter ve arterioller, ven ve venüllere göre daha fazla NO sentezler. NO aktif ve reaktif hiperemi gelişiminde etkilidir. Karotid cisimciklerinde ve damarlarında NOS enziminin varlığı gösterilmiştir (43, 44).

NO böbrek gelişiminde etkilidir. En çok makula densa'da olmak üzere proksimal tubul efferent ve afferent arteriolde bulunur. Renal kan akımı ile yakından ilişkilidir. Sistemik NO inhibisyonu afferent ve efferent arteriolde direnç artışına neden olur. NO böbrek mikrosirkülasyonunda tonik olarak vazodilatör etkilidir. Ayrıca basınç natriürezisinde fonksiyonu vardır ve tübül epiteline direkt etki ile Na reabsorbsiyonunu inhibe eder. Detrüsör kası, trigon ve üretra'da NOS tespit edilmiştir (46, 47, 48).

nNOS en yüksek foveada olmak üzere retina ve koroid tabakalarında bulunmaktadır. nNOS fotoreseptörler ve bipolar hücrelerde NO yapımından sorumludur. NO fotoreseptörlerde cGMP'yi artırır. Kedi retinasında NOS'un inhibe edilmesi fotoreseptör iletiminde azalmaya neden olmuştur. Müller hücreleri ile retinal pigment epitelindeki iNOS ise fagositozdan sorumlu olmaktadır (49, 50).

Çiğneme, tükürük ve mide asit artışı mideden NO salınımını uyarır. NO histamin salgısını inhibe ederek asit salgısını baskılar ve aynı zamanda mukozal kan akımını artırarak koruyucu bir rol oynar. Ispanak gibi nitrattan zengin gıda alınımı bu çerçevede faydalı olmaktadır. Hergün 75-150 milimol nitrat gıda ile alınmaktadır. Tükürükte ise nitrat 200-600 mikromol, nitrit ise 30-210 mikromol'dür. Midede nitrit NO'ya veya nitrat'a dönüştürülebilmektedir (51, 52).

Penis ereksiyonunda NO önemli bir role sahiptir. Serum testosteron düzeyi düştüğünde, yaşlılıkta, kastrasyonda, Tip I ve II diabette, adrenelektomide, hipofizektomide penisteki nNOS aktivitesi azalmaktadır. Sigara içiminde de NOS aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir. Sertoli ve Leydig hücrelerinde de eNOS aktivitesi androjen yapımından

sorumludur. Prostat ve seminal veziküllerdeki varlığı da sperm olgunlaşmasında rolü olduğunu düşündürmektedir (53).

Septik şokta ortama çıkan sitokinler ve LPS (Lipopolisakkarid), NO salınımını artırır. L-NMMA gibi NOS inhibitörleri şokta meydana gelen hipotansiyonu önleyici özelliğindedir.

L-arginine analjezinin artışına neden olurken, NOS inhibitörleri morfine bağlı analjezik etkiyi inhibe etmektedir. NO'nun nosisepsiyonda da rol aldığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (54, 55).

Ovaryumlarda NO, preovulator folliküllerin sürekliliğini sağlayıcı rol oynar. Myometriumda gevşetici roledir. Hamilelikte genital sistemde vardır ve doğum olayının başladığı sırada azaldığı kabul edilmektedir. NO donörlerinin verilmesi uterus kontraksiyonlarını inhibe ederek istenmeyen erken doğum gibi olguları önlemektedir. Normal myometriumdaki varlığı ise dismenoreyi önlemekte ve implantasyonu kolaylaştırmaktadır (56, 57).

Östrojen NO yapımını arttırmakta, endotelin-1 yapımını azaltmakta böylelikle damar fonksiyonlarında modüle edici rol oynamaktadır (57).

Topikal olarak NO donörlerinin uygulanışı fungal ve diğer enfeksiyonlarda önemli rol oynarken, L-arginine yara iyileşmesini hızlandırır, NK (Natural Killer) aktivitesini artırır, metastatik hücrelerin ölümüne neden olur (58).

NO dış gelişiminde ligament aralığının oluşmasında fonksiyon görür (59).

Kulaktaki tüy hücrelerinde NOS aktivitesi tesbit edilmiş ve NO artışının işitme eşiğini yükselttiği gösterilmiştir (60).

İdrarla atılan nitrit ve nitrat küçük çocuklarda yüksek iken daha sonra giderek azalmakta ve 12 yaşında sabit düzeye gelmektedir (61).

iNOS ve cNOS kemik hücrelerinde de bulunur. NO yapımının artışı osteoklastik aktivite ve osteoklast hücre azalmasına neden olmaktadır. Çok yüksek miktarları osteoblastlar için de inhibitör etkilidir. Düşük dozlarda osteoblastik aktiviteyi artırır (56, 57).

Astım ve bronşiektazi gibi solunum yolu enfeksiyonlarında, ekspirasyon havasında miktarı artar (62).

Virüs, bakteri, protozoa gibi hastalık etmenleri makrofajlar tarafından sentezlenen NO tarafından etkisizleştirilir. Çünkü NO, Fe-S bileşikleri ile reaksiyona girerek onların çoğalan hücrelerde yer alan mitokondrial enzimlerini inhibe eder. Ancak bunun yanı sıra NO diabet, graft versus host (Akut doku rejeksiyonu), romatoid artrit, lupus, multiple skleroz, ensefalomyelit gibi bazı otoimmün reaksiyonlarda da rol alır. Bu nedenle NO yapımı oldukça hassas bir kontrol altında tutulur. Örneğin Th1 hücreleri IFN gama yapar ve bu da iNOS'un NO yapımını uyarır. Th2 hücreleri ise IL-4 yapar ve bu da iNOS inhibisyonuna neden olur. Aynı zamanda NO'nun yüksek dozları Th1 hücrelerini inhibe eder (63). NO aracılı oluşan p53 tümör supressör gen artışı apoptozise neden olur ve tümör hücrelerinin de ölümünden sorumludur (64, 65).

NO'nun Santral Sinir Sistemindeki Rolü

Organizmada bütün sistemlerin fizyolojisinde ve patolojik olaylarında NO'nun rolü olmasına karşın NO belki de en önemli rolü santral sinir sistemi hücrelerinde oynamaktadır. Santral sinir sisteminde bulunan inducible NOS yanında endotelial constitutive NO (ecNOS=NOS III) ve neuronal constitutive NOS (ncNOS=NOS I) bulunmaktadır (30, 31, 32).

NOS içeren nöronlar NMDA toksisitesi, Huntington hastalığı ve iskemideki tahribata dayanıklıdır (66, 67). Bu nöronlar serebral korteks, corpus striatum ve hipokampustaki tüm nöronların %1-2'sini oluşturur. Oldukça fazla dallanırlar ve fazla miktarda NO oluşturdıklarından çevre nöronların ölümüne neden olurlar (27, 28). Bunun dışında beyne gelen inflamatuvar hücrelerde, NO oluşumuna katkıda bulunurlar. İskemide intrasellüler Ca^{++} artışına takiben constitutive NOS aktivitesi artar. Constitutive NOS istirahat değerinden hafif yüksek Ca^{++} seviyelerinde aktive olur ve 0.5 M konsantrasyonlarında ise maximum aktivite sağlanır. Bu nedenle iskemide maximum aktiviteye ulaşılır (36, 37). Bu hipotezden yola çıkılarak çalışmalarda orta serebral arter oklüzyonu ile birlikte NO seviyesinin hızla yükseldiği gösterilmiştir. Bu artışta indüklenen NOS (iNOS) aktivitesinin etkisi yoktur. Çünkü NO artışı oklüzyondan hemen sonra iNOS indüksiyonundan çok öncedir (18, 19).

Nöronal NO sentaz (nNOS) miktarlarındaki artışın kalıcı orta serebral arter oklüzyonunu takiben 4 saatte maximuma ulaştığı ve 7 gün boyunca yüksek kaldığı tespit edilmiştir (20).

Ancak constitutive NOS (neuronal ve endothelial) aktivitesi, iskemi başlangıcındaki aktivasyondan hemen sonra azalmaktadır (68). Geç ama kalıcı NO artışı ise iskemi sonrası 24-

72 saatte ortaya çıkar ve inflamatuvar hücreler ile mikroglia da indüklenen iNOS tarafından gerçekleştirilmektedir (69, 70).

NO'nun serebral iskemideki rolü halen tartışmalıdır. Zira yapılan çalışmalar hem nöroprotektif ve hem de nörotoksik etkileri olduğunu desteklemektedir (71).

NO'nun Nörotoksik Etkileri:

Bilindiği üzere NO'nun süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit güçlü bir peroksidan madde olup, sellüler proteinlerin trozinlerini nitrolize eder. Bu yolla DNA lipid ve proteinlerde disfonksiyona yol açar. Ayrıca ribonükleotid redüktaz aktivitesini azaltarak DNA sentezini inhibe eder. DNA nitrasyonu, oksidasyonu ve deaminasyonu ile de DNA yapısını zedeler ve DNA fragmentasyonuna neden olur (12-17).

Yine superoksitten zengin bir ortamda NO intrasellüler demir salınımına neden olur ve Haber-Weiss reaksiyonunu tetikler, böylece reaktif oksijen türleri oluşur (12).

NO'nun nörotoksik etkilerini göstermek üzere çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Nöronal NOS geni delesyona uğratılmış mutant fareler kullanılmıştır. Bu fareler normal beyin anatomi ve mikrovasküler yapısına, normal kan basıncına ve fizyolojik parametrelere sahiptirler. Bu farelerde MCA oklüzyonu sonrası oluşan enfarkt hacmi 57 ± 5 mm iken eşit koşullardaki kontrol grubunda enfarkt hacmi 93 ± 2 mm bulunmuştur. Daha sonra mutant farelere var olan tek NOS çeşidi olan endotelial NOS aktivitesini inhibe etmek üzere L-NNA (Nitro-L-Arginine) uygulanmasının enfarkt hacmini arttırdığı gözlenmiştir. L-Argininin uygulanması ise eNOS sentezini artırarak enfarkt hacmini daha da küçültmüştür. Bu çalışma, nöronal NOS aktivitesinin beyinde olmamasının, nöronal hasarı azalttığını göstermiştir (24).

NO'nun nörotoksik etkilerinin bir bölümünden de NMDA reseptörleri aktivasyonu yoluyla oluşan hücre toksitesinde NO'nun da rol alması sorumlu tutulabilir. L-NAME ile oluşturulan NOS inhibisyonunun NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşturulan enfarkt hacmini %35 oranında azaltması bu görüşü desteklemektedir (66, 67, 71, 72, 73).

NO'nun Nöroprotektif Etkileri

Nöronlar, perivasküler sinirler, serebrovasküler endotelin iskemi esnasında NO oluşturduğu bilinmektedir (74, 75). Hemen iskemiye takip eden dönemde endotelden veya perivasküler sinirlerden salınan NO kan akımını arttırarak, koruyucu rol oynamaktadır. Nitekim L-arginine infüzyonunun NO'nun aracılık ettiği mekanizmalarla iskemik ve normal beyinlerde, serebral kan akımını arttırdığı, pial damarlarda genişlemeye neden olduğu, böylece enfarkt alanını azalttığı gözlenmiştir (74, 75, 76). Kan akımının artışının yanı sıra endotelial NO trombosit agregasyonu ve lökosit adezyonunu azaltarak mikrovasküler sirkülasyonu düzenlediği görülmüştür. (77, 78). Nitekim endotelial NOS geni delesyona uğratılmış mutant farelerde, diğer tüm hemodinamik ve anatomik faktörlerin farklılık göstermemesine rağmen yapılan MCA oklüzyonu sonrası oluşan enfarkt hacimlerinin kontrol grubuna göre daha büyük olduğu gözlenmiştir. Bu farelere L-Arginine infüzyonu nöronal NO sentezini arttırdığı için toksisiteyi arttırmış ve enfarkt hacminin büyümesine neden olmuştur (79).

Diğer bir çalışmada deneysel olarak derin hipotermik kardiyak arrest sonrası serebral metabolik düzelmede serebral NO'nun etkisi araştırılmış ve NOS'un L-NAME ile inhibisyonunun kardiyopulmoner by-pass esnasında serebrovasküler rezistansı arttırdığı CBF'ü düşürdüğü ve serebral yüksek enerjili fosfat bileşikler, pH ve sitokrom aa₃ ün

kardiyak arrest sonrası düzelmesini belirgin olarak azaltmıştır. Hayvanlara L-Arginine verilmesi ise tam tersi etkiler yaratmıştır. Sonuç olarak klinik şartlara yakın hipotermik global serebral iskemi modelinde L-NAME'in net olarak zararlı etkileri, L-Arginine'in ise olumlu etkileri gösterilmiştir. (80).

