

FOKAL SEREBRAL İSKEMİDE REPERFÜZYON HASARINDA NİTRİK OKSİTİN ROLÜ

Yasemin GÜRSOY-ÖZDEMİR, Hayrunnisa BOLAY, Turgay DALKARA

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı ve
Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü, Ankara

ÖZET

İnme sonucunu olumsuz etkileyen ve trombolitik tedavi için zaman penceresini kısaltan faktörlerden biri de reperfüzyon hasarıdır. Reperfüzyonla birlikte Nitrik Oksit (NO) ve süperoksit oluşmakta, bu iki radikalın aynı zamanda oluşumu güçlü bir oksidan olan peroksinitriti meydana getirebilmektedir. Fare orta serebral arter iskemi modelinde (2 saat iskemi, 22 saat reperfüzyon) NO ve peroksinitrit oluşumunun reperfüzyon hasarındaki rolünü araştırdık. Reperfüzyonda nitrik oksit sentaz (NOS) inhibitörü N-(-Nitro-L-Arjinin (L-NA) alan grupta enfarkt hacmi %49 azalırken, reperfüzyonda verilen nöronal NOS inhibitörü 7-Nitroindazol (7-NI) koruma sağlamadı. Preiskemik verilen 7-NI ise %40 koruma gösteriyordu. Kombine tedavi ise reperfüzyonda L-NA alan gruba yakın koruma sağladı ve enfarkt hacminde daha fazla azalmaya neden olmadı. L-NA tedavisi beyin ödemi ve Evans mavisi ekstrasvazasyonunu da belirgin olarak azalttı. Beyin kesitlerinin peroksinitrit hasarının bir göstergesi olan anti-nitrotirozin antikoru ile boyanmasında L-NA verilen hayvanlarda boyamada azalma tespit edildi. Bu veriler reperfüzyonda NO ve süperoksitin birlikte oluşmasının peroksinitrit yapımı aracılığı ile reperfüzyon hasarında rol oynadığını desteklemektedir. L-NA'nın aksine 7-NI'nin reperfüzyonda verildiğinde etkisiz olması, NO kaynağının serebral damar endoteli olduğunu düşündürmektedir. **Anahtar Sözcükler:** Nitrik Oksit, Reperfüzyon hasarı, Anti-nitrotirozin, 7-Nitroindazol, N-omega-L-Nitroarginin

THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN REPERFUSION INJURY

Reperfusion injury is one of the factors that unfavourably effect the stroke outcome and shortens the window of opportunity for thrombolysis. Surges of NO and superoxide generation upon reperfusion have been demonstrated. Concomitant generation of these radicals can lead to formation of the strong oxidant, peroxynitrite. We have examined the role of NO generation and peroxynitrite formation on reperfusion injury in a mouse model of middle cerebral artery occlusion (2 h) and reperfusion (22 h). The infarct volume detected by TTC staining was significantly decreased (49%) in animals treated with non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor N-(-Nitro-L-Arginine (L-NA) at reperfusion. The specific inhibitor of neuronal NOS, 7-Nitroindazole (7-NI) given at reperfusion showed no protection although pre-ischemic treatment with 7-NI was protective (40 % decrease in infarct volume). L-NA treatment also significantly reduced brain edema and Evans blue extravasation (detected spectro-photometrically). Cerebral blood flow levels measured (by laser-Doppler flowmetry) during ischemia and first 30 minutes of reperfusion, and arterial blood gases were not significantly different between groups. Staining of brain sections with anti-nitrotyrosine antibody showed a decreased immunostaining in L-NA treated animals. These data support the hypothesis that concomitant generation of NO with superoxide at the onset of reperfusion plays a significant role in reperfusion injury possibly via peroxynitrite formation. Contrary to L-NA, failure of 7-NI to protect against reperfusion injury suggests that the source of NO is likely to be the cerebrovascular endothelium.

