

T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Nöroşirurji Anabilim Dalı

DENEYSEL DİFFÜZ BEYİN HASARINDA NİTRİK OKSİT
SENTETAZ İNHİBİTÖRÜ AMİNOGUANİDİN'İN ETKİLERİ

DR.Turgay KÖSE

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr.Aşkın GÖRGÜLÜ

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 1246-TU-06
proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2006

ÖNSÖZ

Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzmanlık eğitimim sırasında her türlü bilgi, tecrübe, yardım ve desteğini esirgemeyen, bize “el” veren değerli hocalarım başta Anabilim Dalımız Bölüm Başkanı Prof. Dr. Aşkın Görgülü Hocama, Anabilim Dalımızın öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr.Tamer Karaaslan, Yrd. Doç. Dr. Kudret Türeyen, Yrd. Doç. Dr. Serdar Baki Albayrak Hocalarıma ve araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr.Nilgün Şenol ve Dr.Berkant Şahin’e ve tezimin hazırlanma aşamasında yardımcı olan Biokimya A.D. öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Recep Sütçü’ye, Biokimya A.D. Arş. Gör. Dr.Nigar Yılmaz’a, Halk Sağlığı A.D. Arş. Gör. Dr.Tufan Nayir’e ayrıca uzun ve zorlu eğitim sürecinde manevi destekleri için eşim Gülcihan ve oğlum Ahmet Berke’ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kafa Travmaları	2
2.1.1. Tarihçe	2
2.1.2. Epidemiyoloji ve Etyoloji	3
2.1.3. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması	3
2.1.3.1. Hafif, Orta ve Şiddetli Kafa Travması	3
2.1.3.2. Hafif (Minör) Kapalı Kafa Travmaları	3
2.1.3.3. Orta Kafa Travması	4
2.1.3.4. Ciddi Kafa Travması	4
2.2. Kafa Travmasının Fizyopatolojisi	4
2.2.1. Birincil Beyin Yaralanması	5
2.2.2. İkincil Beyin Yaralanması	5
2.2.2.1. Sistemik Nedenler	6
2.2.2.1.a) Hipoksi	6
2.2.2.1.b) Hipotansiyon	6
2.2.2.1.c) Diğer Sistemik Nedenler	7
2.2.2.2. Beyin Şişmeleri	7
2.2.2.2.a) Beyin Ödemi	7
2.2.2.2.b) Serebral Hiperemi	8
2.2.2.3. Beyin Herniasyonu	8
2.2.2.4. Travmatik Beyin Hasarının Moleküler ve Biokimyasal Mekanizmaları	8
2.2.2.4.1. Metabolik Disfonksiyon ve Laktat	8
2.2.2.4.2. Eksitator Aminoasitler ve Nöromediatörler	9
2.2.2.4.2.a) Gutamat ve Aspartat	9
2.2.2.4.2.b) Endojenöz Opioidler	10
2.2.2.5. İyonik Akışlar	10
2.2.2.5.a) Kalsiyum	10
2.2.2.5.b) Magnezyum	11
2.2.2.5.c) Potasyum	11
2.2.2.6. Sitokinler ve Tümör Faktörleri	12
2.2.2.7. Serbest Radikaller (Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehid)	12
2.2.2.8. Nitrik Oksit	14
3. MATERYAL VE METOD	23
4. SONUÇLAR	26
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	28
6. ÖZET	35
7. SUMMARY	36
8. KAYNAKLAR	37

KISALTMALAR

AG	: Aminoguanidin
EDRF	: Endotelial Nitrojen Derivated Faktör
e-NOS	: endotelial nitrik oksit sentetaz
GKS	: Glaskow Koma Skalası
i-NOS	: indüklenbilir nitrik oksit sentetaz
L-NAME	: N6-nitro-L-arginine metil esteri
MDA	: Malondialdehid
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
n-NOS	: nöronal nitrik oksit sentetaz
TBH	: Travmatik Beyin Hasarı

1. GİRİŞ

Kafa travmaları hayatı tehdit eden uzun süre tedavi ve bakımı gerektiren bir durumdur. Teknolojiyle birlikte kazalar ve yaralanmalar artmıştır. Kafa travmaları genel olarak ölümlerin kalp hastalığı ve kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. En sık neden olarak da trafik kazaları yer alır. Bu hastalara acil ve sistemik bir muayenin yapılması, patolojinin doğru lokalize edilmesi ve öncelikli tedavilerin uygulanması hayati önem arzeder.

Kafa travmaları sonucu oluşan beyin hasarı primer ve sekonder yaralanma olarak ikiye ayrılarak incelenmektedir. Son yıllarda, ikincil beyin hasarına dair yapılan kliniksel ve laboratuvar araştırmaları sonucunda daha önceden bilinmeyen kafa travmasını takip eden metabolik düzensizlikleri açıklamıştır. Bunlar, daha yeni anlaşılmaya başlanan travmatik beyin hasarının bazı moleküler ve biyokimyasal mekanizmalarını içermektedir. Öyle umulmaktadır ki, ikincil hasar mekanizmaları daha iyi anlaşıldığında ve terapilerin belirli biyokimyasal yolları hedeflediği durumda ciddi kafa hasarıyla bağlantılı şiddetli bozulmalar ve ölüm oranları azalacaktır.

Çalışmamızda deneysel kafa travması oluşturulmuş ratlarda, nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan Aminoguanidin'in lipid peroksidasyonuna olan etkileri nöral dokuda nitrit ve nitrat düzeyi ile Malondialdehid düzeyi araştırılarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kafa Travmaları

2.1.1. Tarihçe

Kafa ve beyin travmalarının tedavisi geç olmakla birlikte doktorların en çok çaba gösterdikleri nörolojik cerrahi alanını oluşturur. Kafa travmalarının tarihçesi M.Ö. 1600 yıllarına kadar uzanmaktadır. Çok eski zamanlardan beri kafa travması öldürücü bir hastalık olarak hekimlerin dikkatini çekmiş ve özel bir önem verilmiştir. Hipokrat (M.Ö. 460) “Kafa Travmaları Hakkında” adı verilmiş olan kitabında kafa travmalarının sınıflandırılmalarını yaparak saçlı deri yaralanmalarının çok tehlikeli olabileceğini işiaret etmiş ve özenle tedavi edilmelerini önermiştir. Hipokrat kafa travmaları için trepenasyonu tanımlamıştır ve İncas travma ile oluşan kan pıhtısının alınması için trepenasyonu kullanmıştır. 1800’lerin sonlarında Sir William Maceven serebral lokalizasyonunu kesinlikle bildiği travma kaynaklı subdural hematomu başarıyla boşaltmıştır (1,2,3).

Harvey Cushing, Fransa’da 1.Dünya savaşı sırasında kafa travmalarının tedavisi hakkında bildiklerimizi arttırdı, erken debritleme yapılması, kemik ve şarapnel parçalarının çıkarılması ve aseptik yara kapatılması, penetre yaralanmalara bağlı ölüm oranlarını önemli ölçüde düşürdü. Diğer taraftan 2. Dünya savaşı esnasında mobil cerrahi üniteler çatışma alanı yanına kuruldu, havalandırmanın ve penisilin koruyucu etkilerinin tümü öğrenildi (1,2,3).

Son yıllarda, ciddi kafa travmalarındaki ölüm oranlarında azalma görülmüştür, modern serilerde % 20 ile 30 arasında olmak üzere düşüktür. Bu ilerleme olasılıkla Komputere Tomografinin kullanılmaya başlanması, kitle lezyonlarının erken boşaltılması, intrakranial basınç, perfüzyon basıncı monitörlenmesi ve yoğun bakımın diğer konulardaki ilerlemeleridir (1,2,3).

Beyinde hipoperfüzyon, hipotansiyon ve hipokseminin zararlı etkilerinin önemi son zamanlarda anlaşılmıştır, böylece komplikasyonların önlenmesi için yeni agresif tedavi metodları, terapötik hipotermi gibi çaba gösterilmiştir. Biokimyasal, hücresel ve genetik mekanizmaların kafa travmalarının oluşumundaki etkileri gelecekte daha geniş bir şekilde anlaşılacak ve yeni tedaviler planlanacaktır (1,2,3).

2.1.2. Epidemiyoloji ve Etyoloji

Kafa travması yaklaşık olarak 100.000'de 200 kişide görülür. Amerika'da yıllık 500.000 kişiyi içerir. Tüm kafa travmalarının %16'sı hastaneye kabul edilir (1,4).

15-24 yaş arasındaki hastalar, erkek cins yüksek risklidir, ikinci pik kadın ve erkek birlikte 65 yaş üstündedir. Düşük sosyoekonomik durum kafa travmaları için yüksek risk taşır. Kafa travmaları en çok motorlu taşıt kazalarını daha sonra düşmeleri, saldırıyı veya diğer sert travmaları ve sporla ilişkili kazaları izleyerek meydana gelir. Düşmeler daha sıklıkla yaşlılarda, spor yaralanmaları gençlerde görülür (1,4).

Glaskow Koma Skalası baz alındığında, kafa travmalarını büyük çoğunluğu (%75-80) ılımlı kategoride yer alır, orta ve ciddi kategoriler her bir kafa travmasının %10 ile 20'si arasındadır (1,4).

2.1.3. Kafa Travmalarının Sınıflandırılması

Kafa travmalı hastalar için yıllar boyunca pek çok ve çeşitli klasifikasyonlar önerilmiştir. Glaskow Koma Skalası'da dahil olmak üzere sınıflandırmalarda en sık kullanılanlar kafa travmasının ciddiyetini baz almıştır. Diğer sınıflandırmalar lezyonların anatomisi üzerine olduğu kadar şiddetine ve hastaların multisistem travmalarına göre planlanmıştır. Sınıflandırma sistemleri radyografik metodlar kullanılarak geliştirilmiştir ve pediatrik populasyonlar için subgruplar yapılmıştır. Ciddi kafa travmalarının sınıflandırmasında en sık GKS kullanılmıştır. Bu skala başlangıç ve daha sonraki hasta değerlendirmesinde, tedavisinde ve iyileşme prognozunun değerlendirilmesinde denenmiş ve ispatlanmıştır (1,4).