Serebral vazospazmda NO'nun rolünün araştırıldığı bir başka çalışma da NO'nun SAK esnasında tüketilmesinin vazospazma yol açtığı bildirilmiştir (81). SAK sonrası eritrositlerin lizise uğraması sonucu oluşan oksihemoglobin kuvvetli vazospazmojendir. SAK sonrası oluşan bu oksihemoglobinin NO'ya afinitesi yüksektir ve damar duvarındaki NO'yu tüketir. Bilindiği üzere NO damar düz kas hücrelerindeki cGMP düzeyini artırarak vazodilatasyon yapar. Bu noktadan hareketle NO'nun harcanmasının vazospazma neden olacağı düşünülmüş ve bir grup farede deneysel olarak vazospazm yaratılmış; vazospazmlı farelerde İCA'den SF (Serum Fizyolojik) eşliğinde verilen NO'nun vazospazmı anjiyografik olarak çözdüğü ve dopplerle ölçülen kan akımını artırdığı gözlenmiştir. Bu bulguda NO'nun endotelial formunun serebral kan akımını artırıcı yönde hareket ettiğini düşündürür (81).

Bütün bunlardan çıkan sonuç, nöronal NO güçlü bir peroksidan olan peroksinitrite dönüşmek suretiyle nörotoksik rol oynarken, endothelial NO lokal kan akımını artırarak nöroprotektif rol oynamaktadır (12-17, 74-76, 79-81).

Sonuçta invivo koşullarda nöroprotektif etkilerin nörotoksik etkiler tarafından baskılanması nedeniyle NO'nun invivo net etkisi nörotoksikite yönündedir (24, 71).

SEREBRAL İSKEMİ VE REPERFÜZYON

Genel Bilgiler

Beyin oksijen ve kan akımıyla enerji gereksinimi arasında hassas bir denge vardır. Beyin dinlenme halinde vücudun kullandığı oksijenin %20'sini tüketir: Enerji metabolizmasının hemen hemen tamamı glukoz metabolizması tarafından karşılanır. Oksijen ve glukoz rezervi bulunmayan beyin dokusunun, fonksiyonlarının devamı ve parankimasının fizyolojik koşullarda bütünlüğünün korunması için kalp dakika atım hacminin yaklaşık %15'i oranında kan akımına gereksinim vardır. Beyinde glukoz ve glikojen şeklinde depolanan enerji kaynakları beyin gereksinimini yaklaşık 1 dakika süreyle karşılamaya yeterlidir. İskemiye izleyen birkaç dakika içinde nörolojik fonksiyonlar bozulmakla birlikte başlangıçta bu bozukluklar kalıcı değildir (82).

Dinlenme halinde insan beyni her 100 gr. doku için dakikada 3.35 ml. oksijen tüketir. Bu oksijen kaynağının kesilmesi halinde, hasta 10 saniye içinde bilincini yitirir, 20 saniyede EEG izoelektrik hale gelir, 5 dakika içinde beyindeki tüm yüksek enerjili fosfat depoları tükenir ve geri dönüşü olmayan hasar yani hücre ölümü meydana gelir (82, 83).

Nöronlar yüksek enerji metabolizmasına sahip hücrelerdir ve bu enerjinin %50'si membranlardan iyon transportu için kullanılır. Hangi amaçla kullanılırsa kullanılsın, nöronların kullandığı bu enerji ATP'den sağlanır. Bu ATP büyük oranda mitokondride geçen oksidatif fosforilasyonla, az oranda sitoplazmik glikoliz ile sağlanır. Beyin dokusunun oksijen depoları iskemi anında yalnızca bir kaç saniyelik süre için yeterlidir. ATP kaynağı olarak fosfokreatinin ilk 1 dakika içinde, depolanmış ATP ise 2 dakika içinde minimal düzeye iner: Bundan sonra nöron ATP düzeyi aneorobik glukoliz ile sağlanmaya çalışılır. Bu aşamada laktik asit birikimi ortaya çıkar. Asidoz ise serbest radikal reaksiyonlarını güçlendirir ve

nöronlardaki mitokondriyal solunumu ve mitokondrilerin iskemi sırasında hücre içine giren kalsiyum iyonunu içlerinde depolama işlevini inhibe eder. Sonuç olarak iyon dengesinin sürdürülebilmesi ve nöronların biyoelektrik uyarılması için enerji ön koşuldur (82).

Kalsiyum iyonları iyon dengesinin düzenlenmesinde çok önemli rol oynarlar. İskemik nöronlarda ölümü başlatıcı faktör ATP yokluğudur. ATP yokluğu hücre membranında ve hücre içi organel membranlarında iyon transportunun bozulmasına neden olur. İskeminin başlangıcında ekstrasellüler K^+ iyonu artmaya başlar ve nöron içine Na^+ iyonu akışı başlar. Bu aşamada K^+ hücre dışına; Na^+ , Ca^{++} ve Cl^- hücre içine girerler. Membran geçirgenliğindeki bu ani artışın presinaptik membranlardan salınan glutamat'ın etkisiyle olduğu düşünülmektedir. Glutamat salınımına bağlı olan depolarizasyon aynı zamanda voltaja bağımlı Ca^{++} kanallarını da açmakta ve global etki sonucu hücre içine kontrolsüz bir Ca^{++} , Na^+ ve Cl^- girişi olmaktadır (82).

Nöronal membranda iyon dengesinin bozulması sonucu ortaya çıkan intrasellüler Ca^{++} artışı hücrede lipolizis ve proteolizise yol açmakta, ayrıca protein fibrilasyonu bozulmaktadır. Ca^{++} varlığında aktive olan fosfolipaz A ve C enzimleri arakidonik asit oluşumuna yol açarlar. Arakidonik asitten prostoglandin ve lökotrienlerin sentezi başlar. Bu sentez sırasında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri membran lipidlerinin peroksidasyonunu başlatarak, hücre ve organel membranlarının bütünlüğünü bozarlar. Ayrıca lipid peroksitler prostoglandin sentezinin iki önemli son ürününden biri olan prostosiklin sentezini inhibe ederler (82, 83, 84).

Serbest Radikaller

Bir atom ya da molekülün yapısında yer alan elektronlar daima nükleus etrafında her bir yörüngede çift sayıda dizilim gösterme eğilimindedirler. En dış yörüngede tek sayılı elektron içeren atom ya da moleküllere serbest radikal adı verilir: Serbest radikal reaksiyonları normal biyolojik olaylarda geniş bir spektrum içinde yer alır ve bir çok hücresel enzim ve elektron transport sistemi, katalitik fonksiyon doğrultusunda ara ürün olarak sınırlı miktarda serbest radikaller oluşturur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller, biyolojik korunma mekanizmaları ile ortamdan uzaklaştırılır. Ancak bazı patolojik süreçlerde reaksiyonların ara kademelerinde serbest radikallerin aşırı miktarda üretilmesi ve/veya biyolojik koruyucu sistemlerin çalışmaması gibi durumlarda istenmeyen etkilere yol açarlar (85).

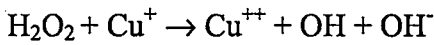
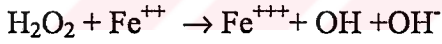
Serbest radikaller molekülün yapısına göre oksijen merkezli (superoksit radikali, peroksit radikali, hidroksil radikali vb.), karbon merkezli (karbon tetraklorür, triklorometil, aromatik hidrokarbonlar) veya sülfür merkezli (glutatyon radikali) olarak gruplandırılabilir (86).

Oluşan serbest radikaller hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler komponente de geçer ve uzak etkiler oluşturur. Burada serbest radikalin çözünürlüğü ile difüzyon hızı önem kazanmaktadır. Oksijen merkezli serbest radikaller incelendiğinde hidroksil radikali çok potent olmasına rağmen difüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak olduğu yerde veya yakınında etki gösterir. Buna karşın H_2O_2 çok az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilirler (85, 86, 87).

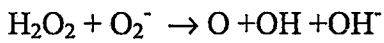
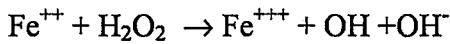
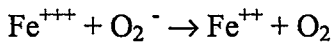
Günümüzde serbest oksijen radikalleri terimi yerine, daha kapsamlı olan ve hem süperoksit, hidroksil gibi oksijen içeren radikallere hem de aslında radikal olmayan, ancak reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen peroksit, singlet oksijen, O₃ hipoklorik asit gibi molekülleri içine alan reaktif oksijen ürünleri (ROS) terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır (88).

Reaktif oksijen ürünleri, termodinamik stabiliteyi kazanmak için yakında bulunan diğer moleküllerden elektron ya da H⁺ atomlarının serbestleştirmeye çalışır ve bu molekülleri aktif radikal haline getirir (89).

Süperoksit radikali en çabuk ve en kolay oluşan radikaldir. Aktivitesi kısmen düşük olduğu halde diğer radikalleri oluşturduğu için önemlidir. Hidroksil radikali bu grupta en potent serbest radikaldir ve oluşması için ortamda demir veya bakır gibi transizyonel metallerin varlığı gereklidir. Transizyonel bir metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar Fenton reaksiyonları olarak bilinir:

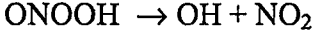
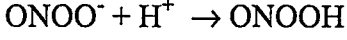
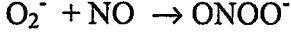


Bir transizyonel metalin varlığında süperoksit radikali hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek hidroksil radikalini oluşturur. Buna Haber-Weiss reaksiyonu denir.



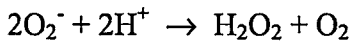
Hidroksil radikali hücre içinde bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. Diğer serbest radikaller gibi DNA'yı, lipitleri, karbonhidratları ve proteinleri zedeleyebilir (89).

Süperoksit radikali ile NO⁻ radikali reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur. Fizyolojik pH'da peroksinitrit hızla hidroksil ve nitrojen dioksit radikaline çevrilir.



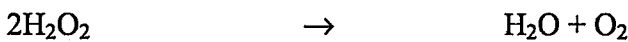
Peroksinitrit güçlü bir prooksidan madde olup süperoksit dismutaz ile reaksiyona girerek sellüler proteinlerin tirozinlerini nitrozile eder. Böylece disfonksiyona neden olur (12, 13).

Aerobik metabolizma sırasında hücreler mitokondrial enzim sitokrom c oksidaz ile moleküler oksijeni suya indirgeyerek enerji elde ederler. Bu reaksiyon sırasında dört elektron oksijene direkt aktarılır. Çok az miktarda süperoksit, hidrojenperoksit ve hidroksil radikali oluşabilir (90). Hücrelerin oldukça zararlı olan serbest radikallere karşı savunma mekanizmaları vardır. Süperoksit dismutaz enzimi bunlardan biridir ve süperoksiti hidrojen peroksite indirger.

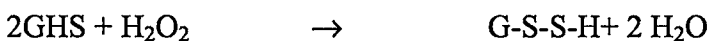


Hidrojen peroksit ise peroksizomlarda katalaz, mitokondri ve sitoplazmada ise glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene indirgenir. Okside olan glutatyon ise glutatyon redüktaz ile glutatyona çevrilir (91).

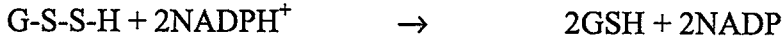
Katalaz



Glutatyon Peroksidaz



Glutasyon Redüktaz



İkincil savunma mekanizması ise hücrelerin transizyonel metalleri taşıyıcı ya da depolamada kullanılan proteinlere sıkıca bağlanmasıdır. Üçüncü yol ise dengeli serbest radikal oluşturmaktır. Bu da α -tokoferol (vitamin E) gibi maddeler sayesinde gerçekleştirilir (91, 92).

İskemide oksijen yeterli seviyede değildir. İç mitokondrial membranın elektron transfer zinciri oksijen eksikliği nedeni ile aşırı indirgenmiş hale gelir. Ayrıca artan enerji ihtiyacı yüzünden mitokondride solunum ihtiyacı artar ve hızla serbest radikaller oluşur. İskemi sırasında artan Ca^{++} mitokondriden artmış hidroksil radikali oluşumuna neden olur (90).

Eksitatoksisite (Eksitatör aminoasitlere maruz kalım sonucu gelişen nörotoksisite) de mitokondriden serbest radikal oluşumunu artırır. İlk olarak depolarizasyon ATP ihtiyacını artırır ve oksijenin sınırlı olduğu ortamda mitokondrial solunum hızlanır. İkinci olarak hücre içi Ca^{++} artışına neden olarak mitokondri üzerinde yükü artırır. Böylece artan reaktif oksijen türleri mitokondri DNA'sı, lipidleri ve proteinlerini zedeleyebilirler (23).

Glutamat ve Diğer Eksitatör aminoasitler

İlk olarak 1969 yılında Olney ve Sharp eksitatör amino asit glutamatın nöronlara toksik olabileceğini öne sürerek eksitatoksisite kavramını tanımlamışlardır (1). Artık in-vivo ve in-vitro yapılan deneyler sonucu, fazla miktarlarda eksitatör amino asit ve analoglarının nörodejenerasyona neden olduğu iyi bilinmektedir (2, 3). Serebral iskemi sırasında glutamat

ve aspartat ekstrasellüler seviyelerinin yüksek bulunması iskemi sırasında eksitatoksisitenin önemli olabileceğini düşündürmüştür. Bunu takip eden çalışmalarda ise N-metil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA tip glutamat reseptör antagonistlerinin enfarkt hacmini azalttıkları saptanmıştır. Böylece eksitatoksisitenin serebral iskemide rolü olabileceği tespit edilmiştir (93, 94).