Keywords: Reperfusion injury, Nitric Oxide, Anti-nitrotyrosine, 7-Nitroindazole, N-omega-L-Nitroarginine

GİRİŞ

Nitrik oksit (NO) memeli dokularında yaygın olarak bulunan inorganik gaz yapısında bir mediatördür. L-Arjinden nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla sentezlenir (7, 14). Sentezlendikten sonra depolanmayıp hemen difüzyon yoluyla dağılır ve çevre hücrelerde etki gösterir. Demir ve tiyol gruplarına olan yüksek afinitesi nedeniyle çeşitli biyomoleküllere bağlanarak kan basıncı, vasküler tonüs ve geçirgenlik, nörotransmisyon gibi fizyolojik fonksiyonlarda düzenleyici rol alır. Aktive makrofajlar tarafından yüksek miktarda ve sürekli NO üretimi mikroorganizma ve tümör hücrelerinin öldürülmesine aracılık eder. NO'nin bu fizyolojik etkileri dışında çeşitli patolojik

durumlarda, aşırı miktarda yapımının hücre hasarında rol oynayabileceği de gösterilmiştir (8).

NOS enziminin en az üç izoformu mevcuttur; nöronal (Tip I), indüklenen (Tip II) ve endotelial (Tip III). Nöronal ve endotelial formu konstitütif olup Ca⁺⁺/Calmoduline bağımlıdır ve intrasellüler Ca⁺⁺ artışı ile aktive olur. İndüklenen formu ise intrasellüler Ca⁺⁺ değişikliklerinden bağımsızdır ve sitotoksik inflammatuar cevabı oluşturan NO'yi sentezler.

Serebral iskemide intrasellüler Ca⁺⁺ artışı ile konstitütif NOS'in aktive olduğu ve beyin NO seviyesinin arttığı bilinmektedir. Bu artış ilk 30 dakikada olup kısa sürede konstitütif NOS aktivitesi kaybolması ile ortadan kalkmaktadır(11).

Ancak reperfüzyon ile birlikte reaktif oksijen türleri (ROS) yeniden hızla artış göstermekte ve süperoksit radikali (O₂-) ilk 15 dakika içerisinde pik değerine ulaşmaktadır (15, 13). Süperoksit radikali (O₂-) ve NO'nin birlikte hızla arttığı bu dönem, NO ile O₂-' in birleşmesi ile ortaya çıkan peroksinitrit (ONOO-) radikalinin oluşmasına neden olabilir. Potent bir serbest radikal olarak kabul edilen peroksinitritin pek çok nörodejeneratif süreçte, hücre hasarında önemli rol oynadığı öne sürülmektedir (3).

Reperfüzyon sırasında kan beyin bariyeri bozulmaktadır (12). Bu bariyer bozukluğunda endotel kaynaklı NO ve O₂-'in sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Ancak endotelial NO'nin reperfüzyon hasarına katkısı henüz incelenmemiştir. Bu çalışmada endotelial NOS aktivitesini bloke edilerek reperfüzyon hasarındaki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Selektif bir eNOS inhibitörü olmaması nedeni ile eNOS ve nNOS' u inhibe eden nitroarjinin ile elde edilen sonuçlar seçici bir nNOS inhibitörü olan nitroindazol ile elde edilenlerle karşılaştırılarak endotelial kaynaklı NO' un rolü değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışmada toplam 39 adet 25-30 gram ağırlığında Swiss Albino fare kullanılmıştır. Hayvanlar deney öncesi gece aç bırakılmış ancak 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık siklusuna uygun bir ortamda tutulmuşlardır.

Deney grupları: Beş grupta 2 saat orta serebral arter (OSA) tıkanması ve 22 saat reperfüzyon gerçekleştirildi ve enfarkt hacimleri ölçüldü: Dört gruba aşağıda belirtilen NOS inhibitörleri intraperitoneal yolla verildi.

Reperfüzyondan 15 dakika önce N(Nitro-L-Arjinin), 1 mg/kg (n=6)

İskemiden 30 dakika önce 7-Nitroindazol, 50mg/kg (n=4)

Reperfüzyondan 30 dakika önce 7-Nitroindazol, 50mg/kg (n=4)

İskemiden 30 dakika önce 7-Nitroindazol (50 mg/kg), reperfüzyondan 15 dakika önce N (Nitro-L-Arjinin), (1 mg/kg) (n=4)

Kontrol grubu (n=10).

Ayrıca 2 saat iskemi /22 saat reperfüzyona tabi tutulan 6 kontrol ve 5 reperfüzyonda L-NA alan hayvana ise reperfüzyonla birlikte Evans mavisi verilerek 22 saat sonra kan beyin bariyeri geçirgenliği ölçüldü.