2.1.3.1. Hafif, Orta ve Şiddetli Kafa Travması

Genel olarak kafa travmaları GKS esas alınarak hafif, orta ve şiddetli olarak bölünür (1,4).

2.1.3.2. Hafif (Minör) Kapalı Kafa Travmaları

Hafif kapalı kafa travmalarının tanısında önemi olan kliniklerdir.

1. Giriş GKS ölçümü; 14 ve 15.

2. Geçici hafıza kayıpları olabilir.
3. Travma anında sommolans, konfüzyon ve oryantasyon bozukluğu görülebilir.
4. Hemiparezi gibi fokal nörolojik defisitler görülmez (1,4).

2.1.3.3. Orta Kafa Travması

Orta kafa travması hasta GKS 9 ile 13 olduğu zaman tanımlanmaktadır. Bu hastalar komatöz değildir. Ancak göz açmada, kelimeleri konuşmada veya komutları izlemede yetersizlik tanımlanmıştır (1,4).

Orta ciddi kafa travmalı hastalar kafatası kırıklarını içerirler, beyin parankiminde kontüzyon ve laserasyonları ve ayrıca diffüz aksonal yaralanmayı içerirler. İntrakranyal basınç artışı ve epidural ve subdural hematomlar gibi sonraki komplikasyonlar için artmış risk içerirler. Sonuçta bu hastalar başlangıçta dikkatli araştırmayı gerektirirler ve sonraki takipleri yoğun bakım ünitesinde olmalıdır. Yaşam prognozları genellikle iyidir fakat iyileşmede sıklıkla tanımlanan sekeller ile komplikedir (1,4).

2.1.3.4. Ciddi Kafa Travması

Ciddi kafa travması giriş GKS 8 ve daha düşük olan hastalarda tanımlanmıştır. Bu hastalar komatöz olarak göz önünde tutulur, başlangıçta göz açık olarak tanımlanabilir, kelimeleri konuşabilir komutları izleyebilir. Erken dönemde doğru klinik teşhis ile GKS belirlenerek en iyi şekilde sınıflandırılabilir. GKS 3 ve 4 olan hastalar kritik yaralanmalı hastalar olarak tanımlanmıştır, bunlar GKS 5 ve 8 olanlara göre daha kötü prognoza sahiptir. Bu bakış açısıyla motor komponent GKS tanımlamada diğer iki komponente göre daha önemlidir, böylece fleksör veya ekstansör postürde olan hastalar ağrıyı lokalize edenlere göre daha kötü prognozludur (1,4).

2.2. Kafa Travmasının Fizyopatolojisi

Kafa travması sonucu meydana gelen yaralanmalar birincil yaralanma ve ikincil yaralanma şeklinde iki grupta sınıflandırılmaktadır (1,4).

2.2.1. Birincil Beyin Yaralanması

Birincil tanımında, kafa yaralanması darbeye meydana gelir ve beyinin nöral ve vaskular öğelerini içerebilir. Kafa derisinde ve kafatasında meydana gelen yaralanma, kafada bıçaklama ve mermi yaralanması ile verilen parenkimal hasarda olduğu gibi bu kategoriye dahil edilebilir. Hafif kafa travmalarında birincil beyin yaralanması lokal veya yaygın hasar formunu alabilir. Lokal lezyonlar, serebral kontüzyon ve yaralanma, hematomlar, beyin travması ve kranial sinirler ve pituiter sap yaralanmalarını içerir. Birincil yaygın beyin yaralanmaları beyin sarsıntısı ve yaygın aksonal yaralanmayı içerir (1,4).

Birincil kafa hasarları beş genel kategoride ele alınmıştır; kafa derisi hasarı, kafatası kırıkları, delici ve penetran kafa yaralanmaları, lokal beyin lezyonları ve yaygın beyin lezyonları olarak ayrılır (1,4).

2.2.2. İkincil Beyin Yaralanması

İkincil beyin hasarı, darbeden meydana gelen gerçek mekaniksel beyin lezyonlarından (odaksal veya yaygın) başka kafa travmasını takip eden travma sonrası durumları içerir. İkincil beyin hasarı sistemik ve intrakranial olmak üzere ikiye ayrılabilir. Hipoksi, hipotansiyon, hiperkarbi, hipertermi, anemi ve elektrolit dengesizlikleri sistemik rahatsızlıklarken, beyin ödemi, yüksek intrakranial basınç ve felçler intrakranial ikincil patolojik süreçlerin başlıca formlarıdır (1,4).

Tablo-1

İKİNCİL BEYİN HASARI VE POTANSİYEL NEDENLERİ

<u>Sistemik Nedenler</u>	<u>Kafa İçi Nedenler</u>
Hipoksi	Yüksek kafa içi basınç
Hipertansiyon	Beyin ödemi
Hiperkarbi	Serebral hiperemi
Hipertermi	Beyin şifti ve fitiklaşması
Hipoglisemi/hiperglisemi	Gecikmiş kafa içi kanama
Elektrolit dengesizlik	Nöbetler
Sepsis	Kafa içi enfeksiyonlar
Anemi	Serebrovaskular hasar

“İkincil” yaralanma, darbeyi takiben veya daha sonra başlayan fizyolojik sürecin sonucudur. Bunların, birincil yaralanma sonrası gelişmesi ve çoğunlukla da klinik kötüleşmeye yol açan sinir dokularında ileriki hasara neden olması için dakikalar, saatler veya günler gerekebilir. İkincil beyin hasarına neden olan durumlar sistemik ve kafaiçi olmak üzere ikiye ayrılır (tablo-1). Hipoksi, hipertansiyon ve hipertermi, beyin hasarını şiddetlendirebilen sistemik durumlara örnektir. Klinik patolojik bağlantıları tedavi için önemli olanaklar sağladığı için birincil ve ikincil kavramları üzerinde durulmuştur. Beyin parankimasındaki birincil hasarın bir tedavisi yoktur. Son yıllarda, ikincil beyin hasarına dair yapılan kliniksel ve laboratuvar araştırmaları sonucunda daha önceden bilinmeyen kafa travmasını takip eden metabolik düzensizlikleri açıklamıştır. Bunlar, daha yeni anlaşılmaya başlanan travmatik beyin hasarının bazı moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları ve eksitator aminoasitlerin rolü, beyindeki serbest radikallerin biyolojisi, sitokinler, nöroendorfinler ve nitrik oksidin etkilerini içermektedir. Öyle umuluyor ki, ikincil hasar mekanizmaları daha iyi anlaşıldığında terapilerin belirli biyokimyasal yolları hedeflediği, doğru zamanlarda, ciddi kafa hasarıyla bağlantılı şiddetli bozulmaları ve ölüm oranını azaltacaktır (1,4).

2.2.2.1. Sistemik Nedenler

Hipoksi ve hipotansiyon genellikle şiddetli beyin hasarıyla ilgilidir. Bunlar, ciddi bir kafa travması sonrasında potansiyel olarak önlenilebilir ikincil beyin hasarının en yaygın ve etkili sistemik nedenleri olup, dikkate değer şekilde hastalıklara ve ölüme neden olabirler.

2.2.2.1.a) Hipoksi

Travma sonrası ortaya çıkan hipoksi genellikle, havayolu engellemesiyle ilgilidir, ayrıca aspirasyon, torasik hasar ve hipoventilasyon nedeniyle de ortaya çıkabilir. Hipoksi kafa travmasıyla ilişkili ortaya çıktığı durumda ölüm oranının yüzde 24'ten 50'ye çıktığı gösterilmiştir (5).

2.2.2.1.b) Hipotansiyon

Sistemik hipotansiyon, travma sonrası beyin iskemisinin önemli bir nedeni olup normal olarak 90 mm Hg den az yetişkin sistolik kan basıncı olarak tanımlanır.

Erken hipotansiyon ölüm oranını ikiye katlayabilir. Deneysel ve kliniksel araştırmalar travmatik beyin hasarına verilen fizyolojik tepkilerin ani sistemik hipertansiyonu ve onu izleyen ilerleyen hipotansiyonu içerdüğünü ortaya çıkarmıştır. Sistemik hipotansiyon, hasar sonrası meydana gelen yüksek intrakranial basınç nedeniyle serebral perfüzyon basıncını düşürerek iskemiye neden olabilir (serebral perfüzyon basıncı = ortalama arteryal basınç - intrakranial basınç) (6).

2.2.2.1.c) Diğer Sistemik Nedenler

Hiperkapni, hipertermi, hiperglisemi ve hipoglisemi sayılabilir.

2.2.2.2. Beyin Şişmeleri

Travmatik beyin şişmesi kafa travmasında bulunan yaygın patolojik, radyografik ve intraoperatif bulgudur. Beyin sarsıntısı ve yüksek intrakranial basınca önemli şekilde katkısı vardır. Serebral şişme ilk olarak ödem ve muhtemelen hiperemi tarafından meydana gelir. Serebral ödem beyin suyu içeriğinin arttığı beyin şişkinliği olup, serebral hiperemi serebrovaskular yatağın hacmini içerir. Bu ayrım, tartışmalı olmasına rağmen, patolojik ve tedavi edici açıdan önemli olabilir.

2.2.2.2.a) Beyin Ödemi

Beyin ödemi ödem sıvısının nedenine ve yerine (ya intrasellular veya ekstrasellular) dayanarak farklı birçok çeşide ayrılabilir. Travmadaki vazojenik ve sitotoksiktir. *Vazojenik ödem*, serum proteinlerinin hücre dışı beyin parankimine sızıntısıyla kan-beyin bariyerinde bir açıklıktan dolayı serebral vaskularitenin yüksek geçirgenliğinden meydana gelir. Sitotoksik ödem, ayrıca iskemik ödem olarak da bilinir, iskeminin enerji iflası ve hücrel osmoregulasyon kaybı ile meydana gelebilen hücre içi sıvının birikiminden kaynaklanır. Son zamanlarda, vitro araştırmaları ile hem vazojenik hem de sitotoksik ödemin eksitatör amino asitler, araşidonik asit, asidozis ve potasyum iyonlarındaki değişiklikler yoluyla ikincil beyin hasarına yol açtığı ortaya çıkmıştır (7).