Eksitator aminoasitler ve bunların analogları, NMDA ve non-NMDA reseptörlerini aktive ederek hücre içine sodyum, klorür iyonları ile su girmesi ile hızlı şişmeye neden olmaktadır (2). Gecikmiş hücre ölümü ise NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ve buna bağlı ortaya çıkan Ca^{++} boşalması ile olmaktadır (95). Glutamata kısa fakat yoğun maruz kalınması NMDA reseptörlerine bağlı mekanizmaları ile gecikmiş hücre ölümüne neden olur (71).

Glutamat ve NO İlişkisi

L-NAME ile yapılan NOS inhibisyonunun NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşturulan enfarkt hacmini %35 oranında azalttığı gözlenmiştir. Bu noktadan hareketle NO'nun NMDA reseptör aktivasyonu sonucu oluşan nörotoksisitede aracı mediyatör olduğu düşünülmüştür (71, 93, 94). Nöronal NOS'u olmayan mutant farelerin NMDA toksisitesine daha dayanıklı olmasında bu görüşü desteklemektedir (72, 73).

Gelişen bir beyinde glutamat toksisitesinin önemli olduğunu gösteren ipuçları vardır. Fetal kuzu asfiksisi ve neonatal rat modeli asfikside oluşan fokal serebral iskemi de ekstrasellüler glutamat ve aspartatın striatum ve korteksde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca hipoksik iskemik hasardan sonra görülen nöropatolojik tablo glutamat uygulanması sonrası görülen hasarla aynı olduğu bildirilmiştir. NMDA reseptör antagonisti olan MK801'in ratta iskemik hasarı önlediği bilinmektedir (71, 93, 94).

Gelişim esnasında glutamat nörotoksitesi ve NO sentezi korelasyon göstermektedir. Glutamat reseptörlerinin her alt tipi kendine has gelişimsel nörotoksositeye neden olur. Gelişimle birlikte beyinin değişik bölgelerinin glutamata olan hassasiyeti ve buna paralel olarak da beyinin NOS miktarı değişir. Rat serebrumunda partiküler NOS postnatal ilk haftada artar ve daha sonra düşmeye başlar. Erişkin dönemde tespit edilemeyecek kadar azalır (71, 94).

Bu görüşlere tam zıt olarak NO'nun NMDA'ya bağlı toksisiteyi, NMDA reseptörlerinin tiol gruplarının S nitrolizasyonuna yol açarak NMDA reseptörlerinin duyarlılığını azaltmak suretiyle önlediği bildirilmiştir (80).

Kalsiyum

İskemi ve reperfüzyon esnasında Ca^{++} un önemli rol oynadığı bilinmektedir. İskemi intrasellüler Ca^{++} da hızlı artışa ve ekstrasellüler Ca^{++} da azalmaya neden olur (36, 96). NMDA reseptör iyon kanalları ve voltaja bağlı Ca^{++} kanalları bu artışa neden olur. İskemik depolarizasyon ise bu kanalları aktive eder (97, 98). İskemi ile çalışmaz hale gelen sodyum potasyum pompası hücre içinde sodyum birikmesine neden olur. Sodyum/kalsiyum pompası ise artan hücre içi sodyumu dışarı atarken kalsiyumu içeri alır. Bu da hücre içi kalsiyum artışına katkıda bulunur ki bu da iskemiye maruz kalan nöronlarda önemlidir. Buna karşın kalsiyum artışının büyük bölümünün hücre içi depolardan kaynaklandığı bilinmektedir ve bunu bloke eden ilaçların deneysel çalışmalarda enfarkt alanını azalttığı gösterilmiştir. Hücreler normal koşullarda hücre içinde artan kalsiyumu dışarı atarak tolere edebilmektedirler. Ancak iskemik süreçte enerji yetersiz olduğu için enerjiye bağlı pompalar bu görevi yerine getiremezler ve artan kalsiyum seviyesi lipazları, proteazları, endonükleazları aktive ederek ve serbest radikal oluşumunu arttırarak toksisiteye neden olmaktadır. Bu

anlamda hücre içi kalsiyum birikimini önleyecek ajanların iskemi reperfüzyon sürecinde faydalı olacağı düşünülebilir (99, 100).

Serbest radikal üretimi ise kalsiyum tamponlamasını engelleyerek kısır döngüye neden olur. Yine hücre içi kalsiyum artışı mitokondriyel hasara ve bu da enerji üretiminin daha da azalmasına neden olur (93).

Reperfüzyonda Enzimatik Reaksiyonlar

İskemi sırasında beyinde adenin nükleotidlerinin nükleositler ve pürin bazlarına dönüştüğü bilinmektedir. Adenozin ve hipoksantin seviyeleri hızla yükselir. Resirkülasyon ile ksantin oksidaz enzimi hipoksantini ksantine, sonra da üreye çevirir. Bu enzimin hızının reperfüzyonda arttığı bilinmektedir. Ksantin oksidaz enzimi hipoksantini ksantine dönüştürürken moleküler oksijen kullanır ve süperoksit radikali ortaya çıkmasına neden olur. Aynı süreçte iskemi sırasında biriken arakidonik asit, prostoglandinler, tromboksanlar ve superoksitlerin oluşumuna neden olur (90).

Reperfüzyon esnasında superoksit radikalının etkileri ile beyinde ferritin ve transferrin halinde bulunan demir serbestleşmekte ve katalitik etkisi ile hidroksil radikali oluşmaktadır. Bu radikal de hücre hasarına yukarıda anlatılan mekanizmalarla yol açmaktadır.

İskemi ve reperfüzyonla ortaya çıkan serbest radikallerin kan beyin bariyerini bozarak ödeme yol açtığı, kan akımını bozduğu ve beyaz kürelerin iskemik dokuya geçmesini sağladığı gözlenmiştir (101). Aktive lökositlerin reperfüzyonda serebral kapilleri tıkayarak dolaşımı bozduğu gösterilmiştir (13). Hess ve arkadaşları ise reperfüzyonda endotelial hücrelerde adezyon molekülü yapımının arttığını görmüş, artan lökosit adezyonu ile lökositlerin etrafa salgıladıkları sitokinler aracılığı ile de hücre hasarına neden olabileceklerini göstermişlerdir (102).

Bu nedenle endotelyal bölgelerin serbest radikal hasarından en çok etkilenen bölge olduğu düşünülmektedir. Serbest radikal tutucuları ile lipid peroksidasyon inhibitörleri iskemi ve reperfüzyon sırasında koruyucu olabilirler. Superoksit dismutaz üretimi fazla olan farelerin iskemi ve reperfüzyona daha dayanıklı olmaları ve bu farelerde yapılan akut fokal serebral iskemi-reperfüzyon modelinde enfarkt alanlarının daha küçük olması bu görüşü desteklemektedir (103).

Süperoksit dismutaz üretimi olmayan farelerde ise enfarkt hacmi beklendiği üzere kontrol gruplarına göre daha büyük saptanmıştır (104).



STEROİDLER

Kortikosteroidler, adrenal korteks tarafından salgılanan steroid yapılı kortizol ve aldosteron gibi hormonlardır ve bunların sentez suretiyle yapılan aynı yapıdaki analoglarıdır. Kortikosteroidlerden sadece adrenal korteksde sentez edilenler ve fonksiyonel önemi olanlar glukokortikoidler ve mineralokortikoidlerdir. Doğal glukokortikoidler kortizol (hidrokortizon), kortizon, kortikosteron ve 11-dehidrokortikosterondur. Bunlardan güçlü etkinliği olan ve insanda en fazla salınan kortizondur. Farelerde en önemli doğal glukokortikoid kortikosterondur. Glukokortikoidler glukoz metabolizmasını önemli ölçüde etkiledikleri için bu adı almışlardır. Kortikosteroidlerin adrenal bezden ilk izole edildikleri yıllarda bunların ayırıcı etkilerinin ölçüsü olarak adrenalectomili farelerin kalan ömürlerini arttırmaları ve karaciğerde glikojen depolama özellikleri esas alınmıştır. Birinci etkinlik mineralokortikoid etkinin bir ölçüsü, ikinci etkinlik ise glukokortikoid etkinin ölçüsü olarak kabul edilmiştir. Daha sonra antiinflamatuvar etkinin karaciğerde glikojen depolamaları ile orantılı bir şekilde oluştuğu ve aynı tür etkinliğin ayrılmaz parçası olduğu anlaşılmıştır (105, 106, 107).

Adrenal korteksten glukokortikoid hormon sentezi ve saliverilmesi hipofiz ön lobundan salgılanan ACTH tarafından kontrol edilir. ACTH kolesterolün pregnanole dönüşmesini arttırmak suretiyle bütün kortikosteroidlerin sentezini artırır. Korteksde ACTH'ın steroidojenezi arttırmasında muhtemelen adenilat-siklaz-cAMP sistemi aracılık eder. Bu olayda prostoglandinlerin modölatör rol oynadığı gösterilmiştir. (105, 108, 109)

Kortikosteroidler başlıca karaciğerde metabolize edilmek suretiyle inaktive edilirler.

Sentetik kortikosteroidler Meksika'da yetişen dioscorea türü bir bitkiden elde edilen diosgenin adlı steroidi kullanmak suretiyle elde edilmektedir. Bu sentetik steroidleri elde

etmenin amacı doğal steroidlerden farklı olarak bu tür ilaçların önemli yan etkisi olan su ve tuz tutucu etkilerini minimuma indirmektir.(105)

Glukokortikoidlerin diabetojenik, antiinflamatuvar, immünosupresif etkilerinin yanı sıra santral sinir sistemi üzerinde de bir takım etkileri vardır. Glukokortikoidler öfori, iştah artması, uykusuzluk, huzursuzluk, motor etkinliklerde artma oluşturlar. Adrenal korteks yetmezliğinde, beyinin uyarılabilirliği azalır. Bu ise nöronların hücre içi-dışı Na^+-K^+ oranlarının bozulmasına bağlıdır. Adrenal korteksin gerek yetmezliği gerekse aşırı fonksiyonu halinde insanda EEG bozulur. Her iki durumda da normal alfa ritmine karşı yavaş bir elektriksel etkinlik ortaya çıkar. Yetmezlik halinde beyinde epilepsi eşiği düşer (108, 110).

Kafa travması, SAK ve iskemi sonrası steroidlerin etki mekanizması gözden geçirilmiş, serbest oksijen radikallerini azalttığı, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği düşünülmüştür (111).

Steroidler önemli ölçüde (%40-60) plazma proteinlerine bağlanır ki bu fraksiyon hücre membranından ve kan beyin bariyerinden geçemez. Bu nedenle kandaki protein miktarının düşmesine neden olan karaciğer ve böbrek hastalıkları kandaki serbest steroid hormon konsantrasyonunu artmasına neden olur. (112).

1960 lı yıllardan beri steroidlerin serebral iskemi üzerindeki etkileri araştırılmış ve yapılan bir çalışmada gerbillerde 3 saatlik iskemi ve reperfüzyon sonrası metilprednizolon, iskemiden 10 dakika önce ve iskemiden hemen sonra verilmiştir. Bu çalışmada metil prednizolon 60mg/kg dozunda kullanılmış ve bu dozun üzerinde ve altındaki değerlerde başarı elde edilememiştir. Bu çalışmanın sonunda steroidlerin reperfüzyon sonrası nörolojik düzelmeyi ciddi olarak arttırdığı gözlenmiştir (113).

Yine gerbillerde yapılan iskemi sonrası steroid uygulamasının 30 mg/kg dozunda ve iskemiden 30 dakika önce verilmesinin daha etkili olduğu görölmüştür. Özellikle etkinin Na-K-ATP az ve cAMP üzerinden olduğu gösterilmiştir (114, 115).

Buna zıt olarak yakın tarihte yapılan çalışmalarda gerbillerde bilateral karotid oklüzyonundan 30 dakika önce ve 2 saat sonra 60 mg/kg dozunda metilprednizolon intraperitoneal verildiğinde 7. günün sonunda hipokampal nöronların kaybının ciddi olarak arttığı görölmüştür. Daha sonraki çalışmalar da global serebral iskemi modellerinde glukokortikoidlerin selektif duyarlı nöronlarında zararlı olduğu anlaşılmıştır. Bu etkilerden kısmen glukokortikoidlerin serum glukoz düzeyini arttırmaları sonucu gelişen laktik asidoz sorumlu tutulmuştur (116, 117).

MATERYAL - METOD

GENEL PROTOKOL

Çalışmada denek olarak ağırlıkları 200-250 gr. arasında olan 30 adet SPRAGUE-DAWLEY türü rat kullanıldı. Hayvanlar Ketamin (Ketalar, Parke-Davis) 50 mg/kg ve Xylasine (Rompun, Bayer) 8 mg/kg enjeksiyonla uyutuldu. Deney esnasında hayvanlar spontan solunumlarına bırakıldı. Deneyin sonucuna kadar geçen 24 saat içerisinde hayvanlara su ve besin kısıtlaması yapılmadı. Hayvanlar randomize olarak 10'ardan üç gruba ayrıldı. Çalışmanın hem iskemi hem reperfüzyon gerektirmesi nedeni ile akut fokal serebral iskemi modeli olarak Kawamura'nın tarif ettiği geçici iskemi modeli uygulandı (118).