Fokal Serebral İskemi Modeli: İskemi orta serebral arterin ip modeli ile tıkanması yoluyla oluşturulmuştur (5). 400 mg/kg dozunda kloral hidrat anestezisi ile hayvanlar uyutulduktan sonra

kranium üzerindeki deri ve derialtı doku açılarak kraniuma ulaşıldı ve bregma tespit edilerek bunun 2 mm posterioru ve 6 mm lateralinden bölgesel serebral kan akımı (rCBF) lazer-Doppler akım ölçer ile iskemi boyunca ve reperfüzyonun ilk 30 dakikasında ölçüldü. Kraniuma prob yerleştirildikten sonra farenin boyun diseksiyonu yapılarak ana karotit arter ortaya çıkarıldı. Internal ve eksternal karotit arterler diseke edilerek çevre dokudan serbestleştirildi. 8/0 prolent ipin 4 mm uç kısmı silikon ile kalınlaştırıldı. 5/0 ipek ile eksternal karotit arter bağlandı ve internal karotit artere klip konularak ana karotit artere yapılan bir kesiden, internal karotit arterdeki klip çıkarılarak, hazırlanan 8/0 prolent ip OSA köküne kadar ilerletildi. Yerleştirilen lazer-Doppler esnek prob ile bu sırada OSA alanında kan akımının iskemik seviyeleri düştüğü gözlemlendi. 2 saatlik iskemiye takiben ip geri çekilerek reperfüzyon gerçekleştirildi. Serebral kan akımı izlemiyle de reperfüzyonun gerçekleşip gerçekleşmediği tespit edildi.

Deney ve anesteziden ayılma süresinde hayvanların vücut sıcaklığı homeotermik battaniye ile 36.5-37.5°C'de sabit tutuldu. Ana karotit artere yerleştirilen bir kateter aracılığı ile işlem boyunca kan basıncı takibi yapıldı. pO₂, pCO₂ ve pH değerlendirilmesi için iskemi sırasında kan örneği alındı. 22 saatlik reperfüzyonun sonunda, verilen tedaviye kör bir araştırmacı tarafından nörolojik muayene yapıldı ve 0-3 arası derecelendirildi. (0: Normal 1: Kuyruktan tutulduğunda sol ön ayak ekstansiyonunda kısıtlılık 2: Kontralateral tarafa dönme hareketi 3: İstirahat halinde kontralaterale uzanma veya hiç spontan aktivite yok.

Enfarkt alan ve hacminin hesaplanması: 2 saat iskemi 22 saat reperfüzyonu takiben hayvanlar yüksek doz anestezisi ile öldürüldü. Dekapitasyon yapılarak hızla beyin kraniumdan çıkarılıp soğuk serum fizyolojik içinde 10 dakika bekletildi. Beyin dilimleyicisi ile 2mm kalınlığında 5 kesit alınıp %2'lik 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (TTC) solüsyonunda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve bir gece %10'luk formalin solüsyonunda kaldıktan sonra video kamera yardımı ile bilgisayara görüntüleri alınarak enfarkt hacimleri mm³ olarak görüntü analiz programı ile hesaplandı (6). TTC ile boyanmayan beyaz ya da hafif pembe alanlar enfarkt olarak kabul edildi. İskemik olmayan hemisfer alanından iskemik hemisferde etkilenmeyen alan çıkarılarak enfarkt alanı bulundu. Tüm alanlar toplanarak 2 mm ile çarpılıp enfarkt hacmi hesaplandı (1).

Ödem Miktarının Hesaplanması: Enfarkt hacmi hesaplanan beyin kesitlerinden, görüntü analiz programı yardımı ile ödem miktarı hesaplandı. Daha önce tarif edildiği gibi iskemik hemisfer

alanından diğer hemisfer alanı çıkarılıp 2 ile çarpılarak total ödem hacmi hesaplandı. Normal hemisfer hacmine ödem hacmi oranlanarak % ödem miktarı bulundu (10).