2.2.2.2.b) Serebral Hiperemi

Hiperemi ile meydana gelen ikincil beyin hasarının patofizyolojik mekanizmaları hala tamamen anlaşılmamış ve tartışmalıdır. Bazı otoriteler, ikincil beyin hasarının akut olarak yükselmiş intrakranyal basınçla, “lüks perfüzyon sendromu”nun genişliği ve süresine bağlı olarak geliştiğini varsaymaktadır. Şiddetli kafa hasarı; serebral vazoparalizi, serebral kan akımında ve hacminde ani yükselmelere neden olan hipotalamus ve beyin gövdesinin zarar görmesinden meydana gelebilir (8).

2.2.2.3. Beyin Herniasyonu

Doğası ne olursa olsun her ayrı genişleyen intrakranial kitle (örn., hematoma, apse veya ödemli beyin) kafa içi basıncı arttırabilir. Bu yüksek kafa içi basınç, normal ve patolojik beyin dokusunun farklı yoğunluklarından ve anatomik sınırlarından dolayı eşit olarak dağıtılamazlar. Sonuçlanan basınç eğimi, patolojik kitlenin meydana geldiği intrakranial bölmenin dışında beyinde eninde sonunda herniasyona yol açan beyin sarsıntısı ve biçim bozukluğu üretebilir. Bu da, sıkışmış beyinde ikinci iskemiye ve bununla ilişkili elektriksel, metabolik ve biyokimyasal değişikliklere neden olabilir (9).

Supratentoryal ve infratentoryal beyin herniasyonları üç ana modelde sınıflandırılabilir: orta hat herniasyonu, tentoryal herniasyon ve tonsillar herniasyon.

2.2.2.4. Travmatik Beyin Hasarının Moleküler ve Biokimyasal Mekanizmaları

Hücre seviyesinde kafa hasarına ikincil tepkiler olarak nöronal hücre ölümleri ve geri dönülmez beyin hasarları yapan karışık metabolik ve biyokimyasal oluşumlar mevcuttur.

2.2.2.4.1. Metabolik Disfonksiyon ve Laktat

Travmatik beyin hasarından sonra bazı hücreler mekanik olarak hasar görür ve bu nedenle bozulmanın değişik basamaklarına maruz kalır. Direkt olarak hasar görmeyen diğer hücreler intrasellüler ve ekstrasellüler çevrede travma sonrası değişikliklere maruz bırakılırlar. Bu durumun bir sonucu iyonik homeostazis kaybıdır ve bu hücreler üzerinde büyük bir enerji gereksinimi ortaya çıkararak normal iyonik

dengeyi tekrar sağlamak için pompalama mekanizmalarını aktive eder. Ne ilginçtir ki, bu ekstra enerjiyi kazanmada kullanılan temel yakıt glikozdur (6). Travma sonrası hiperglikoliz ve laktat birikimi görülür ve intraselüler laktik asit meydana gelir. Fazla laktik asit hücre ölümüne yol açabilir (10).

2.2.2.4.2. Eksitatör Aminoasitler ve Nöromediatörler

Hayvan modellerinin ve kliniksel çalışmalarının delilleri, eksitator aminoasitlerinin ve nöroiletlenlerin aşırı aktivitesine bağlı olarak, nörotoksik mekanizmaları, travmatik beyin hasarını takip eden nöronal hasarı açıkladığı ileri sürülmektedir. “Eksitotoksite” kavramı nöronların eksitator aminoasitleri fazlaca serbest bırakmaları ile hücre ölümünün artması kavramına gönderme yaparak türetilmiştir. Bu durum, hücre şişmesi, vakuolizasyon ve nöronal ölüme sebep olur. Eksitotoksite sürecinde en az iki farklı mekanizmanın arabuluculuk edileceği gösterilmiştir. 1) kloridin akması, sodyum ve su yüzünden nöronal hücre şişmesi; ve 2) kalsiyum homeostasis kaybı yüzünden oluşan intraselüler hasar, bu olaylar birbirleriyle uyum içinde olur ama bunların farklı sellüler etki yolları olabilir (11).

2.2.2.4.2.a) Gutamat ve Aspartat

Glutamat ve aspartat aminoasitleri normal beyin dokusunda görev yapan nöroiletlenlerdir. Bu maddeler travmatik beyin hasarından sonra hem hayvan hem de insanda yüksek konsantrasyonunda bulunur. Selektif antagonist ve elektrofizyolojik çalışmaların etkilerine dayanarak en az üç çeşit eksitator aminoasit reseptörü tanımlanmıştır. Bunlar NMDA(N-metil-D-aspartat) alıcıları, kainate / AMPA (Amino-3-hidroksil-5-metil-4-isoksole propionik asit) alıcıları ve metabotropik reseptörler (12).

Genel olarak, eksitatör aminoasit reseptörlerinin fazla uyarılmasının esas sonucu, ya ekstrasellular çıkış yada intrasellular haznelerin serbest kalmasıyla aşırı miktarda hücre içi kalsiyum birikimidir. Aşırı kalsiyumun potansiyel olarak zararlı biyokimyasal durumları başlattığı varsayılmaktadır: (1) serbest radikallerin oluşumu ve lipid peroksidasyon ile sonuçlanan, membran fosfolipitlerin bozulmasıyla ortaya çıkan araşidonik asit oluşturan lipazların aktivasyonu; (2) nöronal sitoskelotonun düşüşüyle sonuçlanabilen proteazlerin (örn. Kalpain I ve II katalizi); (3) deoksiribonükleik asidi (DNA) parçalayan endonükleazların uyarılması ve (4) mitokondriyal solunumu

engelleyen ve toksik hidroksil radikallerini oluşturan kalmodulin bağlantılı nitrik oksit sentezi aktivasyonu (13).

2.2.2.4.2.b) Endojenöz Opioidler

Bazı araştırmacılar, endojenöz opioid sistemlerin travmatik kafa hasarını izleyen ikincil hasarın patofizyolojisine katkıda bulunabileceğini varsaymıştır. Dinorfin, beta-endorfin ve enkephalinler merkezi sinir sistemde görülen endojenöz opioidlerin bazılarıdır. Hayvan modellerde, travmadan sonra beyin dinorfin seviyelerindeki belirgin artış dikkat çekmiştir ve bu endojenöz opioidin artış bölgelerinin fokal histopatolojik doku hasarı ve serebral kan akış dağılımı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (11). Farmakolojik çalışmalarda yüksek-doz naloksanın, kafa travması ile ilişkili sistemik ve nörolojik hasarları iyileştirdiği görülmüştür (14).

2.2.2.5. İyonik Akışlar

Travmatik beyin hasarını izleyerek ortaya çıkan nöronal membran iyon geçirgenliğindeki değişimler hücresel enerji ihtiyacını değiştirir ve öylelikle metabolik süreci etkiler. Akut metabolik değişikliklere ek olarak ekstraselluler-intraselluler iyonik dengedeki bozulmalarla nöronal hücrelere hasar veren veya onları öldüren çeşitli mekanizmalar bulunur. Bu zararlı metabolik ve biyokimyasal süreçlerin derecesini ve boyutunu anlamak için travma sonrası iyon akışın temel kavramı anlaşılmalıdır.

2.2.2.5.a) Kalsiyum

Hücre içi kalsiyumun patolojik olarak yüksek seviyeleri oksidatif fosforilasyonun aksamasına, hücresel enzimlerin uygunsuz aktivasyonuna, toksik serbest radikallerin oluşumuna ve sellüler metabolizmanın değişmeyen çözülmesine sebep olur. İskemide, kalsiyum homeostazisini devam ettiren tamponlama mekanizmalarının bozulmasına sebep olan sellular enerji oluşturma sisteminde akut iflas olur. Travmada, aşırı miktarda enerji iflası bulgusuna rastlanmamıştır, çünkü yapılan araştırmalar travmatik beyin hasarını izleyen adenosin trifosfat seviyelerinin azaltılmadığını göstermiştir (15). Böylece, travma sonrası kalsiyum homeostazisini başlatmada önemli sayılan başka olaylar varsayılmaktadır: (1) eksitator amino asit

salınması; (2) membran boyunca artan kalsiyum geçirgenliğinin artması; (3) kan-beyin bariyerinin yıkılması ile endotelial hasar (16).

Hücre ölüm sürecindeki kalsiyumun oynadığı merkezi ve çoklu taraf rollerinden dolayı, intrasellüler kalsiyumdaki patolojik artışlar çeşitli hasarlardan sonra nöronal ölüme yol açan temel “son ortak yol” olarak gösterilmiştir (örn, iskemi, hipoglisemi, hipoksi veya travma). Böylece, bu kalsiyum akışını direkt olarak azaltmak için çabalar sarf edilmektedir. Moleküler biyolojideki yeni gelişmeler, her biri depolarizasyona karakteristik tepkisi olan çeşitli sayıda farklı kalsiyum kanal alt tiplerini ayırmayı mümkün kılmıştır. Bu yeni seçici kalsiyum kanal antagonistlerinin gelişimine teşvik etmiştir. Nimodipin ve nikardipin, ciddi kafa hasarının kliniksel denemelerinde kullanılan L-tipi kalsiyum kanal kapatıcılarıdır (17).

2.2.2.5.b) Magnezyum

Magnezyum merkezi sinir sistemi fiziolojisinde önemli bir rol oynar. Beyinde glikoliz ve oksidatif fosforilasyon, DNA ve RNA sentezi, sellular solunum ve adenosin trifosfat gerektiren bütün enzim tepkileri yer alır. Magnezyum intrasellular sodyumun devamını ve potasyum düzeyini düzenler ve kalsiyumun “fiziyojik antogonisti” olarak adlandırılmıştır. Magnezyumun NMDA reseptörleri üzerinde nöro-modüle edici etkisi vardır ve NMDA-aracılı eksitotoksiteyi bloke edebilir (18).