I. gruba (kontrol grubu) akut fokal serebral iskemi, 2 saat sonra reperfüzyon ve 24 saat sonra kraniyektomi ile beyinlerinin çıkarılması dışında işlem yapılmadı.

II. gruba akut fokal serebral iskemi sonrası oluşturulan reperfüzyondan 5 dakika önce 3mg/kg dozunda L-Nitro-Metil Arginine Esteri (L-NAME) intra peritoneal verildi. 24 saat sonra kraniyektomi ile beyinleri çıkarıldı.

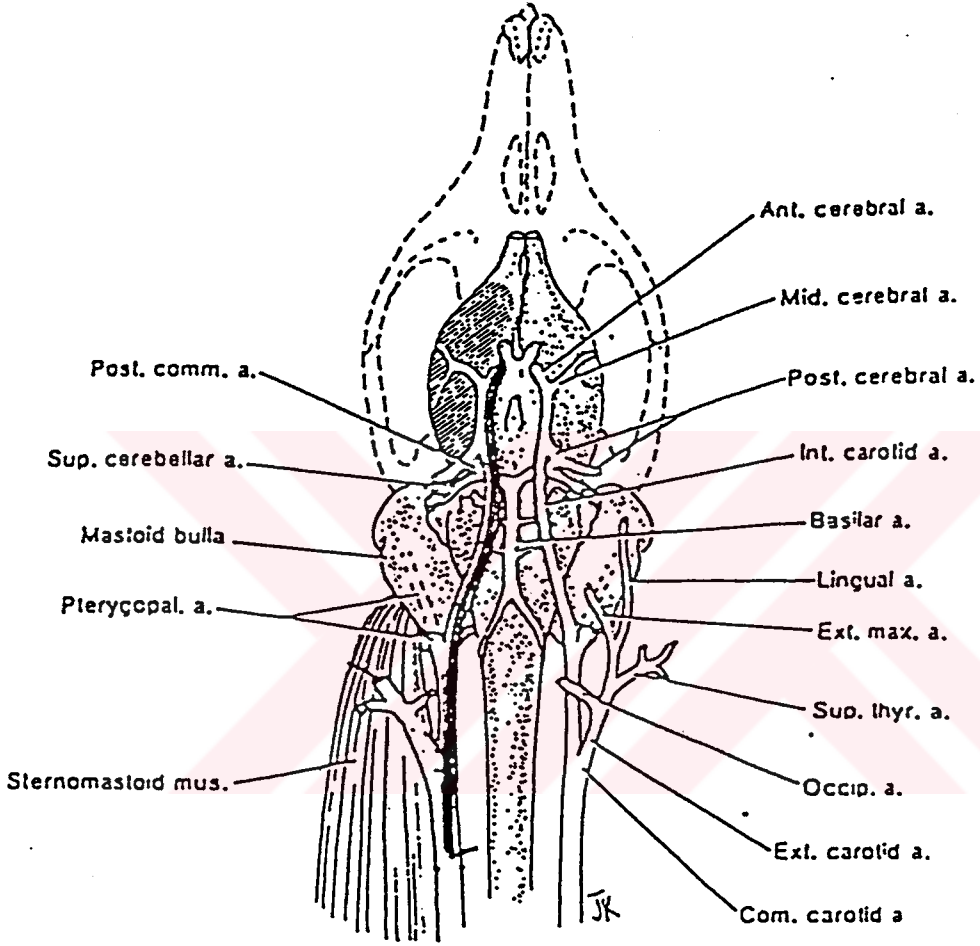
III. gruba akut fokal serebral iskemi sonrası oluşturulan reperfüzyondan 5 dakika önce 2 mg/kg dozunda Dekametazon İ.P. verildi. 24 saat sonra kraniyektomi ile beyinleri çıkarıldı.

Hayvanlardan NO düzeyi tayin edilmek üzere, uyuduktan sonra iskemi yaratılmadan hemen önce femoral venden 1 er cc kan alınarak bazal NO düzeyi, reperfüzyondan 4 saat sonra 1 cc daha alınarak reperfüzyon sonrası NO düzeyleri saptandı. Reperfüzyondan 24 saat sonra kraniyektomi ile beyinler çıkarılarak enfarkt hacimleri ölçüldü.

AKUT FOKAL SEREBRAL İSKEMİ MODELİ

Çalışmada akut fokal serebral iskemi modeli olarak Kawamura'nın ratlarda geçici fokal serebral iskemi yaratmak üzere tanımladığı intraluminal filaman yöntemi kullanıldı (118).

Supin pozisyonda boyuna yapılan orta hat insizyon sonrası paratrakeal kasların disseksiyonu ile karotid bifurkasyon CCA, İCA, ECA ekspozite edildi. Daha sonra İCA'nın tek ekstrakranial dalı olan pterigopalatin arter bulundu ve koagüle edildi. ECA 0.5 mm distalden 5-0 ipek sütür ile bağlandı. Arteria karotis kommunisin 2 mm proksimaline ve internal karotid arter üzerine birer adet mikrovasküler geçici klip kondu. Bifurkasyonun proksimaline araknoid bıçağı ile küçük bir insizyon yapıldı. Nylon Fileman, 5-0 prolene ipliğin ucu alevde küntleştirilip 4 mm'lik uç kısmı Japon yapıştırıcı ile kalınlaştırılarak açılan insizyondan damar içine sokuldu. İCA'daki mikrovasküler klip kaldırılıp Filaman İCA bifurkasyonundaki direnç hissedilinceye kadar yaklaşık 13-15 mm ilerletildi. Böylece İCA bifurkasyon oblitere edilerek MCA sahasının kanlanması önlendi (Şekil 3). İki saatlik iskemi sonrasında hayvanlar eter ile kısa süreli uyutularak boyun insizyonundan açılarak ip geri çekilip CCA üzerindeki mikrovasküler klip kaldırılarak reperfüzyon sağlandı.



Şekil 3: Kawamura'nın fokal serebral iskemi modeli

NO DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ

Dokularda sentezlenen NO enzimatik olarak hızla nitrit ve nitrata dönüştüğü için NO düzeyi direkt olarak ölçülememektedir. Sentezlenen NO miktarı ile serum nitrit düzeyinin direkt korelasyon göstermesi nedeniyle de, NO düzeyinin tayini için serum nitrit veya idrar nitrat düzeylerine bakılmaktadır (119).

Serum örneklerinde nitrit konsantrasyonları nitrit iyonlarına duyarlı olan Griess reaksiyonu temeline dayanan diazotizasyon yöntemiyle indirekt olarak ölçülmüştür. (119). Standart olarak kullanılacak sodyum nitritin distile suda çözeltileri (0.25-10 ml) hazırlanmıştır.

Bu çözeltilerden alınan 100 µl (0.1 cc) örnek, 50 µl (0.05 cc) Griess A ve 50µl Griess B reaktifi ile düz tabanlı 96 kuyucuklu kültür plağında karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekleyen örneklerin verdikleri absorbanslar, kültür plağı okuyucuda, 620'nin referans filtreye karşı 550 nm'de okunmuştur. Sodyum nitrit miktarlarına karşı elde edilen absorbanslardan yararlanılarak doğrusal regresyon yöntemi ile sodyum nitritin kalibrasyon doğru denklemi belirlenmiştir. Bu denklemlerden yararlanılarak serum örneklerinden okunan absorbans değerlerinden nitrit miktarları bulunmuştur. (119)

ENFARKT ALANI TAYİNİ

İskemi oluşturulduktan 24 saat sonra genel anestezi altında hızlı kraniektomi sonrası çıkarılan beyinler buzlu SF içinde 5 dakika bekletildi. Frontal polden başlayan 2 mm kalınlığında beş kesit alındı. Ve bu kesitler %2'lik 2, 3, 5 Trifeniltetrazoliumklorit monohidrat (TTC) solusyonunda oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. TTC boyaması yaşayan mitokondriler tarafından alınıp indirgeme esasına dayandığı için (mitokondriyal solunum

zincirinde dehidrogenazlar tarafından indirgenir) hızla çıkarılan beyin kesitlerinde enfarktlı doku normal beyinden ayırt edilebilir (Şekil 4).

Normal beyin TTC tutup koyu kırmızı renge boyanması, enfarktlı alanda tutulum görülmemesi ile enfarktlı alan gösterildi (Şekil 4). Kesitler daha sonra %10'luk formaldehit içinde saklandı (120).

ENFARKT ALANININ HESAPLANMASI

Çıkarılan beyinlerin hacmi su deplasmanı yöntemiyle ölçüldü. Enfarkt yüzeyleri ise yüzde olarak 5 kat büyütülmüş görüntüler üzerine konan milimetrik kağıtlar ile ölçüldü. Daha sonra koni hacmi hesabı ilkesine dayanarak enfarkt hacimleri mm^3 ve yüzde olarak hesaplandı (101).

İSTATİSTİK METODLAR

Denek sayıları 10'dan küçük olduğu için gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis varyans analizi ile saptanmıştır. Daha sonra fark yaratan grubun tesbiti Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $P < 0.05$ olarak alınmıştır.



Şekil 4: TTC boyası ile enfarktlı alanların gösterilmesi

DENEY SONUÇLARI

ENFARKT HACİMLERİ

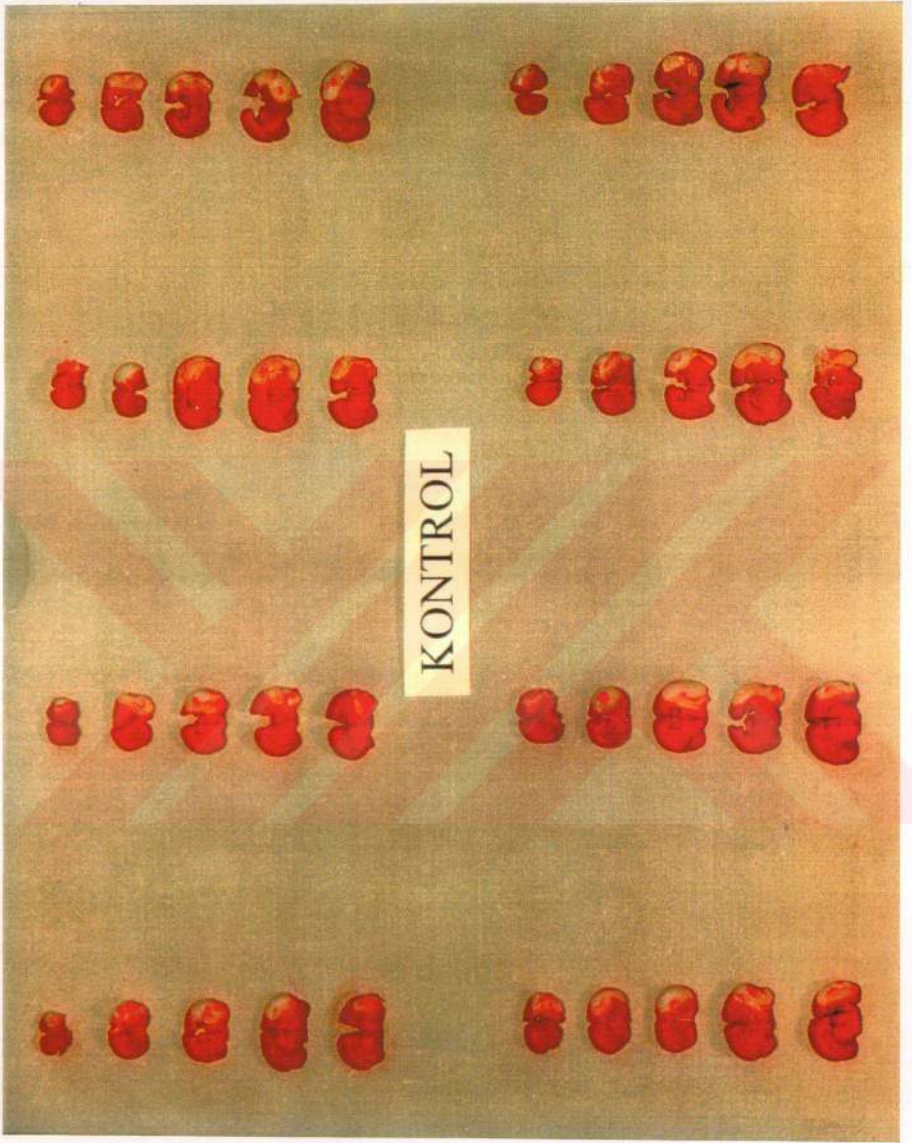
L-NAME grubunun ortalama enfarkt hacminin diğ er iki gruptan anlamlı olarak daha düşük oldu ğ u, diğ er iki grup arasında ise anlamlı bir farklılık olmadığı göz lenmiştir.