Evans Mavisi Extravazasyonunun Hesaplanması: Kan beyin bariyeri bütünlüğü evans mavisi extravazasyonu esas alınarak hesaplandı (12.). 2 saatlik OSA tıkanmasından sonra reperfüzyonu takiben serum fizyolojik içinde hazırlanmış %4'lük Evans mavisi solüsyonundan 0.1 ml kuyruk veninden enjekte edildi. Enjeksiyondan 22 saat sonra 150 ml heparinize solüsyonla (10 IU heparin/ml) transkardiyak perfüzyon yapıldı ve beyinler çıkarıldı. Serebellum ve beyin sapı ayrıldıktan sonra serebral hemisferler iskemik ve noniskemik olmak üzere ayrıldı. Her hemisfer 1 ml 0.1 M fosfat tamponlu tuzlu suda iyice homojenize edildi. Ardından 1000*g 'de santrifüjlendi ve 0.7 ml süpernatant alındı. 0.7 ml süpernatant 0.7 ml %100'lük trikloroasetik asit ile vortekste 15 sn karıştırıldı. Karışım 4°C'de 18 saat bekletilip 1000*g 'de 30 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatantın evans mavisi konsantrasyonu spektrofotometrik olarak 610 nanometre dalga boyunda ölçüldü. Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan evans mavisi solüsyonları ile kalibrasyon eğrisi çıkarıldı. Sonuçlar hazırlanan standart solüsyona göre mg evans mavisi/ hemisfer olarak hesaplandı.

İmmünohistokimya: Anti-nitrotirozin antikoruna ile boyama literatürde tariflenen yöntemlerin modifikasyonu ile gerçekleştirildi (16, 17). 2 saat iskemide 5 saat reperfüzyon sonrasında %4' lük paraformaldehit ile kardiyak perfüzyon gerçekleştirildi. Beyinler dikkatle çıkarılarak yine %4' lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde 48 saat bekletildikten sonra parafin bloğa alındı. Ardından 3µm kalınlığında kesitler elde edilerek bunlar 56°C' de gece boyunca deparafinizasyona bırakıldı. Daha sonra ksilol ve alkol solüsyonlarından geçirilerek hidrasyon gerçekleştirildi. Kesitler 30 dakika proteinaz K solüsyonunda bekletildikten sonra normal at serumu ile blokaj yapıldı ve 1/250 dilüsyonundaki anti-nitrotirozin antikoruna ile (monoklonal, Upstate Biotechnology) oda sıcaklığında 3 saat inkübe edildi. Avidin - Biotin yöntemi ile işaretleme yapıldı ve kromajen olarak DAB (Diaminobenzidin) kullanıldı. DAB çözeltisi mikroskopik takip ile dokuda yeterli boyanma gözlenene kadar tutuldu. Zemin boyamasında Hematoksilen kullanıldı. Dehidrasyon yapıldıktan sonra kesitler entellan kullanılarak kapatıldı. Tedavi protokolüne kör olan bir araştırmacı tarafından mikroskopik değerlendirilme yapıldı.

İstatistik: Gruplar arasındaki farklılıklar varyans analizi (ANOVA) ile test edildi ve p<0.05

ekstravazasyon değerlerinin karşılaştırılması için Mann Whitney-U testi kullanıldı.

BULGULAR

Fizyolojik parametreler ve Nörolojik Muayene:

a) rCBF: Çalışılan beş grupta da iskemide ve reperfüzyon sırasında ölçülen CBF değerleri açısından istatistiksel olarak farklılık tespit edilmedi. CBF değeri iskemide % 22.7±6.9, reperfüzyonda % 92.4±42.2 idi (Tablo 1).

Tablo I: Deney gruplarında iskemide ve reperfüzyonda ortalama arteriyel kan basıncı (AMBP) ve bölgesel serebral kan akımı r (CBF) değerleri

	Kontrol (n=10)	7-NI (reperfüzyon) (n=4)	7-NI (iskemin) (n=4)	L-NA (reperfüzyon) (n=6)	7-NI (isk) + L-NA(rep) (n=4)
rCBF					
iskemi	24±7	25±5	21±3	22±10	20±8
reperfüzyon	92±20	69±12	93±38	108±72	104±33
MABP (mmHg)					
iskemi	79±12	74±7	87±7	78±13	79±6
reperfüzyon	76±10	73±8	86±9	96±14*	90±11*

* L-NA alan grupların reperfüzyon MABP değerlerindeki fark diğer gruplarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır.