2.2.2.5.c) Potasyum

Travmalı beyin hasarını takip ederek, intraserebral mikrodiyaliz ile extrasellular boşluk içine hasarlı nörondan büyük potasyum çıkışı olduğu gösterilmiştir. Bu birçok muhtemel mekanizmalarla açıklanabilir: (1) beyinin özellikle kontüzyonlara veya kanamalara maruz kalan bölgelerine, mekaniksel hasara ikincil plazma membranlarının belirgin olmayan bozulmaları; (2) nöral dokunun kendisi içinde deformasyonu nöronal ateşlenmeyle sonuçlanabildiğinden, nöronal boşalmalarla ilişkili olan voltaj-kapılı potasyum kanalları boyunca potasyum akışı; ve (3) eksitator amino asit reseptörlerinin yönlendirdiği ligand-kapılı iyon kanallarının açılışı nedeniyledir. Bu da, yayılan depresyona, bilinç kaybına yada şiddetli kafa hasarı sonrası görülen otonomik disfonksiyonlara katkıda bulunur (18).

2.2.2.6. Sitokinler ve Tümör Faktörleri

Travmayı izleyen çeşitli nöropatolojik süreçlerle ilişkili olan sitokinler interlökinleri (interlökin-1, interlökin-6 ve interlökin-8) ve tümör nekroz faktörünü içerir. Bu faktörler, hasar sonrası inflamatuvar aktivite ve beyin bağışıklığının hücreden hücreye arabuluculuğunda önemli varsayılmaktadır (19).

2.2.2.7. Serbest Radikaller (Lipit Peroksidasyonu ve Malondialdehid)

Serbest radikaller en dış yörüngede serbest elektronu olan kimyasal bileşiklerdir. Bu elektron oksidasyonla sonuçlanan başka bir biyolojik moleküle kolaylıkla transfer edilebilir. Bu özellik serbest radikal molekülleri fazlasıyla reaktif yapar. Serbest radikallerin üretimi mitokondrideki elektron naklinin normal bir sonucudur, o yüzden bütün aerobik hayat formlarının önemli bir özelliğidir. Normal fizyolojik durumlar altında, doğal olarak ortaya çıkan antioksidanlar radikal formasyonlarını kaybeder. Böylece, serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki etkileşim normal beyin işlevinin bir parçasıdır. Buna rağmen çeşitli patofizyolojik süreçler (örneğin travmatik beyin hasarı) serbest radikallerin yüksek seviyede üretimine neden olur. Doğal savunma mekanizmaları tarafından idare edilen serbest radikallerin bu kadar aşırı oluşması travma sonrası nöronal dejenerasyon ve ölümden önemli bir rol oynar (20,21).

Oksijen serbest radikalleri travmatik beyin hasarından sonra serbest radikal zararın oluşumu ve artması için de belirli bir öneme sahiptir. Geniş lipid içeriği ve yüksek oranlı okside edici metabolizmayla birlikte beyin, oksijen radikal aracılı hücresel yıkım için mantıksal bir hedefdir. Oksijen serbest moleküllerin üremesine ilişkin çeşitli yollar ifade edilir: araşidonik asit metabolizması, mitokondriden kalsiyum-nedenli çıkış, katekolaminin oto-oksidasyonu, ekstravaze hemoglobin bozukluğu ve ksantin oksidaz aktivasyonudur. Oksijen radikallerini yan ürün olarak üreten araşidonik asit yolu, travmatik hasarı takip eden serbest radikallerin tahminen ağır basan kaynağıdır. Eksitator aminoasit çıkışının neden olduğu kalsiyumun hücre içine akışı çok sayıda zararlı proteazları ve lipazları aktive eder (örneğin fosfolipaz A₂, lipooksigenaz ve siklooksigenaz). Sonuç olarak, bu enzimler araşidonik asidi; tromboksan A₂,

prostaglandinler, lökotrienler ve serbest aminoasitlere dönüştürür. Bu bozulma ürünleri sırasıyla, oksijen serbest radikalleri üretir (22).

Oksijen serbest radikallerinin birçok türü vardır: süperoksit (O_2^-), hidroperoksil (HO_2^-) ve hidroksil (OH^-). Oksijen serbest radikalleri arasında en reaktif olanı, hücre membranlarına en çok zarar verdiği inanılan hidroksil radikalidir. Süperoksit ve hidroperoksit radikallerin travmatik beyin hasarını izleyen daha toksik hidroksil serbest radikallere döndürüldüğü ileri sürülmüştür: (1) beyindeki travma sonrası hemoglobinin yıkılması süperoksit radikale elektron nakledebilen ve OH^- yi oluşturan serbest demir iyonları ile sonuçlanır; ve (2) süperoksit radikalın nitrik oksitle kimyasal reaksiyonu, sonuç olarak sitotoksik nitrojen dioksit ve hidroksil radikalleri vermek için ayrıştıran peroksinitratı ($ONOO^-$) oluşturur. Bir kere sitoplazmik savunmalar yenildiğinde, güçlü hidroksil radikal, serbest demirin varlığı ile başlatılan lipid peroksidasyon süreci tarafından hücre membranlarını oksidize etmeye başlar (23).

Hücre zarları oksidasyona duyarlı ve doymamış yağ asitlerince zengin olan fosfolipidleri içerirler. Serbest radikaller oksijen varlığında doymamış yağ asitlerinin çift bağlarını kıran zincirleme bir reaksiyon meydana getirirler ve tüm yeni oluşmuş kimyasal radikaller tükenene kadar bu reaksiyon devam eder. Hücre membran stabilizasyonu bozulur, permeabilite etkilenir, membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği zarar görür. Hücre içinde aşırı kalsiyum birikir ve hücre ölümü olur (24).

Eğer lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonu kontrolsüz devam ederse, hücre zarının yayılma alanı diğer hücrelere geçer ve daha da nöronal ölüme neden olur. Nöronlara ek olarak, serebral mikro damar ağsı bu patolojik sürecin yayılması için gene en büyük hedeflerden biridir. Kafa travmasının deneysel hayvan modelleri lipid peroksidasyonun, kan-beyin bariyerinin yıkılmasına ve travma sonrası serebral ödeme neden olan endotelial hücrelere zarar verdiğini göstermiştir (25).

Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen ürünlerin tiobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu Malondialdehid oluşur. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonu veya eikozoid sentezinde serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağıdır. MDA'nın belirlenen seviyeleri serbest radikallerin oluşturduğu zararlar hakkında bilgi edinilmesini sağlar (26,27).

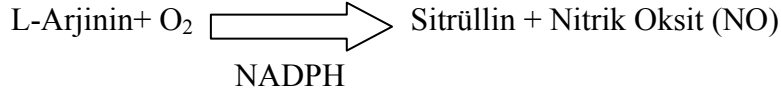
2.2.2.8. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), ilk kez endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak tanımlanmış ve günümüzde birçok memeli hücre ve dokularının fonksiyonlarını düzenlediği anlaşılmıştır. NO, argininin nitrik oksit sentetaz enzim ailesi tarafından oksitlenmesiyle ya kalsiyuma bağımlı ya da indüklenebilir ve kalsiyumdan bağımsız olarak sentezlenir. Endojen olarak üretilen NO konak savunması ve immüniteyi etkilediği gibi kan damar tonusu ve nöronal ileti dahil bir çok fizyolojik olayların düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. NO, bir biyolojik haberci moleküldür. Sinir sisteminde fizyolojik ve patolojik rolleri vardır. Sinir sistemi morfogenezinde ve sinapsların şekillenmesinde rol oynar, nörotransmitter salınımı ve gen oluşumunu düzenleyebilir. NO, aşırı üretilmesi halinde, çeşitli sinir sistemi hastalıklarında önemli bir nörotoksin olarak karşımıza çıkar. Ayrıca, bir çok çalışmada NO'nin inflamatuvar cevapları düzenlemede kompleks bir rol oynadığı anlaşılmıştır (28).

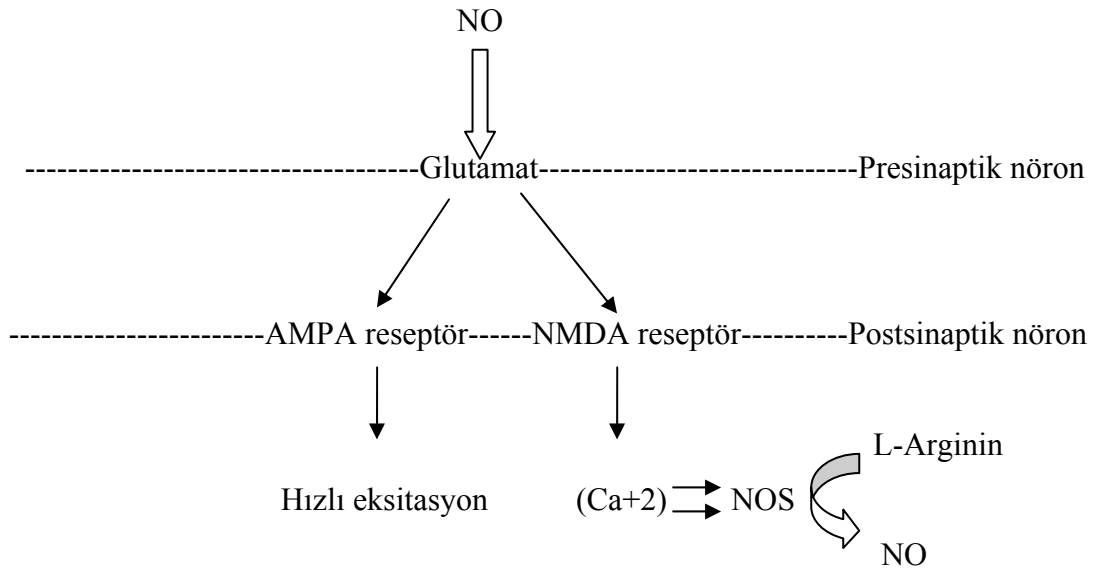
15-20 yıl öncesine kadar nitrik oksidin basit bir atmosfer atığı olduğu düşünülmekteydi. Ancak 1987 yılında, damar endotelinden endotel kaynaklı gevşeme faktörü (EDRF) olarak bilinen yapının izole edilmesi sırasında nitrik oksit sentetaz keşfedilmiş ve daha sonraki yıllarda EDRF'nin NO olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanların da NO üretebildikleri ortaya konmasıyla 1987 yılına kadar insan vücudunda bulunuş nedeni hakkında çok az şey bilinen NO'nin fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü anlaşılmış ve 1992'de yılın molekülü seçilmiştir (29, 30, 31).