Gruplara göre deneklerin mm^3 olarak enfarkt hacimleri, tablo 2 ve şek il 8 de, % olarak enfarkt hacimleri, tablo 3 ve şek il 9 da, grupların ortalama enfarkt hacimleri tablo 4 ve şek il 10 ve 11 de gösterilmiştir.

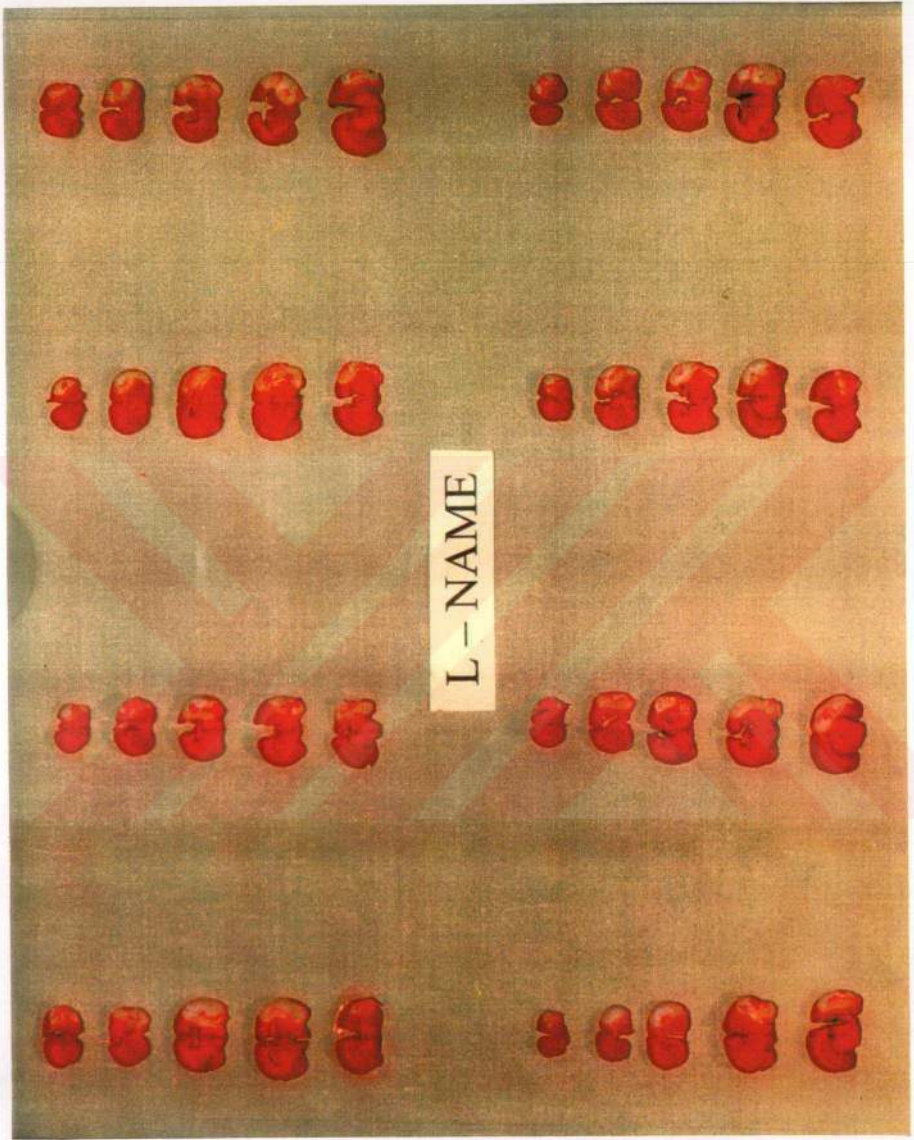
NİTRİT DÜZEYLERİ

Grupların bazal ve reperfüzyon sonrası karşı laştırılan plazma nitrit düzeylerinde de L-NAME grubunda diğ er iki gruba göre anlamlı bir azalma ortaya çı kmış ken, steroidli grupta kontrol grubuna göre plazma nitrit düzeyleri düşük saptanmıştır.

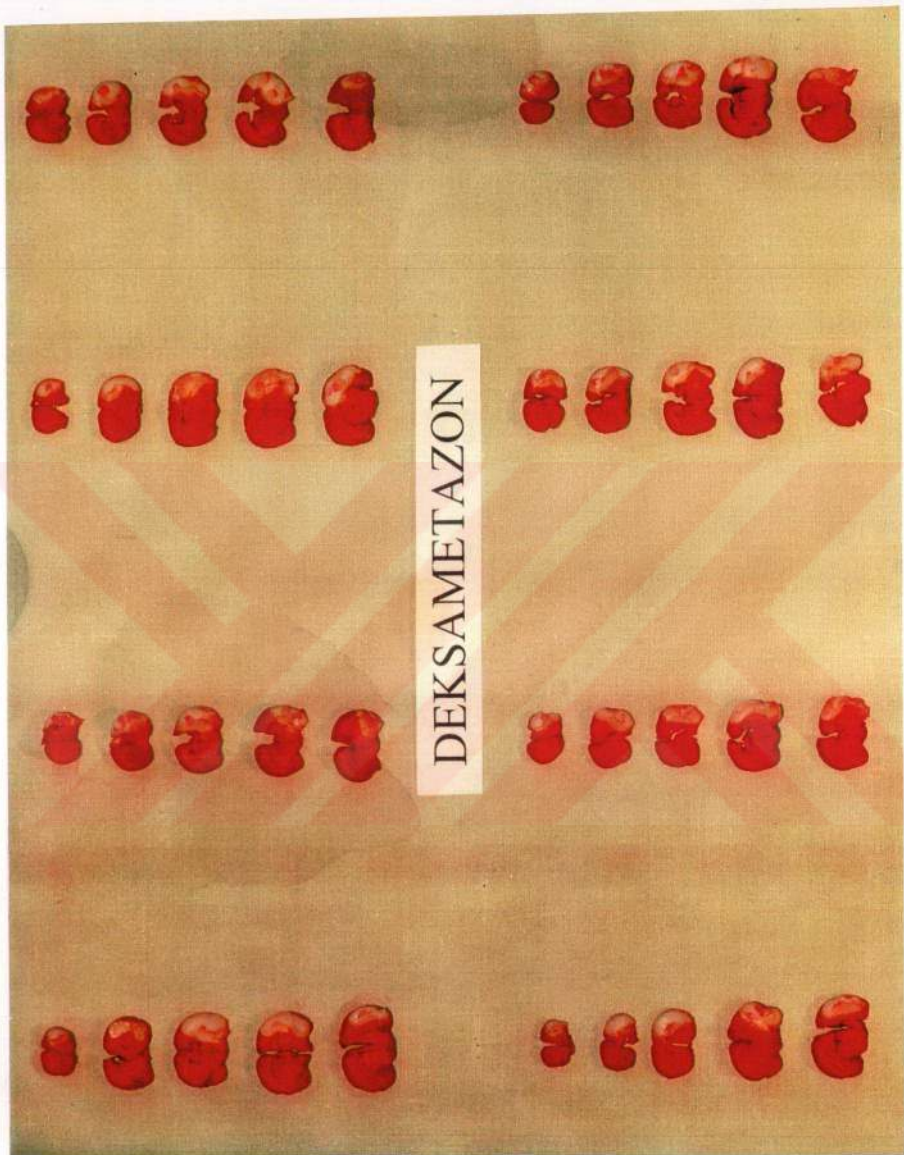
Grupların ortalama nitrit düzeyleri tablo 5 ve şek il 12 de gösterilmiştir.



Şekil 5: Kontrol grubuna ait kesitler



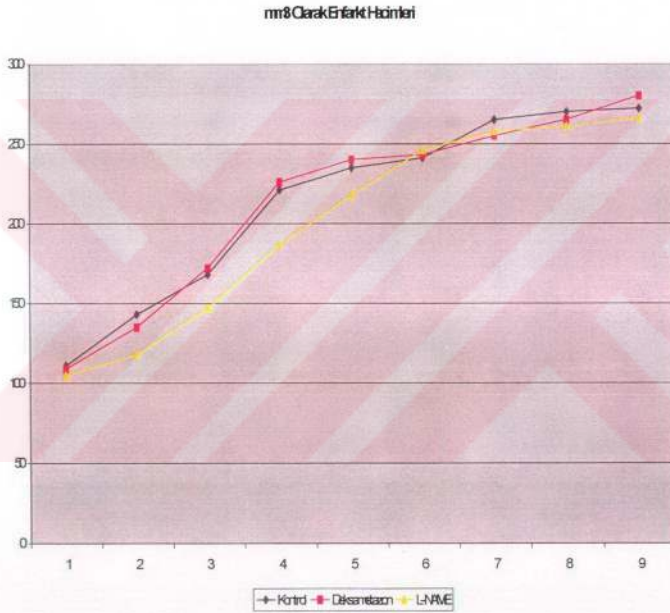
Şekil 6: L-NAME grubuna ait kesitler



Şekil 7: Deksametazon grubuna ait kesitler

Tablo III: Gruplara göre deneklerin mm³ olarak enfarkt hacimleri

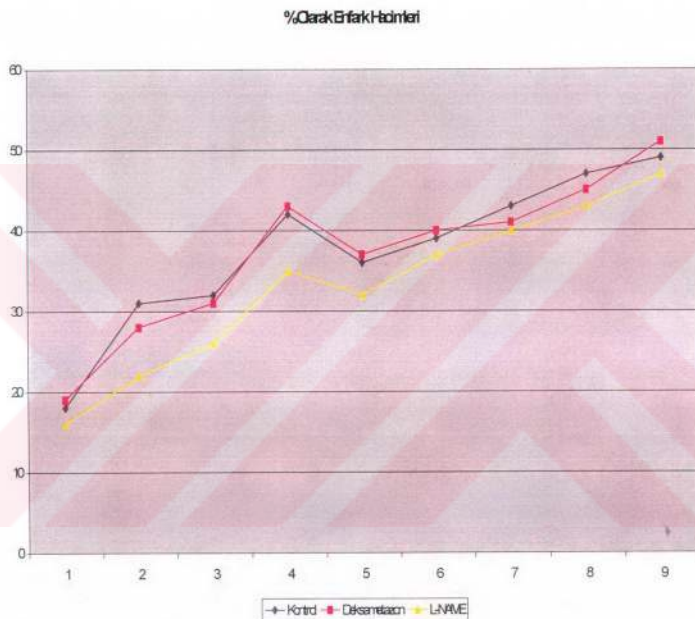
Kontrol	111	143	168	221	235	241	265	270	272
Deksametazon	109	135	172	226	240	243	255	265	280
L-NAME	105	118	147	187	218	246	258	261	266



Şekil 8: Gruplara göre deneklerin mm³ olarak enfarkt hacimleri

Tablo IV: Gruplara göre deneklerin % olarak enfarkt hacimleri

Kontrol	18	31	32	42	36	39	43	47	49
Deksametazon	19	28	31	43	37	40	41	45	51
L-NAME	16	22	26	35	32	37	40	43	47

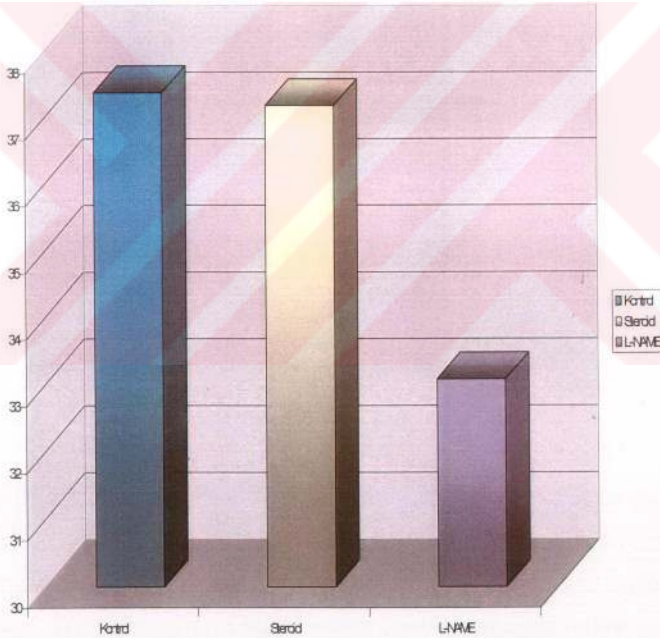


Şekil 9: Gruplara göre deneklerin % olarak enfarkt hacimleri

Tablo V: Grupların mm^3 ve % olarak ortalama enfarkt hacimleri

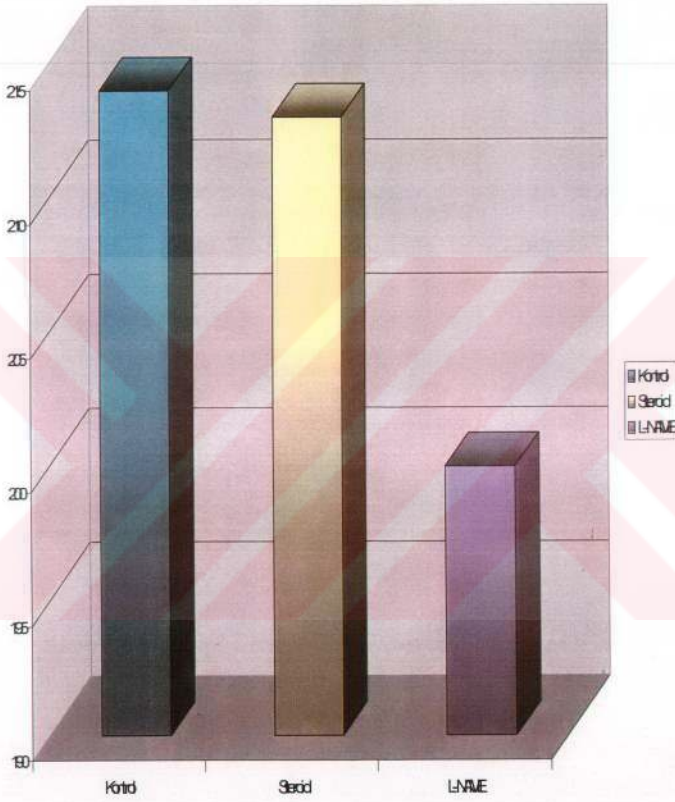
	Kontrol	Steroid	L-NAME
Mm^3	214	213	200
%	37,4	37,2	33,1