Sonuçlar ortalama±SD şeklinde verilmiştir.

rep: reperfüzyon, isk: iskemide, 7-NI: 7-Nitroindazol, L-NA: N-Omega-L-Nitroarjinin

b) Arteriyel kan gazları: İskemide sırasında tüm deney hayvanlarından pH, pO₂ ve pCO₂ ölçüm için 0.5 ml hacminde arteriyel kateterden kan alındı. Gruplar arasında kan gazları açısından da farklılık yoktu ve değerler normal sınırlar içerisinde idi (pH: 7.41±0.06, pO₂: 104±12 , pCO₂: 37±4) (Tablo 2).

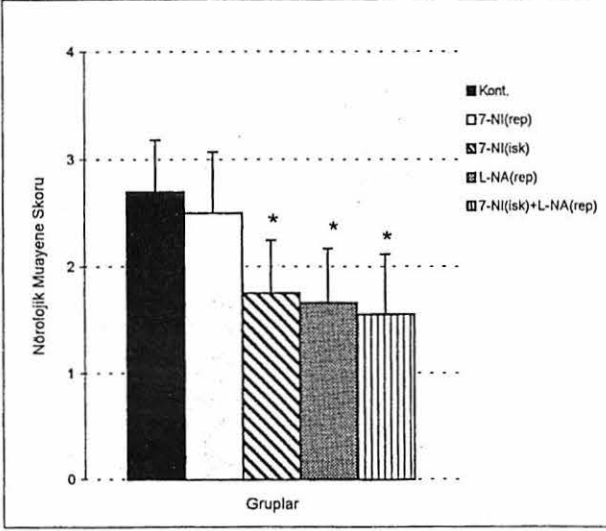
Tablo II: Deney gruplarında arteriyel kan gazları ve pH değerleri

	Kontrol (n=5)	7-NI (reperfüzyon) (n=4)	7-NI (iskemin) (n=4)	L-NA (reperfüzyon) (n=6)	7-NI (isk) + L-NA(rep) (n=4)
PaO ₂ (mmHg)	100±7	98±10	97±36	108±15	99±12
PaCO ₂ (mmHg)	35±4	37±2	38±1	38±4	35±3
pH	7.38±0.05	7.33±0.09	7.34±0.07	7.39±0.02	7.37±0.07

rep: reperfüzyon, isk: iskemide, 7-NI: 7-Nitroindazole, L-NA: N-omega-Nitro-L-Arjinin
Bütün değerler ortalama±SD şeklinde verilmiştir.

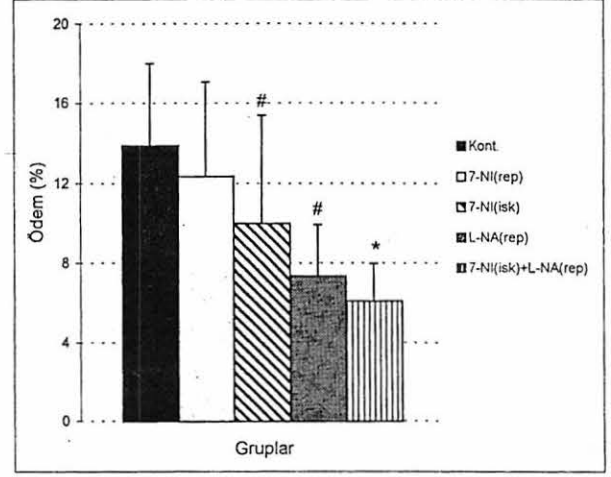
c) Kan Basınçları: Arteriyel kan basınçları iskemide öncesi, iskemide ve reperfüzyonun ilk 30 dakikası boyunca takip edildi. Çalışılan beş grup arasında iskemide öncesi ve iskemide gözlenen kan basıncı

Şekil 1:



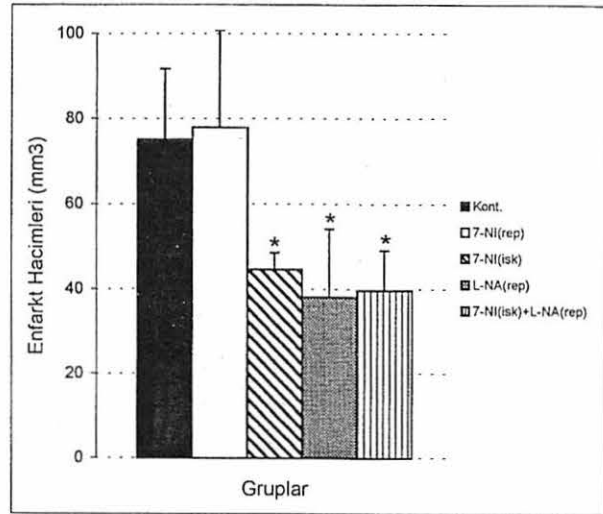
İki saat iskemi 22 saat reperfüzyon sonrası deney gruplarında nörolojik muayene skorları (0: Normal). *: İskemide 7-Nitroindazol (7-NI) veya reperfüzyonda N-Omega-L-Nitroarjinin (L-NA) veya reperfüzyonda L-NA+7-NI alan grupların nörolojik muayene skorları diğer gruplara göre anlamlı farklıdır ($p<0.05$).

Şekil 3:



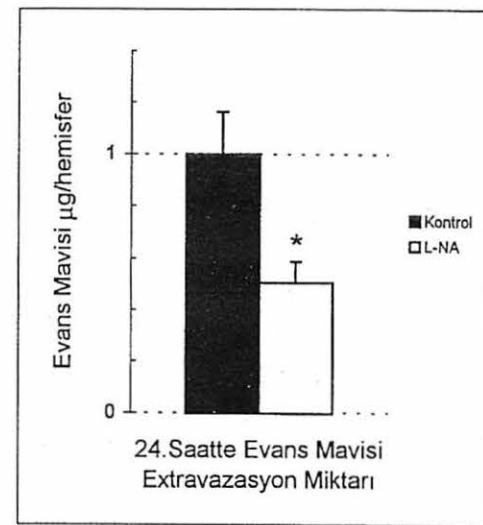
Deney gruplarında orta serebral arter (OSA) iskemi/reperfüzyonu ile oluşan ödem miktarları. İskemik hemisferdeki ödem miktarı hemisfer hacminin yüzdesi olarak gösterilmiştir. #: Kontrol grubundan farklılığı göstermektedir ($p<0.05$). *: kontrol ve reperfüzyonda 7-NI alan gruplardan farklılığı göstermektedir ($p<0.05$).

Şekil 2:



Deney gruplarında orta serebral arter (OSA) iskemi/reperfüzyonu ile oluşan enfarkt hacimleri *: İstatistiksel olarak kontrol ve reperfüzyonda 7-NI alanlara göre enfarkt hacminin anlamlı olarak az olduğu gruplar ($p<0.05$).

Şekil 4:



Kontrol ve reperfüzyonda N-Omega-L-Nitroarjinin (L-NA) alan gruplarda 2 saat iskemi 22 saat reperfüzyon sonrası iskemik hemisferlerdeki Evans mavisi ekstravazasyon miktarları. *: Reperfüzyonda L-NA alan grupta Evans mavisi ekstravazasyonu belirgin azalmaktadır.

iskemi öncesi ve iskemide gözlenen kan basıncı değerleri arasında fark yok iken (ortalama±SD: 79.8±11.5 mmHg 84.1±13.3 mmHg) reperfüzyondan hemen önce L-NA verilen iki gruptaki hayvanların reperfüzyon sırasındaki kan basıncı değerleri diğer gruplara göre yüksek tespit edildi (Tablo 1).

d) Nörolojik Muayene: Reperfüzyonun 22. Saatinde yapılan nörolojik muayenede kontrol grubunun değeri 2.7±0.5 bulunurken, reperfüzyondan hemen önce L-NA verilen grupta bu değer 1.7±0.5 olarak bulundu (Şekil 1). Reperfüzyondan hemen önce 7-NI alan grubun değeri ise kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı değildi (2.5±0.6). İskemiden 30 dakika önce 7-NI alan grupta da nörolojik kayıp skoru kontrol grubuna göre daha azdı (1.8±1.5). İskemiden hemen önce 7-NI ve reperfüzyondan önce L-NA alan grubunda nörolojik muayenesi sadece iskemiden önce 7-NI alan veya reperfüzyonda L-NA alan grubun değerlerine yakın idi (1.6±0.6).