NO, renksiz bir gazdır. Yüksek konsantrasyondaki NO oksijensiz ortamda oldukça stabil olup suda erime özelliği gösterir. Düşük konsantrasyondaki NO oksijen varlığında dahi stabildir. Nitrik oksitin üzerinde yük taşımaması ve çiftlenmemiş elektron bulundurması, hücreden hücreye hiçbir bariyerle karşılaşmadan kolaylıkla geçmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda NO, taşıdığı çiftlenmemiş elektron nedeniyle bir radikal molekül olarak isimlendirilebilir. Diğer serbest radikaller her konsantrasyonda hücreler için zararlı iken NO düşük konsantrasyonda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Ancak aşırı ve kontrolsüz NO sentezi hücreler için zararlı olmaktadır. NO, bu özellikleri ile çok ideal bir fizyolojik haberci molekülü özelliği kazanmaktadır (32).

Nitrik oksit sentetaz vücudun çok değişik dokularından (damar endoteli, beyin, makrofaj, üriner sistem dokuları vb.) izole edilmiştir. NOS'un katalize ettiği biyokimyasal reaksiyon Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu reaksiyon aynı zamanda L-arjinin-nitrik oksit yolu olarak ta bilinmektedir (33).



Şekil 1. L-Arjinin-nitrik oksit yolu



Şekil 2. Beyin dokusunda arginin-nitrik oksit yolu

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L-arjininden sentez edilir (34,35). Bu enzimin üç izoformu tanımlanmıştır; nöronal NOS (Tip I NOS, nNOS), indüklenebilir NOS (Tip II NOS, iNOS) ve endotelyal NOS (Tip III eNOS) (33,35). Endotelyal NOS ve nöronal NOS, yapısal NOS olarak da bilinir ve bunların aktiviteleri hücre içi kalsiyumu tarafından düzenlenir. iNOS normal şartlar altında dokularda bulunmaz ve sadece patolojik süreçlerde tespit edilebilir. Transkripsiyonel seviyede kalsiyumdan bağımsız şekilde sentez edilir. Bazı pro-inflamatuar uyarılar iNOS üretimini tetikleyebilirler. Nitrik oksit (özellikle nitrik oksitle ilişkili iNOS) serebral vazospazm, travmatik beyin hasarı gibi çeşitli patolojik süreçlerin gelişiminde önemli role sahiptir. Bu yüzden, nitrik oksit sentaz inhibitörleri söz konusu durumların tedavisinde rol alıyor olabilirler (31,33,36).

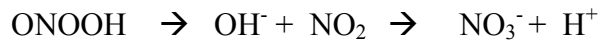
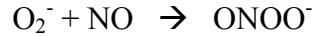
Hücre hasarından sorumlu olan çeşitli mekanizmalar travma ve iskemide benzer şekilde işliyor gözükmektedirler (34, 35).

NO ETKİLERİ

SİTOPROTEKTİF	REGÜLATÖR	SİTOTOKSİK
-Antioksidan	-Vasküler tonus	-Glutamat aracılı NMDA nörotoksitesisi
-Lökosit adezyonunun inhibisyonu	-Hücrel adezyon	- Lipid peroksidasyonu
-TNF toksisitesine karşı koruyucu	-Vasküler permeabilite	- Mitokondrial enzim inhibisyonu
	-Nörotrasmisyon	-DNA hasarı
	-Bronkodilatasyon	
	-Trombosit adezyonunun inhibisyonu	

1- NO, eksitator aminoasit salınımını artırır. Presinaptik sinir ucundan salınan glutamatın postsinaptik nöronlarda N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörüne bağlanması ile hücre içine kalsiyum girişi artar. Kalmodulin ile birleşen kalsiyum nNOS'u aktif hale getirir ve NO sentezlenir. Sentezlenen NO tekrar presinaptik nörona diffüze olarak glutamat salınımını artırır.

2- NO, peroksinitrit ve serbest hidroksil anyonu gibi daha toksik serbest radikallerin oluşumuna neden olur.



Bir serbest radikal olan NO, O_2^- ile reaksiyonu sonucunda peroksinitrit bileşiğine dönüşür. Peroksinitrit OH^- radikali ve nitrojen diokside ayrışır (37).

3- NO, Gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz enzim aktivitesini artırarak glikolitik yolun aktivasyonunu sağlar. ayrıca mitokondriyal elektron transport zinciri ve trikarboksilik asit siklusunun enzimi olan akonitazı inhibe ederek hücrenin enerji kaynağını keser ve adeta solunumu felç eder (38).

i-NOS

İndüklenebilir NOS isoformu olan iNOS in vitro endotoksin ve/veya sitokin uygulaması sonrasında nöronlar, düz kas hücreleri, endotelyum, astrositler, nötrofiller,

makrofajlar ve mikroglialarda yapılır ve salınır. Orta şiddetteki fokal travma sonrası nötrofiller ve makrofajlarda sadece in vivo iNOS indüksiyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu yüzden, kontüzyon sonrası inflamatuvar reaksiyonların ortaya çıkmasından iNOS sorumlu olabilir (20-22) ve inflamatuvar beyin hasarının muhtemel aracısıdır; çünkü iskemi sonrası inflamasyon sürecinde gözlenen iNOS indüksiyonu yıkıcı bir olaydır (39,40,41,42).

iNOS Ca^{+2} 'den bağımsız olarak NO üretir ve sınırlı sekonder düzenleme ile büyük miktarda NO sentez edebilir. Bu bağlamda, iNOS isoformu Ca^{+2} bağımlı olan eNOS ve nNOS enzimlerinden farklılık gösterir. Serebral iNOS travma sonrası 6. saatte başlayan ve 24 ile 48. saatlerde pik yapmak üzere gecikmeli şekilde yapılır ve salınır (39,40,41,42).

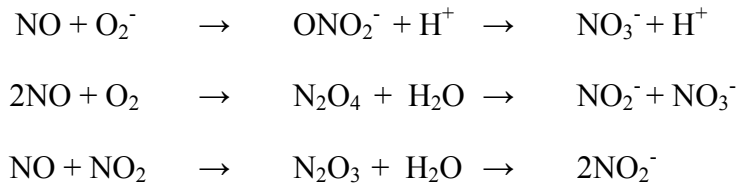
e-NOS

Endotelial NOS isoformu olan e-NOS yapısal olarak normal beyin dokusundaki endotelial hücrelerde yapılır ve salınır. e-NOS tarafından yürütülen NO sentezi iki yönlü olarak kontrol edilir; L- arjinin substratı ele alındığında üçüncü düzenleyici faktör olarak ön plana çıkar; NO sentezi toplam eNOS miktarına ve eNOS'un sadece Ca^{+2} konsantrasyonu yükseldiğinde ve enzime kalmodülün bağlandığında NO sentez ettiği gerçeğine bağlı olarak kontrol edilir. Kontüzyonel beyin travmasından sonraki erken evrede eNOS'un yapımının arttığına dikkat çekmektedir. Böylelikle NO sentezinin arttığı bir durum oluşturulur. Travma sonrası ortaya çıkan eNOS ekspresyonu damar duvarındaki endoteliuma atfedilir. Vasküler NO iki potansiyel faydalı etkiye sahiptir; vazodilatasyonu teşvik etmek suretiyle serebral kan akışının idame ettirilmesinde ve trombositler ve lökositler sayesinde iskemi sonrası kılcal damar tıkanıklığının önlenmesinde rol oynar. Endotelial hücrelerde üretilen NO iskemik modellerdeki infarkt boyutunu küçültür. İn vivo selektif olmayan NO inhibitörü olan N- nitro- L-arjinin veya N-(omega)-nitro-L-arjinin metil esteri (L-NAME) serebral kan akışını azaltır ve kardiovasküler etkilerine bağlı olarak yıkıcı olabilirler. İskemi indüksiyonundan kısa süre sonra eNOS ekspresyonu ve aktivitesi artar. Travma sonrasında hem hipoperfüzyon hem de hiperperfüzyon tespit edilmiştir. Beyin kan akışındaki artışların e-NOS tarafından yönetiliyor olması muhtemeldir (39,40,41,42).

n-NOS

Nöronal NOS isoformu olan n-NOS normalde parenkimal nöronlarda yapılır ve salınır. (6, 43). Ca^{+2} ye bağımlı şekilde NO üretir. Travmatik veya iskemik depolarizasyon hücre dışı glutamat seviyeleri, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör aktivasyonu ile hücre içine Ca^{+2} akışını artırarak NO sentezinin Ca^{+2} gereksinimini karşılar. n-NOS tarafından üretilen NO iskemi sonrası gözlenen infarkt boyutunu genişletir ve bu gözlem, n-NOS indüksiyonunun iskemik beyin hasarında baskın şekilde yıkıcı etkilere sahip olduğuna dikkat çekmektedir (39,40,41,42).

Düşük konsantrasyondaki NO, oksijene nazaran hemoglobine 3000 kat bir affiniteyle bağlanmaktadır. Hemoglobin oksijen formunda ise NO'ü kısa sürede nitrata (NO_3) oksitleyerek etkisizleştirir. Özellikle dolaşımdaki oksihemoglobin NO için kuvvetli bir inhibitördür. NO, nitrite de (NO_2) okside olabilir ancak nitrit tekrar oksitlenerek kısa sürede nitrata dönüşüm gösterir.



NO, diğer serbest radikaller gibi çok kısa yarılanma süresine sahip olup 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata oksitlenir. İn vivo NO'nun son ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitratdır (NO_3^-). NO_2^- ve NO_3^- 'in oranı değişkendir ve kesin olarak öngörülemez. Böylece en iyi total NO üretim indeksi hem NO_2^- hem de NO_3^- miktarlarının toplanmasıdır.