%Ortalama Enfarkt Hacimleri



Şekil 10: Grupların % olarak ortalama enfarkt hacimleri

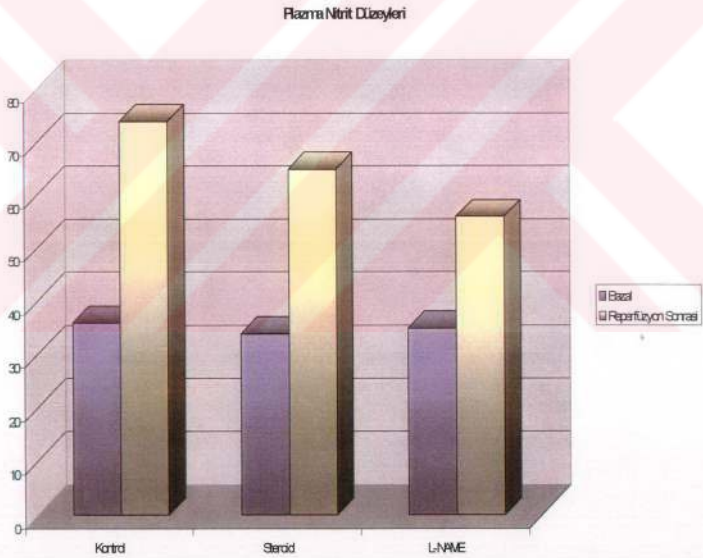
mm³ Ortalama Enfarkt Hacimleri



Şekil 11: Grupların mm³ olarak ortalama enfarkt hacimleri

Tablo VI : Grupların ortalama microM cinsinden plazma nitrit konsantrasyonları

	Kontrol	Steroid	L-NAME
Bazal	36	34	35
Reperfüzyon sonrası	74	65	56



Şekil 12: Grupların plazma nitrit düzeyleri

TARTIŞMA VE SONUÇ

DENEYSEL METOD

Bu çalışmada akut fokal serebral iskemi modeli olarak Kawamura'nın intraluminal filaman oklüzyon tekniği kullanılmıştır (118).

Rat serebral dolaşımında anterior kominikan ve posterior kominikan arterler aracılığıyla anastomoz sağlanması nedeniyle fokal serebral iskemi yaratmak için MCA'nın selektif olarak tıkanması gerekmektedir. (118)

MCA oklüzyonu intraluminal filaman yönteminin yanısıra mikrovasküler klip uygulaması veya MCA'nın cerrahi koagulasyonu gibi yöntemlerle de yapılabilmektedir (118). Ancak bu yöntemlerde işlem sırasında oluşacak olası beyin hasarının enfarkt alanı ölçümleri üzerine olumsuz tesir yaratması ve yapılacak olan kraniotomi ve dura açılımının iskemik ödeme bağlı perfüzyon bozukluğunu önlemesi istenmeyen etkilerdir. Çünkü akut fokal serebral iskemi de ödeme bağlı perfüzyon bozukluğu fizyopatolojik sürecin doğal bir seyri olup sonuçların gerçeğe yakın çıkması için seçilecek olan yöntemin sonuçlar üzerine olumlu veya olumsuz herhangi bir etkisinin olmaması tercih edilir.

Yöntemin bir diğer avantajı ise Kawamura'nın intralüminal oklüzyon yönteminde reperfüzyon ipliğinin geri çekilmesiyle kolay ve sağlıklı bir şekilde sağlanmaktadır. Oysa İCA'den emboli göndermek suretiyle veya MCA'nın koagulasyonu yoluyla oluşturulan iskemi modelleri reperfüzyona imkan tanımamaktadır.

Yukarıda bahsedilen nedenlerle Kawamura'nın intralüminal oklüzyon yöntemi 1986'dan bu yana bir çok araştırmacı tarafından iskemi-reperfüzyon modeli olarak tercih edilmektedir (118).

Deney sırasında kısa süreli anestezi madde kullanılması hayvanlarda anesteziye bağı mortalite ve morbititeyi azaltmak için gerekliydi. Bu amaçla ketamin ve rompun kullanıldı. Ketamin aynı zamanda NMDA reseptör antagonisti olup bu mekanizmayla da nöroprotektif etkisi olan bir ajandır (121). Bu nedenle deney sonuçlarının etki edebileceği düşünölmekle beraber çalışmada tüm gruplara eşit dozda ve aynı sürede anestezi madde verilmesi nedeniyle Ketaminin bu etkisinin gruplar arası bir fark oluşturmadığını düşündük. Ketaminin alternatifi Halotan/Nitros Oksit olabilir. Ancak bu madde uygulaması zor olması nedeniyle seçilmedi. Diğer anestezikler ise uzun etkili oldukları için hayvanların kaybedilmesine neden olabileceği için tercih edilmedi.

NO DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞMELER

Serebral iskemi ve reperfüzyon esnasında NO düzeylerinin yükseldiği daha önce yapılan çeşitli çalışmalarla da gösterilmiştir (18, 19, 20). Kumura ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 2 saatlik iskemi sonrası Jugüler venden alınan kan örneklemelerinde NO düzeyinin yükseldiği 4 saatte maksimuma ulaştığı ve 7 gün boyunca yüksek kaldığı gösterilmiştir (122).

İskemi sonrası oluşan hücre içi Ca^{++} artışı cNOS aktivitesini indükleyen ilk mekanizmadır. Ca^{++} düzeyinin 0.5 mM ulaşması ile cNOS aktivitesi maksimuma ulaşır. Bu aktivasyon kısa süre sonra azalmaktadır (18, 19, 74).

Geç ama uzun süren NOS aktivasyonu 24-72 saat sonra ortaya çıkan inflamatuvar hücreler ve mikrogliyalarda indüklenen induceble NOS (iNOS) tarafından gerçekleştirilmektedir (68).

Çalışmada NO düzeyi tayini için deneklerden iki kez kan örnekleme yapıldı. İlk örnekleme hayvanlar uyuduktan sonra iskemi yaratılmadan hemen önce, ikincisi ise NO düzeyinin maksimuma ulaştığı bilinen reperfüzyondan dört saat sonra yapıldı.

Çalışmada her üç denek grubunda da iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası NO düzeyi tayini yapılması, hem iskemi ve reperfüzyonun NO düzeyi üzerine olan etkisini hem de L-NAME ve steroidlerin NO sentezi üzerine olan etkilerini göstermek açısından önemlidir.

Çalışmada iskemi ve reperfüzyon sonrası NO düzeylerinde bazal NO düzeyine göre;

Kontrol grubunda % 105'lik artış,

L-NAME'li grupta % 60'lık artış,

Steroidli grupta % 91'lik artış,

saptanmıştır.

Başka bir deyişle L-NAME uygulanması iskemi ve reperfüzyonda NO düzeyindeki artışı % 45 oranında azaltırken, steroid uygulaması bu artışı ancak % 14 oranında azaltabilmiştir.

Buradan şu sonuç çıkarılabilir; L-NAME ve steroidler her ikisi de iskemi ve reperfüzyon esnasında NO sentezini inhibe etmek suretiyle NO düzeyinde meydana gelen artış miktarını azaltmakta ve bu etki L-NAME'de daha fazla gözlenmektedir. Nitekim L-NAME uygulanan grupta enfarkt hacmi kontrol ve steroid uygulanan gruplara göre daha küçük bulunmuştur.

Bunun yanı sıra steroidlerde NO sentezinde L-NAME kadar olmasa dahi belirgin düşüşe neden olmuş ancak enfarkt hacimleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etki yaratmamışlardır.

ENFARKT HACİMLERİ ÜZERİNE NO'NUN ETKİSİ

Bilindiği üzere NO'nun santral sinir sisteminde birbirine zıt iki etkisi vardır. Endotelden salınan NO nöroprotektifken, nöronal NO nörotoksik rol oynamaktadır.

Farelerde yapılan bir çalışmada L-Arginine infüzyonunun NO'nun aracılık ettiği mekanizmalarla serebral kan akımını artırdığı ve pial damarlarda genişlemeye neden olduğu gözlenmiştir (74, 75). Bunun yanı sıra endotel kökenli NO'nun trombosit ve lökosit adezyonunu azaltmak suretiyle mikrovasküler sirkülasyonda rezistansı düşürerek olumlu etki yarattığı bildirilmiştir (77, 78).

eNOS geni delesyona uğratılmış mutant farelerde yapılan bir çalışmada bu farelerde MCA oklüzyonu kontrol gruplarına göre daha büyük enfarktlara neden olmuş ve bu farelere L-Arginine infüzyonu nöronal NO sentezini artırdığı için enfarkt hacimlerinde artışa yol açmış ve toksisiteyi artırmıştır (79).

Yapılan başka bir çalışmada ratlarda NO'nun İCA'den infüzyonunun SAK sonrası oluşan vazospazmı anjiyografik olarak çözdüğü ve doppler ile ölçülen kan akımını artırdığı gözlenmiştir. SAK'da eritrositlerin lizisi sonucu oluşan oksihemoglobinin NO'ya afinitesi yüksektir. NO ise damar düz kaslarındaki cGMP düzeyini artırarak vazodilatasyona yol açar. Bu noktadan hareketle damar duvarındaki NO'nun SAK'da tüketimi vazospazma yol açmakta ve İCA'den NO infüzyonu spazmı çözmektedir.

NO'nun nöronal formunun santral sinir sistemindeki rolü nörotoksik yöndedir. Bu etki esas olarak NO'nun süperoksit radikaliyle reaksiyonu sonucu oluşan güçlü bir nörotoksik ajan olan peroksinitrite bağlıdır. Peroksinitrit hidroksil ve hidroksil benzeri radikallere yıkılır. Oksijen radikalleri, sellüler proteinlerin tirozinlerini nitrolize etmek suretiyle DNA'ya, protein ve lipid membranlara toksiktir (12, 13, 123).

Nitekim nöronal NOS geni delesyona uğratılmış mutant farelerde MCA oklüzyonu sonrası oluşturulan enfarkt hacmi 57 ± 5 mm çıkarken kontrol gruplarında bu değeri 93 ± 2 mm olarak ölçülmüş mutant farelerin NO sentezi

L-NNA (Nitro- L-Arginine) gibi bir NOS inhibitörü tarafından önlediği takdirde mutant farelerde varolan tek NO türü olan endotelial NO sentezini önlediği için eNO'nun koruyucu etkisi de önlenmiş ve enfarkt hacimlerinde artış gözlenmiştir. Buna karşılık mutant farelere L-Arginine uygulanması endotelial NO sentezinde artmaya yol açtığı için enfarkt hacmini daha da küçültmüştür (24).

NO'nun nörotoksik etkilerinin bir bölümünden de NMDA reseptörleri aracılığı ile olan etkisi sorumludur. Bir görüşe göre NO, NMDA reseptör aktivasyonu sonucu oluşan bir mediyatördür ve NMDA'nın nörotoksik etkilerinin oluşmasından sorumludur. L-NAME ile oluşturulan NOS inhibasyonunun NMDA reseptör aktivasyonu ile oluşturulan enfarkt hacmini %35 oranında azaltması ve nöronal NOS geni mutant farelerin NMDA toksisitesine daha dirençli olması bu görüşü destekleyen çalışmalardır (66, 67, 71, 72, 73).

Sonuç olarak nöronal NO'nun fazla üretimi, peroksinitrit oluşumunun artmasına, peroksinitritin hidroksil ve hidroksil benzeri serbest radikallere dönüşmesi bu radikallerinde protein ve lipid membranlara, DNA'ya toksik olması, nöronal NO'nun NMDA reseptörleri aracılığıyla oluşan nörotoksistide olası bir mediyatör olması gibi sebeplerle de nörotoksiktir (12, 13, 14, 15, 16, 17, 71).