Enfarkt Alan ve Hacimleri: Kontrol grubunda enfarkt hacmi 75.1 mm³ iken reperfüzyondan 15 dakika önce LNA verilen grupta 38.1 mm³ olarak tespit edildi (Şekil 2). İskemiden 30 dk önce 7-NI verilen grupta da koruma görüldü ve enfarkt hacmi 44.6 mm³'e indi. Ancak 7-NI reperfüzyondan 30 dakika önce verildiğinde koruma göstermedi (enfarkt hacmi: 77.9 mm³). İskemiden önce 7-NI ve reperfüzyonda L-NA verilen grubun ise enfarkt hacminde sadece reperfüzyonda L-NA verilen gruba yakın değerlerde azalma tespit edildi (39.9 mm³)

Ödem miktarları: Ödem miktarı her grupta sağ ve sol hemisfer hacim farklarının yüzdesi olarak hesaplandı. Kontrol grubunda %13.9 olan ödem miktarı reperfüzyondan önce L-NA verilen grupta %7.3'e düştü (Şekil 3). Reperfüzyondan önce 7-NI alan grupta ise ödem hacmi kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi (%12.4). İskemiden 30 dk önce 7-NI alan grupta enfarkt hacminde belirgin azalma olmasına rağmen ödem miktarı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı farklılığa ulaşmadı (%10.9). İskemi öncesi 7-NI alan ve reperfüzyondan hemen öncede L-NA verilen grupta ise enfarkt hacmi ile uyumlu olarak ödem miktarında da belirgin azalma tespit edildi (%6.1).

Evans Mavisı Ekstravazasyonu: Evans mavisinin reperfüzyonda i.v. olarak verilip 22 saat sonra beyinde ekstravazasyonu hesaplanmıştır. Kontrol grubunda 1.00±0.16 mg evans mavisı/hemisfer iken reperfüzyondan hemen önce L-NA verilen grupta bu değer 0.505±0.083 olarak tespit edildi. Bu değerler de enfarkt hacmi ve ödem miktarı ile uyumlu idi.

Anti-Nitrotyrosine antikor ile İmmünohistokimyasal Boyama: Bu antikor ile

reperfüzyondan hemen önce L-NA alan, kontrol ve reperfüzyon gerçekleştirilmeyen hayvanlardan alınan beyin kesitleri boyandı. Reperfüzyon yapılan kontrol grubunda özellikle nöronlarda ve serebral vasküler endotelial hücrelerde yoğun boyanma gözlemlendi. L-NA alan grupta ise boyanmanın önemli ölçüde (4+ şiddetinden ('e) azaldığı tespit edildi.

TARTIŞMA:

İnme sonucunu olumsuz etkileyen ve trombolitik tedavi için zaman penceresini kısaltan faktörlerden biri reperfüzyon hasarıdır. İskemik dönemde doku harabiyeti başlamasına rağmen reperfüzyonla birlikte kan akımı sağlandığında yeni doku harabiyeti ve özellikle endotel hasarı buna eklenmektedir (2). Reperfüzyon hasarından sorumlu tutulan mekanizmalardan biri serbest radikal oluşumdur. Reperfüzyonla birlikte serbest radikallerin ve NO'nin sentezinin arttığı bilinmektedir (13, 18, 15). Oluşan artmış miktardaki NO ve süperoksit birleşerek güçlü bir oksidan olan peroksinitrit oluşumuna neden olabilmektedir (3). Peroksinitrit ise oldukça reaktif bir molekül olup amino asitlerin aromatik halkalarının nitrasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca sülfidril, çinko-tioat bölgeleri ve lipitler, proteinler ve DNA ile reaksiyona girmekte ve sitotoksik etki göstermektedir. Amino asit aromatik halkalarının nitrasyon özelliğinden faydalanılarak peroksinitritin dolaylı olarak da NO sitotoksitesinin izi dokulardan kimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle takip edilebilmektedir (4).