NO aşırı miktarda üretildiğinde fizyolojik nöromodülatör özelliğinden nörotoksik efektör özelliğine geçer. Endotoksin veya sitokinler benzeri ayrı uyaranlar tarafından indükte edilen İNOS ve/veya glutamat toksisitesini yöneten eksitator aminoasit reseptörlerinin ısrarcı stimülasyonunu takiben nNOS aşırı NO üretiminde bulunurlar. NO'nun nöron ölümünü tetiklediği baskın mekanizma NO'nun sitotoksik bir madde olan peroksinitrit ($ONOO^-$) üretmek üzere süperoksit anyonuyla (O_2^-) reaksiyona girmesini ifade eder. Bu reaksiyon oldukça yüksek oranda gerçekleşir ve süper oksit dismutazın (SOD) süperoksit anyon substratıyla rekabet eder. Peroksinitrit, hidroksil radikali gibi çok daha güçlü nörotoksinleri yaratmak üzere proteinleri, lipitleri

ve DNA'yı okside etme ve homolitik şekilde kompozisyonunu bozma yeteneğine sahip olan oldukça reaktif bir moleküldür. NO, mitokondrial solunum zincirindeki kompleks I ve II ile akonitaz benzeri demir-sülfür kümeleri veya tiyol kalıntıları içeren esansiyel proteinlerin fonksiyonu olan nitrosilasyon yoluyla doğrudan hasar yaratabilir (43,44)

Beyin Kontüzyonunda NO

Deneysel beyin kontüzyonu sonrası NO üretiminin arttığı gösterilmiştir; ancak travma sonrası farklı izoenzimlerin yapım ve salınım etkileri ve geçici düzenlenme mekanizmaları büyük oranda bilinmemektedir. NOS inhibitörlerini kullanan öncül çalışmalar travmatik hasarlarda NO nun karmaşık rollere sahip olduğuna işaret etmişlerdir. Wada ve arkadaşları, sıvı perküsyon hasarı sonrası yapısal NOS (e-NOS ve n-NOS) aktivitesinde başlangıçta bir artış olduğunu tespit ettiler ve spesifik olmayan NOS inhibitörleri dışındaki spesifik inhibitörler kullanılarak beyin hasarında gözlenen bu artışın iyileştirilebileceğini ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, bahsedilen çalışmalar NOS'un merkezi sinir sistemindeki çeşitli farklı kompartmanlarda üretildiğini düşündürmektedirler. NO nun etkilerinin anlaşılmasında öncelikle farklı şartlar altında NOS isoformlarının dinamikleri ile hücresel kaynaklarının belirlenmesi gerekir. Bu tip veriler NOS inhibisyonunun beyin hasarını önleme veya ağırlaştırmasına ilişkin karmaşıklığı açıklayabilir. Deneysel beyin kontüzyonu sonrası gözlenen NOS ekspresyonu fokal geçici iskemide gözlenenlerle benzerdir. İskemi veya sıvı perküsyon hasarları çalışmalarından elde edilen veriler ve farklı iNOS, eNOS ve nNOS dinamikleri ile hücresel kaynaklarını gösteren bulgular eNOS'un bölgesel serebral kan akımını arttırmak ve lümen içine hücre birikimini önlemek suretiyle fayda sağlarken, iNOS ve nNOS'un nörotoksik aktiviteye yol açtığı ileri sürmektedir. iNOS yapım ve salınımı travma sonrası inflamasyon sürecinin bir parçasıdır ve kontüzyonel hasarlarda NO'yu hedef alan sinir sistemini koruyucu tedavilerin temel adayı olarak gözükmektedir; çünkü iNOS aktivitesi Ca^{+2} tarafından düzenlenmez ve hasar sonrası beyni infiltre eden inflamatuvar hücrelere bağlı değildir. Sonuçta, deneysel beyin kontüzyonu sonrasında üç NOS izoformu tespit edilir; ancak geçici oluşumları ve doku kompartmanları farklıdır. NO üreten kompartmanlar ve hücreler ayırt edici şekilde düzenlenirler. NO'nun fizyolojik ve patofizyolojik etkilerinin analizinde NO'nun kompartmansal sentezi hesaba katılmalıdır; bu kompartmanlaşma süreci NOS inhibisyonunun hem faydalı hem de yıkıcı olmasının nedenlerini açıklayabilir (40,41,42).

Gahm ve arkadaşlarının “Deneysel kontüzyon sonrası beyindeki üç nitrik oksit sentaz izoformlarının geçici profilleri ve hücrel kaynakları” (40) başlıklı makalelerinde ağırlık bırakma metodu ile fokal beyin kontüzyonu yarattıkları 24 sıçanı immunohistokimyasal ve immunfloresan metodlarla analiz etmişlerdir. Travmadan 6 saat sonra endotelial NOS, indüklenebilir NOS ve nöronal NOS pozitif hücrelerde artış tespit etmişlerdir.

Petrov ve arkadaşları, (39) Marmarou ve arkadaşlarının modelini sıçanlarda kullanarak travmatik beyin hasarı sonrası 4. saatte iNOS yapımının arttığını, 24. saatte endotelial hücrelerde artık iNOS mRNA yapımı olmadığını ve makrofajlar ile nöronlardaki iNOS yapımının %30-50 azaldığını göstermişlerdir. TBH sonrası 4. ve 24. saatlerdeki iNOS ekspresyonu değerlendirildiğinde söz konusu çalışma sürelerinin bu genin ekspresyonu dahil hücrel olayların başlaması ve idamesi için kritik olduğu görülmüştür. Beyin travması sonrasındaki 4 saate kadar uzayan periyot hücrenin korunması için bir “fırsat penceresi” olarak düşünülmüştür. Marmarou ve arkadaşlarının darbe akselerasyon metodunun sıçanlarda uygulanmasıyla iNOS geninin hasar sonrası 3 saatten önce up-regüle olmadığını göstermişlerdir ve yine 24. saatte ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Dahası, iNOS up-regülasyonu ile ilişkili olan apoptotik hücre ölümü iNOS ekspresyonunda düşüşün gözlendiği 24. saatten sonra azalma sergilemiştir. Ayrıca, histolojik kriterlerle değerlendirildiği üzere iNOS sentez inhibisyonu TBH sonrası nöropil cevabının ilerlemesine yol açmıştır.

Deneysel beyin kontüzyonundan sonra hasar gören sahalarda erken evreli eNOS ve iNOS ekspresyonunun tetiklendiği gösterilmiştir. Hasar gören sahalardaki nNOS-pozitif hücrelerin sayısı başlangıçta istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış ve akabinde bir azalma sergilemişlerdir. Bu paternler ve isoform kaynakları erişkin sıçanlardaki fokal hasarlara spesifik gözükmedirler. eNOS ve iNOS seviyelerindeki artışlar lokal NO seviyelerindeki artışlara bağlanabilir ve yerel NO artışları vasküler tonus, vasküler duvar bütünlüğü ve nörotoksik serbest radikal seviyelerini etkilediği bildirilmiştir. Hasarlı beyin sahasına infiltre olan hücrelerdeki iNOS sentezi potansiyel olarak nöron hasarına neden olan önemli bir NO kaynağı olarak gözükmektedir (39,40,41,42).

İskemik Beyin Hasarında NO

İskemik beyin hasarı ile ilgili olarak yapılan NO ile ilgili çalışmalarda endotelial NOS'un iskemik hasara karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir. Zira eNOS vazodilatasyon yapmakta, lökosit ve trombosit adhezyonunu azaltarak koruyucu etki göstermektedir.

Üç NOS isoformunun belirlenmesi ise konuya ilişkin karmaşayı artırmıştır. Selektif nNOS inhibitörlerini veya nNOS'dan yoksun fareleri kullanan çalışmalar serebral iskemik hasarda azalma oluştuğunu gösterdiler. nNOS'un yönettiği nörotoksik mekanizması net değildir. nNOS, in vitro olarak NMDA nörotoksitesini yönetir. Fokal iske mi sonrası gözlenen erken evreli artışlar geçici olarak NMDA toksitesisiyle korele ediyor olup nNOS'un patojenik özelliğine dikkat çekmektedir. Diğer taraftan, erken evrede eNOS tarafından endotelial NO üretilmesi nöronal NO nun nörotoksik potansiyeline baskın çıkan vasküler etkiler nedeniyle fayda sağlıyor gözükmektedir. Birkaç saat sonra iNOS yapılıp salındığında, NO toksitesisi ilerleyici hasara neden olur ve beyin için yıkıcıdır. Spesifik iNOS inhibitörü olan aminoguanidinle tedavi edilen hayvanlar ve iNOS'dan yoksun olan fareler orta serebral arter oklüzyonu sonrasında kontrol hayvanlarından daha küçük infarkt sahaları sergilemişlerdir. Böylelikle, iNOS'un iskemide yıkıcı etkilere sahip olduğuna ilişkin hipotez yeterince doğrulanıyor gözükmektedir (42).

NOS, astrosit fonksiyonu üzerindeki etkileri yoluyla da beyin hasarını indükleyebilir. NO, astrositlerin glutamat alımını azaltma yeteneğindedir. Global iskemide, reaktif astrositlerdeki iNOS indüksiyonu baskın olup perinöral glutamat seviyelerini artıran NO salınımıyla sonuçlanır. Neticede ortaya çıkan uzun vadeli NMDA reseptör potansiyasyonunun kendisi de yıkıcıdır; ancak aynı zamanda nöronlar ve endotelial hücrelerde Ca^{+2} ye bağımlı enzimler yoluyla ilave NO sentezinin yapılmasına neden olabilir (43,44).

Sitokinlerin uyardığı astrositler mitokondrial solunum zinciri komponentlerini inhibe eden nitrik oksit (NO) ve metaboliti olan peroksinitriti (ONOO-) üretirler. Astrositik NO, ONOO⁻ üretimi için süper oksitle tepkimeye girebilir. Kompleks II/III (süksinat sitokrom c redüktaz/sitokrom c oksidaz) aktivitesi zamanla iyileşirken NO üreten astrositlerle yapılan 48 saatlik eş zamanlı kültürün yol açtığı kompleks IV (sitrat

sentaz) hasarı geri dönüşümsüzdür. Bu yüzden, nöronlar kısa süreli mitokondrial kompleks II/III (süksinat sitokrom c redüktaz/sitokrom c oksidaz) ve IV (sitrat sentaz) hasarını iyileştirebilirken daha uzun süreyle astrosit kökenli NO'ya maruz kalmak kalıcı nöronal kompleks IV (sitrat sentaz) hasarına neden oluyor gözükmektedir. Gözlenen nöronal mitokondrial solunum zinciri hasarından ONOO⁻ sorumlu olabilir. Çünkü kompleks IV (sitrat sentaz) aktivitesi özellikle lipid peroksidasyonuna karşı hassastır ve ONOO⁻ lipid peroksidasyonunu başlattığından, bu durum NO/ONOO⁻ 'ye maruz kalan nöronlardaki geri dönüşümsüz kompleks IV (sitrat sentaz) kaybını açıklayabilir (45,46).