Endotelial NO'nun fazla üretilmesi ise damar düz kaslarındaki cGMP düzeyini artırmak suretiyle vazodilatasyona yol açması, trombosit ve lökosit adezyonunu azaltmak suretiyle mikrovasküler sirkülasyonda direnci azaltıp kan akımını kolaylaştırması gibi sebeplerle nöroprotektif rol oynamaktadır (74, 75, 77, 78).

NO sentezinin L-NAME gibi nonspesifik bir NOS inhibitörü tarafından inhibe edilmesi sonucu L-NAME uygulanan grupta enfarkt hacimlerinin kontrol ve steroidli gruplara göre anlamlı ölçüde küçük bulunması iskemi reperfüzyon fizyopatolojisinde invivo koşullarda nörotoksik etkinin nöroprotektif etkiye üstün olduğunu bir kez daha doğrulamıştır (24).

Buna istinaden selektif nNOS inhibitörünün kullanılması halinde bu nöroprotektif etkinin çok daha güçlü olacağına inanıyoruz. Çünkü çalışmada kullanılan L-NAME nöronal NO sentezini inhibe edip nörotoksik etkiyi azaltmakla beraber endotelial NO sentezini de azaltıp eNO'nun serebral dolaşımı üzerine olan olumlu etkilerini de azaltmıştır. Bu durum ise L-NAME'nin nöroprotektif etkilerinin kısmende olsa azalmasına neden olmuştur. Nitekim 7 Nitroindazol selektif nNOS inhibitörü olup güçlü nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. Klinik çalışmalar için umut vadetmektedir (124).

Bunun yanı sıra eNO'nun serebral dolaşım üzerine olan olumlu etkileri düşünülerek eNOS'un selektif olarak uyarılmasının iskemik serebrovasküler hastalıklar ve özellikle SAK sonrası oluşmuş vazospazmın tedavisinde yeri olabileceği düşünülebilir.

L-NAME VE KORTİKOSTEROİDLERİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmamızda, enfarkt hacimleri üzerine en olumlu etki L-NAME'li grupta gözlenmiştir. Enfarkt hacmi

Kontrol grubunda ortalama $214 \pm 12 \text{ mm}^3$

Steroidli grupta $213 \pm 21 \text{ mm}^3$

L-NAME'li grupta $200 \pm 14 \text{ mm}^3$

olarak ölçülmüştür.

Bu durum L-NAME'nin potent bir NOS inhibitörü olması (NO artışını % 45 oranında azalttığını gördük) ve serebral iskemide fizyopatolojisi üzerine ek olumsuz etkisi olmaması ile açıklanabilir. Nitekim L-NAME uygulanan grupta kendi içinde NO düzeylerindeki düşüşler değişik derecelerde olmuş ve yüzde olarak NO düzeyinde düşüş nisbetinde enfarkt alanında küçülme sağlanmıştır. Bu da L-NAME -NO düzeyi- enfarkt hacmi arasında doğrusal bir orantının varlığını düşündürmektedir.

Marlangue ve arkadaşları 1996 yılında fokal serebral iskemide L-NAME ile yaptıkları bir çalışmada L-NAME 'nin kortikal enfarkt hacmini %24 oranında azalttığını ($207 \pm 46 \text{ mm}^3$ den 157 ± 38 e düştüğünü göstermişlerdir) bildirmişlerdir ki bu oran bizim sonuçlarımızla da uyumludur (123).

Çalışmamızın amaçlarından biri de steroidlerin NO düzeyi ve enfarkt hacmi üzerine olan etkilerini araştırmaktır.

Çalışmada steroidler NO düzeyindeki artışta % 14'lük bir azalmaya yol açtı. Bu etki L-NAME kadar olmasa da istatistiksel olarak anlamlıydı. Buna rağmen steroidler enfarkt

hacimleri üzerine belirgin olumlu etki yaratmadılar. Bu sonuçtan da kısmen steroidlerin serum glukozunu artırarak laktik asidoza yol açmaları sorumlu olabilir (116, 117).

Nitekim glukokortikoidlerin serebral iskemiadaki rolleri 1960'lardan beri uzun deneysel ve klinik çalışmalarla gösterilmeye çalışılmış ve birbirleriyle çelişen sonuçlar bulunmuş. Bu çalışmalardan birinde, gerbillerde 3 saatlik iskemi ve reperfüzyon sonrası metilprednizolon, iskemiden 10 dakika önce 60 mg/kg dozunda verilmiş ve reperfüzyon sonrası nörolojik düzelmeyi ciddi olarak artırdığı gözlenmiştir (110). Buna karşın yakın zamanlarda yapılan bir çalışmada gerbillerde global iskemi sonrası verilen metilprednizolonun hipokampal nöronlarda nekrozu artırdığı gözlenmiştir (116, 117).

Görüldüğü üzere glukokortikoidlerin iskemi ve reperfüzyonda rolleri halen tartışmalı olup bizim çalışmamızda da NO sentezini inhibe ettiklerini görmekle beraber iskemi reperfüzyon sürecinde olumlu veya olumsuz anlamlı herhangi bir etkilerini gözlemlemedik.

Çalışmada L-NAME'nin steroidlere göre daha başarılı sonuçlar vermesinde kısmen L-NAME'nin NO sentezinde daha güçlü bir inhibisyona yol açması, kısmen de steroidlerin serum glukozunu artırmaları gibi olumsuz yan etkilere neden olması sorumlu tutulabilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda iskemi ve reperfüzyonda NOS inhibisyonu sonuçları indirekt parametrelerle veya yalnız enfarkt hacimleri ile gösterilmiştir. Bu çalışma ise sonuçların enfarkt hacimleri ve NO düzeylerinin birlikte gösterildiği ilk değerlendirme olması açısından önemlidir.

ÖZET

Serebral iskemi ve reperfüzyonda NO düzeylerinin yükseldiği bilinmekte olup çalışmamızda da çeşitli aşamalarda yapılan NO düzeyi tayini ile bu artışı gözledik.

İskemi ve reperfüzyonda yükselen NO'nun birbirine zıt iki etkisi bulunmaktadır. Endotelial NO serebral kan akımını artırarak nöroprotektif rol oynarken nöronal NO ortamda sürepoksit anyonu ile birleşerek potent nörotoksik ajan olan peroksinitrit oluşumuna neden olmaktadır bu da reperfüzyon hasarının temel mekanizmasını oluşturmaktadır. İn vivo koşullarda nörotoksik etki hakimdir. Çalışmamızda kullandığımız L-NAME gibi nonspesifik enzim inhibitörlerinin nöroprotektif etki yarattığının gözlenmesi de bu görüşü desteklemiştir.

Çalışmamızın amacı L-NAME ve steroidlerin hem iskemi ve reperfüzyondaki değişen NO düzeylerine olan etkisini gözlemek hem de MCA'nın monofilaman oklüzyon yöntemi ile tıkanması sonucu oluşturulan geçici iskemi sonrası gelişen enfarkt boyutlarına olan etkilerini incelemektir.

Çalışmada iskemi-reperfüzyon esnasında NO düzeylerinin yükseldiği, bu yükselmenin L-NAME ile steroidlere nazaran daha fazla önlenemediği gözlemlendi. Enfarkt boyutlarında ise L-NAME kontrol gruplarına nazaran belirgin bir küçülme sağlarken steroidlerin enfarkt boyutları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime yaratmadığını gözledik. Bu sonuçtan da kısmen steroidlerin sistemik yan etkileri sorumlu tutuldu.

Sonuç olarak NO, iskemi ve reperfüzyon sürecinde yükselen önemli bir mediyatördür. Güçlü bir nöroprotektif etki için sistemik yan etkiye yol açmadan selektif olarak nNOS sentezinin inhibisyonu gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Olney JW, Sharpe LG: Brain lesions in infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 166: 386-8, 1969
2. Dugan LL, Choi DW: Excitotoxicity, free radicals and cell membrane changes. *Ann Neurol* 35: 17-21, 1994
3. Schultz JB, Matthews RT, Jenkins BG: Blockade of neuronal nitric oxide synthase protects against excitotoxicity *in vivo* *J Neurosci* 15: 8419-25, 1995
4. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer N: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43: 1369-74, 1984
5. Stys P, Waxman S, Ransom B: Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of rat Na^+ channels and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ exchanger. *J Neurosci* 12: 430-9, 1992
6. Zhang L, Andou Y, Masuda S, Mitani A, Kataoka, K: Dandelion protects against ischemic, delayed neuronal death in gerbil brain. *Neurosci Lett* 158: 150-8, 1993
7. Nakaki, T: Physiological and clinical significance of NO, *Keio J Med.* 43: 15-26, 1994
8. Davies, MG, Fulton, GJ, Hagen, PO: Clinical biology of NO, *British J Surgery* 82: 1598-1610, 1995
9. Katusic, SZ: Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radical Biology and Medicine* 20: 443-448, 1996

10. Tsukahara H, Hiraoka M., Hori C., Miyanomae T, Kikuchi K, Sado M: Age related changes of urinary nitrite/nitrate excretion in normal children, *Nephron* 76: 307-9, 1997
11. Fraigneau Y, Gonzalez M, Coppalle A: Turbulence effects upon the NO₂/NO conversion in the vicinity of an urban area, *Sci Total Environ* 189-190: 293-300, 1996,
12. Chan PH: Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996
13. Beckman JS, Chen J, Conger Carl: The importance of superoxide in nitric oxide dependent cerebral ischemic injury: Cerebrovascular disease. Moskowitz MA, Caplan LR (eds). Butterworth-Heinemann, Newton MA. 1995, S: 25-37.
14. Kwon NS, Stuehr DJ, Nathan CF: Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J Exp Med* 174: 761-7, 1991
15. Liu RH, Hotchkiss JH: Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutation Res* 339: 73-89, 1995
16. Blanco FJ, Dchs RL, Schwarz H, Lotz M: Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 146:75-85, 1995
17. Messmer F, Lapetina EG, Brune B: Nitric oxide induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol Pharm* 47: 757-65, 1995
18. Malinski T, Bailey F. Zhang ZG, Chopp M: Nitric oxide measured by a prothrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13: 335-8, 1993
19. Sato S, Tominaga T, Ohnishi ST: EPR spin trapping study of nitric oxide formation during bilateral carotid in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1181: 195-7, 1993

20. Zhang ZG, Chopp M, Gautam S: Upregulation of neuronal nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 654: 85-95, 1994
21. Zhang J, Synder S: H. Nitric oxide in the nervous system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol* 35: 213-233, 1995
22. Nagafuji T, Sugiyama M., Matsui T: Temporal profiles of Ca^{++} /Calmodulin-dependent and independent nitric oxide synthase activity in rat brain microvessels following cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl* 60: 285-288, 1994
23. Simonian NA, Coyle JT: Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 36: 83-106, 1996
24. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 264: 1883-1885, 1994
25. Wolin MS: Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 3: 1-17, 1996
26. Kam PCA, Govender G: NO: Basic science and clinical applications. *Anaesthesia*: 49: 515-521, 1994
27. Dawson TM, Dawson VL: Nitric oxide: actions and pathological roles. *Neuroscientist* 1: 7-18, 1995
28. Fischer HC, Kuljis RO: Multiple types of nitrogen monoxide synthase-NADPH diaphorase containing neurons in the human cerebral neocortex. *Brain Res* 654: 105-17, 1994

- 29.Searle NR, Sahab P: Endothelial vasomotor regulatin in health and disease. *Can J Anaesth* 39: 838-57,1992
- 30.Lambert LE., French JV, Whitten JP: Characterization of cell selectivity of two novel inhibitors of NO synthesis. *Eur J Pharmacol* 216: 131-134, 1992
- 31.Ignarro LJ: Physiology and pathophysiology of NO. *Kidney International Suppl.* 55: 2-5, 1996
- 32.Baron AD: The coupling of glucose metabolism and perfusion in human skeletal muscle. The potential role of endothelium derived nitric oxide. *Diabetes* 45: 105-9, 1996
- 33.Bredt SD, Synder SH: Nitric oxide: a physiological messenger molecule. *Ann Rev Biochem* 63: 175-195, 1994.
- 34.Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Synder SH: Mechanism of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J Neurosci* 13: 2651-2661, 1993
- 35.Sessa WC: The NO synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31: 131-143, 1994
- 36.Silver IA, Erecinska M: Intracellular and extracellular Ca^{++} in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Phsiol* 95: 837-66, 1990
- 37.Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S: Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for simulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci* 86: 5159-62, 1989
- 38.Brune B, Mohr S, Messmer UK: Protein thiol modification and apoptotic cell death as cGMP-independent nitric oxide (NO) signaling pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127: 1-30, 1996