Reperfüzyonun 15. dakikasından itibaren NO miktarının iskemi seviyelerine göre belirgin arttığı gösterilmiştir (13). Yine reperfüzyonu takiben iskemi sırasında yok sayılabilecek miktarda nitrotirozin var iken reperfüzyon ile nitrotirozin miktarında da artma saptanmıştır (9). Bu veriler reperfüzyon hasarında NO'nin önemli rolü olabileceğini göstermekle birlikte NO kaynağı hakkında fikir vermemektedir. Bu çalışma da reperfüzyon sırasında verilen nöronal NOS inhibitörü 7-NI koruma sağlamazken non-selektif NOS inhibitörü L-NA'nın enfarkt hacminde %49 oranında küçülme sağlaması reperfüzyon hasarına yol açan NO kaynağının endotelial NOS olabileceğini düşündürmüştür. L-NA verilen grupta Evans mavisı ekstravazasyonunun ve beyin ödeminin yaklaşık yarıyarıya azalması da reperfüzyonda NO'nin kan-beyin engelini bozulmasında ve vazojenik beyin ödemi oluşumunda önemli rol oynadığını göstermektedir. İskemik dokuda oluşan nitrotirozin immunoreaktivitesindeki azalma, L-NA'nın NO sentezini dolayısıyla peroksinitrit

yapımını azalttığını düşündürmektedir.

Öte yandan, 7-NI iskemi öncesi verildiğinde literatürle uyumlu olarak %40 oranında koruma sağlarken, iskemi öncesi 7-NI ve reperfüzyonda L-NA kombine verildiğinde sadece reperfüzyonda L-NA verilen gruba göre artmış bir koruma gözlenmedi. Bu bulgu, bu modelde kurtarılacak bölgeye denk gelen perienfarkt alanın (penumbra) %50 civarında olması dolayısıyla maksimum korunmanın zaten L-NA tarafından sağlanması ile açıklanabilir. Bu gözlem ayrıca reperfüzyon hasarı önlendiğinde penumbra da ilk 2 saatte oluşan değişikliklerin tersinir olduğunu da düşündürmektedir.

Sonuç olarak, bu bulgular reperfüzyon sırasında endotelden kaynaklanan NO' in süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturduğu ve böylece doku hasarına yol açtığı görüşünü desteklemektedir. Reperfüzyon sırasında endotelial NO oluşumunun inhibisyonu reperfüzyon hasarının önlenmesinde önemli bir tedavi yöntemi olabilir.

KAYNAKLAR

- 1) Aronowski J, Ostrow P, Samways E, Strong R, Zivin JA, Grotta JC. Graded bioassay for demonstration of brain rescue from experimental acute ischemia in rats. *Stroke* 1994; 25: 2235-2240.
- 2) Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17: 1048-1056.
- 3) Beckman JS, Crow JP. Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21: 330-334.
- 4) Beckman JS, Ye YZ, Anderson P, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol chem Hoppe-Seyler* 1994; 375: 81-88.
- 5) Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishiruma MC, Davis RL

Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurological examination. *Stroke* 1986;17: 472-476.

6) Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishiruma MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 1986; 17: 1304-1308.

7) Dalkara T, M. Endres, M A Moskowitz. Mechanisms of NO neurotoxicity. *Prog Brain Res* 1998, 118: 231-239.

8) Dawson TM, Gonzales-Zulueta M, Kusel J, Dawson VL. Nitric oxide: Diverse actions in the central and peripheral nervous systems. *Neuroscientist* 1998; 4: 96-112.

9) Golanov EV, Reis DJ. Contribution of cerebral edema to the neuronal salvage elicited by stimulation of cerebral fastigial nucleus after occlusion of the middle cerebral artery in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995; 15: 172-173.

10) Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, Trifiletti R.R. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 1709-1716.

11) Kondo T., Reaume AG, Huang T-T, Carlson E, Murakami K, Chen SF, Hoffman EK, Scott RW, Epstein CJ, Chan PH. Reduction of CuZn-Superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997; 17(11): 4180-4189.

12) Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki K-I, 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* 1996; 270 (cellphysiol.39): C748-C752.

13) Moskowitz M.A., Dalkara T. Nitric oxide and cerebral ischemia. *Advances in Neurology* 1996; 71:365-369.

14) Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U. Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18: 196-205.

15) Sakurai M, Fukuyama N, Takizawa S, Abe K, Hayashi T, Shinohara Y, Nakazawa H, Tabayashi K. Inductions of 3-L-nitrotyrosine in motor neurons after transient spinal cord ischemia in rabbits. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18 (11): 1233-8.

16) Tanaka K, Shirai T, Nagata E, Dembo T, Fukuchi Y. Immunohistochemical detection of nitrotyrosine in postischemic cerebral cortex in gerbil. *Neurosci Lett* 1997; 235 (1-2): 85-88.

17) Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol*. 1991; 71(4): 1185-1195.