Sonuç olarak nöronlar kısa vadeli mitokondrial kompleks II/III (süksinat sitokrom c redüktaz/sitokrom c oksidaz) ve IV (sitrat sentaz) hasarını iyileştirebiliyor gözükürlerken nöronların daha uzun süreyle astrosit kökenli iNOS aktivitesine maruz kalmaları nöronal kompleks IV'te (sitrat sentaz) kalıcı hasarla sonuçlanır. Bu gözlemler in vivo durum açısından önemli anlamlara sahip olup nöronların kısa süreyle oksidatif strese maruz kalmalarının kalıcı bir defisitten ziyade kısa süreli mitokondrial solunum zinciri hasarına yol açabileceğini düşündürmektedir. Aksine, uzun süreyle okside edici türlere maruz kalmak nöron hücresi ölümüne yol açan mitokondrial solunum zinciri hasarıyla sonuçlanabilir (47,48).

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarından temin edilen 150-200 gr. arasında olan 40 adet Winstar-Albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma 1246-TU-06 proje numarası ve SDÜ hayvan etik kurulu kararı yönergeleri doğrultusunda deney için dört grup oluşturuldu.

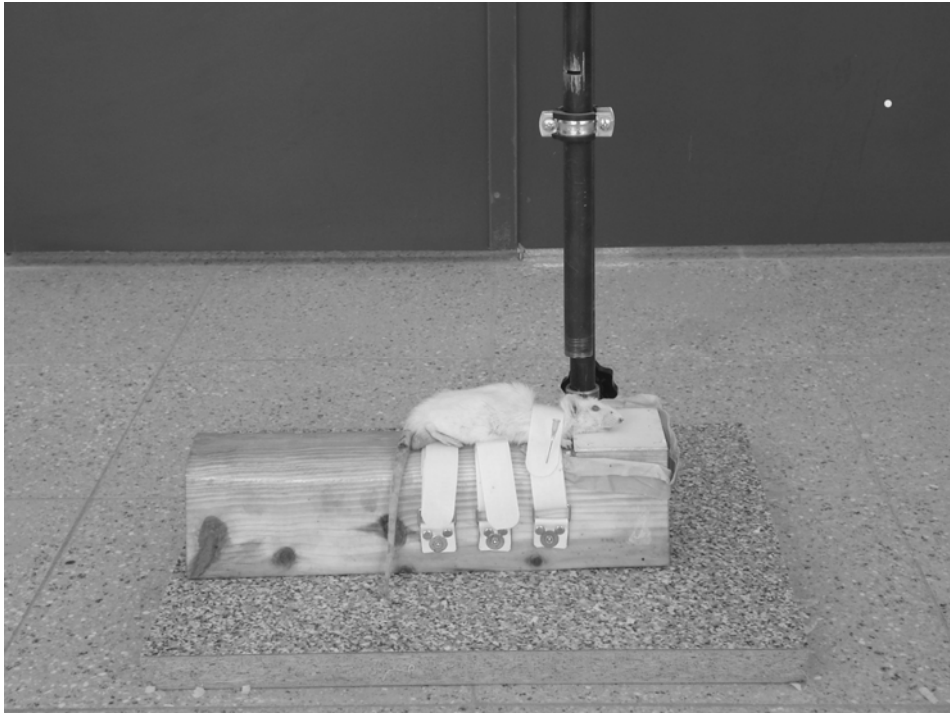
1.grup: Sham grubu (n=10); sadece cilt insizyonu yapılan grup

2.grup: Travma grubu (n=10); cilt insizyonu ve travma yapılan grup

3.grup: Sham vehicle grubu (n=10); travma yapıp 1 ve 24 saat sonra intraperitoneal 10cc/kg (2cc) serum fizyolojik verilen grup

4.grup: Travma yapılarak 1 saat sonra ve 24 saat sonra intraperitoneal 100 mg/kg (2 cc) Aminoguanidine hemisulfat verilen grup.

Diffüz kafa travması Marmarou'nun impakt-akselerasyon modeli kullanılarak oluşturuldu. Burada tanımlanan modelde 2 metre ve 1 metreden travma oluşturmak mümkündür (49,50). Travma düzeneği için iç çapı 19 mm. olan çelik boru kullanılmıştır. Ağırlık olarak her birinin çapı 18 mm. ve ağırlığı 50 gram olan 9 adet (toplam ağırlık 450 gram) pirinç ağırlık kullanılmıştır. Bu şekilde 0.45 kg/mt güç oluşturulmuştur.



Şekil 1. Travma modeli

Sıçanlar intraperitoneal 12 mg/kg Ketamin (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 2 mg/kg Xylazin (Rompun, Bayer, İstanbul) uygulaması ile uyutuldu, yeterli anestezi sağlandığı kornea refleksi bakılarak kontrol edildi. Sıçanlar travma için önceden hazırlanan düzeneğe prone pozisyonda konumlandırıldı. Sıçanların kranyum ciltaltı dokusuna %0.25'lik 0.5cc. bupivakain ile lokal anestezi uygulandı. Cilt ve ciltaltı insizyonu 20 no bistüri ile gerçekleştirildi. Koronal ve lambdoid suturlar açığa konarak ikisinin arasında ve orta hatta olacak şekilde 10 mm. çapında ve 3 mm. kalınlığında çelik disk dental akrilik ile kranyuma sabitlendi. Daha sonra 1 metre yükseklikten 450 gr. ağırlık kranyum üzerine düşürülerek künt kafa travması oluşturuldu.

Birinci grupta sadece cilt insizyonu yapıldı. İkinci grupta ise cilt insizyonu sonrası travma oluşturuldu. Travmadan 1 ve 24 saat sonra 3.gruba intraperitonel serum fizyolojik, 4.gruba ise Aminoguanidin hemisulfat intraperitoneal olarak verildi.

Birinci gruptan bir sıçan anestezi indüksiyonu sonrası, ikinci ve üçüncü gruptan birer sıçan ve dördüncü gruptan iki sıçan travma sonrası ölmesi nedeniyle çalışmadan çıkarıldılar.

Travmadan 72 saat sonra, intrakardiak KCl verilerek sıçanlar sakrifiye edildi. Daha sonra hızla dekapite edilerek zarar vermeden beyin hemisferleri çıkarıldı. Deneklerin verteks hizasında orta hattan olacak şekilde travma bölgesi merkezlenerek her iki frontoparyetal bölgeyi içine alacak şekilde üst ½ beyin doku örnekleri (korteks ve subkortikal bölge) alındı. Alınan örnekler daha sonra Ependorf tüpüne konularak biyokimyasal analiz yapılmak üzere -80 derecede saklandı.

Nöral dokuda lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak, Malondihaldehit (MDA) düzeylerinin tayini için (Okhawa ve arkadaşlarının) spektrofotometrik yöntemi kullanılmıştır (35,51). Beyin dokusu fosfat tampon ile homojenize edildikten sonra 0.5 ml homojenizata 2.5 ml %10'luk TCA eklendi. 15 dakika kaynatıp hemen soğutma işlemine geçildi. 5000 devir/dk'da 10 dakika santrifüje edildi. 2 ml süpernatant alıp üzerine 1 ml % 0.67'lik TBA eklendi, 15 dakika kaynatılarak hemen soğutuldu. 532 nm'de numune yerine distile su koyarak hazırlanan köre karşı spektrofotometrede okutuldu. Yöntem doku homojenatında peroksit lipidlerin yıkım ürünü olan MDA'nın, tiyobarbitürik asid (TBA) ile reaksiyonu sonucunda oluşan renkli ürünün miktar tayini

prensibine dayanmaktadır. Dokuda lipid peroksidasyonla ilgili sonuçlar, nmol MDA/ gr. doku olarak verilmiştir (51).

Nitrit oluşumu ölçülerek beyin dokusu homojenatlarında nitrit/nitrat düzeyi tespit edildi. Örnekte bulunan nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite indirgeni. İndirgenen nitrat ve nitrit (total nitrit ve nitrat) kırmızı mor diazo rengini vermek üzere sülfanilamit ve N-(1-naftil)-etilen diamin diklorit ile reaksiyona girdi. Diazo boyası 550 nm değerindeki absorbansta ölçüldü (nitrate/nitrite colorimetric assay kit, Cayman Chemical, catalog no: 780001) ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Elde edilen değerler $\mu\text{mol} / \text{gr. ıslak doku}$ şeklinde ifade edildi (51).

Veriler ortalama \pm Standart Deviasyon olarak ifade edilmiştir. Veriler önce Kruskal-Wallis Anova testiyle karşılaştırıldı. İleri grup karşılaştırmaları Mann Whitney U testi ile değerlendirildi. Olasılık seviyesi (p değeri) < 0.05 olan farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. SONUÇLAR

Sadece cilt kesisi yapılan deneklerden (1.grup) frontopariyetal bölgeden alınan örneklerde nitrit/nitrat düzeyi ortalama ve standart deviasyon değeri; $9.80 \pm 0.68 \mu\text{mol}/\text{gr}$, MDA düzeyi ise $53.29 \pm 13.14 \text{ nmol}/\text{gr}$ olarak bulundu.

Cilt kesisi oluşturulduktan sonra travma oluşturulan deneklerden (2.grup) alınan beyin dokusu örneğinde nitrit/nitrat düzeyi $10.83 \pm 1.72 \mu\text{mol}/\text{gr}$, MDA düzeyi ise $48 \pm 23.79 \text{ nmol}/\text{gr}$ dı.

Kesi ardından travma oluşturulan ve travma sonrası 1. ve 24. saatlerde intraperitoneal serum fizyolojik verilen gruptan (3.grup) alınan beyin dokusunda nitrit/nitrat düzeyleri; $9.70 \pm 0.72 \mu\text{mol}/\text{gr}$, doku MDA değeri ise $36 \pm 9.2 \text{ nmol}/\text{gr}$ olarak bulundu.