39. Stuehr DJ, Nathan CF: NO: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-55, 1989
40. Mizutani T, Layon, J: Clinical applications of NO, *CHEST*. 110: 506-24, 1996
41. Lefer MA, Lefer DJ: The role of NO and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischemia-reperfusion. *Cardiovascular Research* 32: 743-751, 1996
42. Warder TD: Influence of endothelial mediators on the vascular smooth muscle and circulating platelets and blood cells, *Int Angiol* 15: 93-9, 1996
43. Ferro CJ; Webb JD; The clinical potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular medicine. *Drugs* 51:12-27, 1996
44. Noll G; Wenzel RR, Luscher TF: Endothelin and endothelin antagonists: potential role in cardiovascular and renal disease. *Mol Cell Biochem* 157: 259-61, 1996
45. Wenmalm A: Endothelial NO and cardiovascular disease. *J Int Med* 235: 317-27, 1994
46. Navar LG, Majid DS: Interactions between arterial pressure and sodium excretion. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 64-71, 1996
47. Galle J, Wanner C: Impact of nitric oxide on renal hemodynamics and glomerular function: modulation by atherogenic lipoproteins? *Kidney Blood Press Res* 19: 2-15, 1996
48. Andersson KE, Persson K: Nitric Oxide Synthase and the lower urinary tract: possible implications for physiology and pathophysiology. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 175: 43-53, 1995
49. Goldstein IM, Ostwald P, Roth S: Nitric Oxide: a review of its role in retinal function and disease. *Vision Res* 36: 2979-94, 1996

50. Brown S, Jampol LM: New concepts of regulation of retinal vessel tone. *Arch Ophthalmol* 114: 199-204, 1996
51. Holzer P, Wachter C, Heinemann A, Jovic M, Lippe IT, Herbert MK: Diverse interaction of calcitonin gene related peptide and nitric oxide in the gastric and cutaneous microcirculation, *Can J Physiol Pharmacol* 73: 951-4, 1995
52. Bengmark S, Gianotti L: Nutritional support to prevent and treat multiple organ failure. *World J Surg* 20: 474-81, 1996
53. Lugg J, Chris NG, Rajfer J, Gonzales CN: Cavernosal nerve stimulation in the rat reverses castration-induced decrease in penile NOS activity. *Am J Physiol* 271: 354-361, 1996
54. Hsueh AJ, Eisenhauer K, Chun SY, Hsu SY, Billig H: Gonadal cell apoptosis, *Recent Prog Horm Res* 51: 433-55, 1996
55. Norman J: Nitric oxide and the myometrium. *Pharmacol Ther* 70: 91-100, 1996
56. Mizutani T, Layon J: Clinical application of NO. *CHEST* 110: 506-524, 1996
57. Luscher TF, Barton M, Wight E, Espinosa E, Yang Z: Action of natural estrogens on the vessel wall; molecular mechanisms and clinical implications. *Schweiz Med Wochenschr* 126: 1748-55, 1996
58. Umansky V, Rocha M, Shirmacher V: Liver endothelial cells: participation in host response to lymphoma metastasis. *Cancer Met Rev* 15: 273-9, 1996
59. Hughes FJ: Cytokines and cell signalling in the periodontium. *Oral Dis* 1: 259-65, 1995
60. Franz P, Hauser C, Bock P, Quint C, Baumgartner WD: Localization of nitric oxide synthase I and III in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 116: 726-731, 1996

61. Ikeda M, Minato S, Kano S: Regulation of MHC Class I expression by inflammatory cytokines in rat mesangial cells. *Nephron* 76: 90-95, 1997.
62. Liew FY: Nitric oxide in infectious and autoimmune diseases. *Ciba Found Symp* 195: 234-9, 1995
63. Xie K, Dong Z, Fidler IJ: Activation of nitric oxide synthase gene for inhibition of cancer metastasis. *J Leukoc Biol* 59: 797-803, 1996
64. Brune B, Messmer UK, Sanda K: The role of nitric oxide in cell injury. *Toxicol Lett* 82-83: 233-7, 1995
65. Mittal OK: Oxygen-radical/nitric oxide mediate calcium-dependent hormone action on cyclic GMP system: a novel concept in signal transduction mechanisms. *Mol Cell Biochem* 149-150: 257-62, 1995
66. Koh JY, Choi DW: Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH diaphorase. *J Neurosci* 8: 2153-63, 1998
67. Uemura V, Kowall NW, Beal MF: Selective Sprain of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide neurons in ischemic gerbil striatum. *Ann Neurol* 27: 260-5, 1990
68. Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifietti RR: Nitric oxide production during focal cerebral ischemia. *Stroke* 24: 1709-16, 1993
69. Iadecola C, Xu X, Zhang F, el-Fakahany EE, Ross ME: Market induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 52-59, 1995

70. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME: Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15: 378-84, 1995
71. Ashwal S, Cole DJ, Osborne S, Osborne TN, Pearce WJ: L-NAME reduces infarct volume in a filament model of transient middle cerebral artery occlusion in the rat pup. *Ped Res* 38: 652-6, 1995
72. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. *Proc Natl Acad Sci* 6368-71, 1991
73. Dawson VL, Izushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM: Resistance to neurotoxicity in cortical cell cultures from neuronal nitric oxide synthase deficient mice. *J Neurosci* 16: 2479-87, 1996
74. Morkawa E, Rosenblatt S, Moskowitz MA: L-Arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 107: 905-7, 1992
75. Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA: L-Arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am J Physiol* 263: 1632-5, 1992
76. Carrau A, Duval D, Poignet H, Scatton B, Vige X, Nowicki JP: Neuroprotective efficacy of N-omega-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 256: 241-9, 1994
77. Rosenblum WI, Nishimura H, Ellis EF, Nelson GH: The endothelium-dependent effects of thimerosal on mouse pial arterioles in vivo; evidence for control of microvascular events by EDRF as well as prostaglandins. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 703-6, 1992

- 78.Krose I, Wolf R, Grisham M, Granger DN: Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 74: 376-82, 1994
- 79.Huang Z, Huang PI, Ma J: Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knock-out mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 981-7, 1996
- 80.Hiramatsu T, Jonas RA, Miusa T, duPlessis A, Tanji M, Forbess JM, Holtzman D: Cerebral metabolic recovery from deep hypothermic circulatory arrest after treatment with arginine and nitro-arginine methyl ester. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 698-707, 1996
- 81.John KB, Afshar MD, Ryszard MP, Robert J, Gregory T, Edward HO: Effect of intracarotid nitric oxide on primate cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 83: 118-122, 1995
- 82.Hacke W, Hennerici M, Gelmers HJ, Kramer G: Pathophysiology of cerebral ischemia: Cerebral Ischemia. Hocke W, Hennerici M, Gelmers HJ, Kramer G (eds) Springer-Verlag, Berlin 1991, S: 17-30.
- 83.delZoppo GJ, Zemmer H, Harker LA: Thrombolytic therapy in stroke: Possibilities and hazards. *Stroke* 17: 595-607, 1986
- 84.Walker V, Pickard JD: Prostaglandins, thromboxane, leukotrienes and the cerebral circulation in health and disease: Advances and Technical Standards in Neurosurgery. Symon L (ed) Springer-Verlag, Wien 1985, S: 3-90.
- 85.Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 49-58, 1982
- 86.Slater TF: Free radical mechanisms in tissue injury. *J Biochem* 222: 1-15, 1984

87. Dutka AJ, Kochanek PM, Hallenbeck JM: Influence of granulocytopenia in canine cerebral ischemia induced by air embolism. *Stroke* 20: 390-95, 1989
88. Halliwell B, Okezie IA: DNA damage by oxygen derived species: Its mechanism and measurement in mammalian systems. *J Biochem* 281: 9-19, 1991
89. Phillis JW: A radical view of cerebral ischemic injury. *Prog Neurobiol* 42: 441-448, 1994
90. Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC: Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J App Physiol* 71: 1185-1195, 1991
91. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress induced acute tissue injury *PSEBM*. 209: 104-111, 1995
92. Strosznajder J, Chamoniuk M: Biphasic enhancement of nitric oxide synthase activity and cGMP level following brain ischemia in gerbils. *Acta Neurobiol Exp* 56: 71-81, 1996
93. Koroshetz WJ, Moskowitz MA: Stroke in humans. *Trends Pharm Sci* 17: 227-33. 1996
94. Fisher M: An overview of cytoprotective therapy for acute ischemia stroke: Cerebrovascular disease. Moskowitz MA, Caplan LR (eds) Butterworth-Heinemann, Newton MA 1995, S:391-402.
95. Roda JM, Carceller P, Diez-Teiedor E, Avendano C: Reduction of infarct size by intraarterial nimodipine administered at reperfusion in a rat model of partially reversible brain focal ischemia. *Stroke* 26: 1888-92, 1995
96. Silver IA, Erecinska M: Ion homeostasis in rat brain brain in vivo: Intra and extracellular (Ca^{++}) and (H^{+}) in the hippocampus during recovery from short term transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 759-72, 1992

97. Choi DW: The ionic dependence of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 7: 369-79, 1987
98. Siesjö BK: Historical overview, calcium, ischemia and death of brain cell: *Ann NY Acad Sci* 522: 638-61, 1988
99. Bortus RT, Baker KL, Heiser AD: Post ischemic administration of AK 275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 537-44, 1993
100. Siesjö B: Calcium mediated processes in neuronal degeneration. *Ann NY Acad Sci* 747: 140-61, 1995
101. Osborne KA, Shinego T, Balarski AM: Quantitative assesment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 50: 402-410, 1987
102. Hess DC, Zhao W, Carroll J, McEachin M, Buchanan K: Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. *Stroke* 25: 1463-7, 1994
103. Yang GY, Chan PH, Chen J: Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 25: 165-70, 1994
104. Chan PH: Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. *Brain Path* 4: 59-65, 1994
105. Betz AL, Coester HC: Effect of steroid therapy on ischaemic brain oedema and blood to brain sodium transport. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 51: 256-8, 1990
106. Baxter JD, McLeod KM: Molecular basis for hormone action: Duncan's disease of metabolism. Bondy PK, Rosenberg LE (Eds) *Sounders, Philadelphi* PA 1980, S: 104-160.

- 107.Fox JL, Yasargil MG: The relief on intracranial vasospasm: an experimental study with methylprednisolone and cortisol. *Surg Neurol* 3: 214-8, 1975
- 108.Courten-Myers GM, Kleinholz M, Wagner KR, Xi G, Myers RE: Efficacious experimental stroke treatment with high-dose methylprednisolone. *Stroke* 25: 487-92; 1994
- 109.Radomski MW, Palmer RM, Moncada S: Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 87:10043-7, 1990
- 110.Braughier JM, Liner MJ: The effects of large doses of methylprednisolone on neurologic recovery and survival in the Mongolian gerbils following three hours of unilateral carotid occlusion. *Cent Nerv Syst Trauma* 3: 153-162, 1986.
- 111.Hoerlein BF, Redding RW, Hoff EJ: Evaluation of naloxone, crocetin, thyrotropine releasing hormone, methylprednisolone, partial myelotomy, and hemilaminectomy in the treatment of acute spinal cord trauma. *J Am Animal Hosp Assoc* 21: 67-77, 1984
- 112.Haynes RC Jr. Murad F: Adrenocorticotrophic hormone: adenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of adrenocortical steroid biosynthesis: Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 7. Baski. Gilman AG, Goodman LS, Rall TW (eds) MacMillan, New York NY 1985, S: 1459-1489.
- 113.Hall ED: The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 176:13-22, 1992
- 114.Palmer GC, Palmer SJ, Christie-Pope BC: Classification of ischemic-induced damage to Na, K - ATPase in gerbil forebrain. Modification by therapeutic agents. *Neuropharmacology* 24: 509-516, 1985

115. Taylor MD, Palmer GC, Callahan AS: Protective action by methylprednisolone, allopurinol and indomethacin against stroke-induced damage to adenylate cyclase in gerbil cerebral cortex. *Stroke* 15: 229-335, 1984
116. Koide T, Wieloch T, Siesjö BK: Chronic dexamethasone pretreatment aggravates ischemic brain damage by inducing hyperglycemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 5: 251-252, 1985
117. Sapolsky RM, Pulsinelli WA: Glucocorticoids potentiate ischemic injury to neurons: therapeutic implications. *Science* 229: 1397-1400, 1985
118. Kawamura S, Yasui N, Shirasawa M, Fukasawa H: Rat middle cerebral artery occlusion using an intraluminal thread technique. *Acta neurochir* 109: 126-32, 1991
119. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite and (N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126: 131-138, 1982
120. Hatfield RH, Mendelow AD, Perry RH, Alvarez LM, Modha P: Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) as a marker for ischaemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol Appl neurobiol* 17: 61-7, 1991
121. Lin SZ, Chiou AL: Wang Ketamine antagonises nitric oxide release from cerebral cortex after middle cerebral artery ligation in rats. *Stroke* 27: 747-52, 1996
122. Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki K, Yamanaka K, Tanaka S, Hayakawa T., Shiga T., Kosaka H: Generation of nitric oxide and superoxide during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Am J Physiol* 270: 748-752, 1996

123. Charriaut-Marlangue C, Margaill I, Borrega F, Plotkine M, Ben-Ari Y: N^G-Nitro-L-arginine methyl ester reduces necrotic but not apoptotic cell death induced by reversible focal ischemia in rat. *Europ J Pharmacol* 310: 137-140, 1996
124. Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, Moskowitz M. The NOS inhibitor 7-nitroindazole decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 924-9, 1994