Kesi ardından travma oluşturulan ve travma sonrası 1. ve 24. saatlerde intraperitoneal Aminoguanidine verilen gruptan (4.grup) alınan beyin dokusu örneğinde nitrit/nitrat düzeyi; $9.28 \pm 1.25 \mu\text{mol}/\text{gr}$, doku MDA değeri ise $41.80 \pm 6.33 \text{ nmol}/\text{gr}$ olarak bulundu.

1.grup ile 2.grup arasında alınan doku örneklerinin nitrit/nitrat sonuçlarının ortalama ve standart deviasyon değerleri karşılaştırıldığında nitrit/nitrat düzeyi 2.grupta daha yüksek çıktı ancak istatikselsel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0.171$).

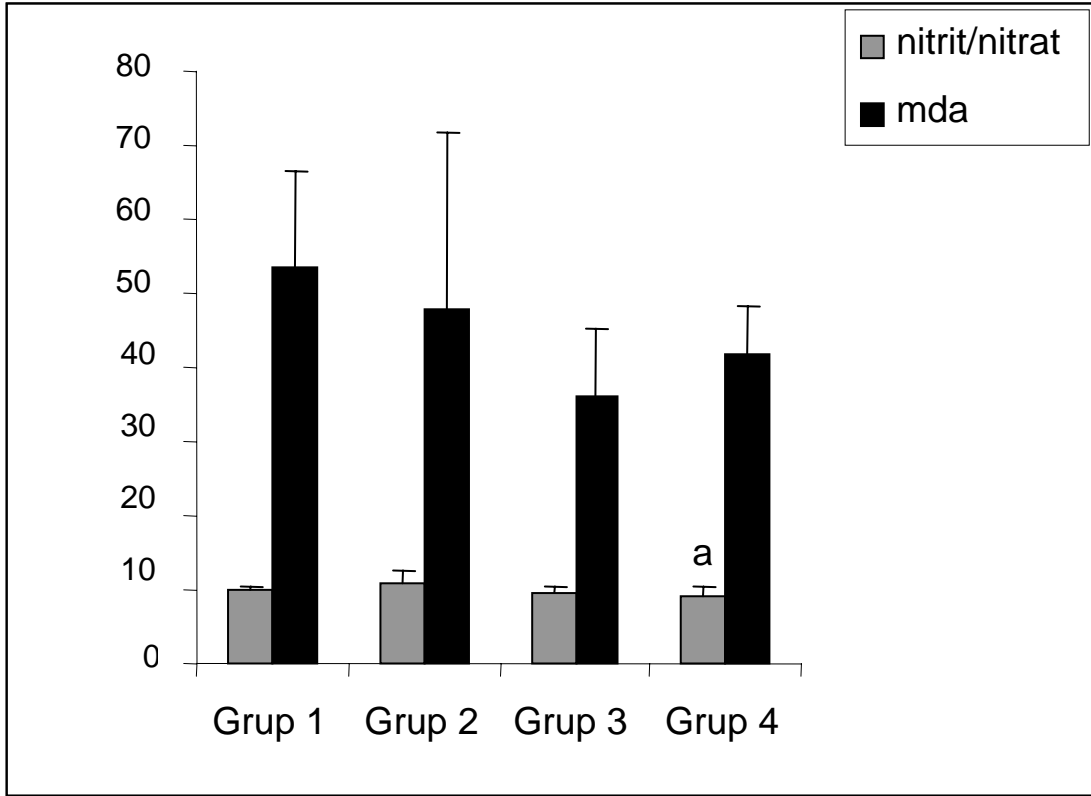
2.grup ve travma oluşturduktan sonra SF uyguladığımız 3.grup arasında alınan doku örneklerinin nitrit/nitrat değerleri ortalama ve standart deviasyon değerleri karşılaştırıldığında 3. grupta nitrit/nitrat değerlerinin daha düşük çıktığı görüldü ancak istatikselsel olarak anlamlı değildi ($p= 0.122$).

2.grup (travma grubu) ile 4.grup (tedavi grubu) arasında alınan doku örneklerinde ise nitrit/nitrat değerlerinde istatikselsel olarak anlamlı düşme bulundu ($p= 0.016$, $p< 0.05$).

MDA sonuçları açısından 1.ve 2.grup arasında alınan doku örneklerinin ortalama ve standart deviasyon değerleri karşılaştırıldığında 2. grupta MDA düzeyi daha düşük değerde çıktı fakat istatikselsel olarak anlamlı değildi ($p= 0.200$). MDA'nın diğer gruplar arası karşılaştırmasında anlamlı fark gözlenmedi ($p> 0.05$).

Tablo 2. Tüm deneklerin beyin dokusundan alınan örneklerdeki nitrit/nitrat ve MDA düzeyleri.

	1.GRUP (n=9)	2.GRUP (n=9)	3.GRUP (n=9)	4.GRUP (n=8)
Nitrit/nitrat düzeyi	9.80 ± 0.68	10.83 ± 1.72	9.70 ± 0.72	9.28 ± 1.25
Malondialdehid düzeyi	53.29 ± 13.14	48 ± 23.79	36 ± 9.28	41.80 ± 6.33



Grafik 1. Beyin nitrit/nitrat ($\mu\text{mol/g}$) ve MDA (nmol/g) düzeyleri.

(^a $p < 0.05$ Travma grubu (Grup 2) ile karşılaştırma.)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Beyin parankimasındaki birincil hasarın bir tedavisi yoktur. Son yıllarda, ikincil beyin hasarına dair yapılan kliniksel ve laboratuvar araştırmaları sonucunda daha önceden bilinmeyen kafa travmasını takip eden metabolik düzensizlikleri açıklamıştır. Bunlar, daha yeni anlaşılmaya başlanan travmatik beyin hasarının bazı moleküler ve biyokimyasal mekanizmaları ve eksitator aminoasitlerin rolü, beyindeki serbest radikallerin biyolojisi, sitokinler, nöroendorfinler ve nitrik oksidin etkilerini içermektedir (1,4).

Sekonder beyin hasarına neden olan pek çok etken tanımlanmıştır. İkincil beyin hasarına neden olan durumlar sistemik ve kafa içi nedenler olarak ikiye ayrılabilir. Hücresel düzeyde nöronal hücre ölümlerine neden olarak beyin hasarı yaratan birçok biyokimyasal oluşumlar mevcuttur. İkincil hasarı meydana getiren mekanizmalar kısaca řu şekilde özetlenebilir:

a) Eksitator aminoasitlerin neden olduğu hücre içi kalsiyum artışı çok sayıda zararlı proteazları ve lipazları aktive eder (fosfolipaz A₂, lipooksigenaz ve siklooksigenaz gibi). Bu enzimler arşidonik asidi tromboksan A₂, prostaglandinler, lökotrienler ve serbest aminoasitlere dönüştürür. Bu bozulma ürünleri oksijen serbest radikallerini üretir (22). Süperoksit (O²⁻), hidroperoksil (HO²⁻), hidroksil (·OH) ve diğer pek çok radikal ile başlatılan lipid peroksidasyon süreci hücre membranını oksidize ederek membran bütünlüğü kaybolur.

b) Glutamat ve aspartat eksitator aminoasitleri hücre içinde aşırı kalsiyum birikimine neden olmakta bu da serbest radikallerin oluşumu ve lipid peroksidasyonu ile sonuçlanan süreci tetiklemekte aynı zamanda da mitokondriyal solunumu engelleyen ve toksik hidroksil radikalleri oluşturan kalmodulin bağlantılı nitrik oksit sentezinin aktivasyonuna neden olmaktadır (13).

c) Hücre içi kalsiyumun yükselmesi oksidatif fosforilasyonun bozulmasına, toksik serbest radikallerin oluşumuna, hücresel enzimlerin artmasına ve hücre metabolizmasının çözülerek ölümüne neden olur (17).

d) Travmadan sonra beyin dinorfin seviyelerinde belirgin artış dikkat çekmiş ve bu endojen opioidin artış bölgelerinin fokal histopatolojik doku hasarı ve serebral kan akışı ile ilgili olduğu bulunmuştur (11).

e) Travmayı izleyen çeşitli nöropatolojik süreçlerle ilişkili olan sitokinler interlökinleri (interlökin-1, interlökin-6 ve interlökin -8) ve tümör nekrotizan faktörünü içerir (19).

f) Travma sonrası hiperglikoliz ve laktat birikimi görülür ve hücre içi laktik asit meydana gelir. Fazla laktik asit hücre ölümüne yol açabilir (10).

Nitrik oksit'te çeşitli mekanizmalar ile bu patofizyolojik süreçte yer almaktadır. NO sentezi için NOS induksiyonu meydana gelmekte hücrel kaynağına ve göreceli kompartman durumuna göre üç ayrı NOS paterni karşımıza çıkmaktadır. İndüklenebilir NOS (iNOS) travma, endotoksin veya sitokin uygulaması sonrasında nöronlar, astrositler, mikroglialar, makrofajlar, nötrofiller, düz kas hücreleri, endotelyumdan salınabilir. İnflamatuar hücreler genellikle iNOS kaynağı olarak görülürler. Nöronal NOS isoformu Ca^{+2} dan bağımsız olarak NO üretir. Nöronal NOS (nNOS) normalde beyin parankiminde yapılı ve salınır. Travma sonrasında glutamat ile NMDA reseptör aktivasyonu sonrasında hücre içi artan Ca^{+2} ile NO sentezini artırır. nNOS NMDA nörotoksitesini yönetir. Endotelial NOS (eNOS) ise normal beyin dokusundaki endotelial hücrelerden salınır. NO sentezi L-Arjinin substratı, toplam eNOS miktarı ve Ca^{+2} konsantrasyonu yükseldiğinde NO sentezi artar. Travma sonrası ortaya çıkan eNOS endotelial kaynağıdır. Vazodilatasyonu sağlayarak serebral kan akışını idame ettirir.

Sonuçta deneysel beyin travması sonrasında üç NOS izoformu sentezi artar, ancak geçici oluşumları ve doku kompartmanları farklıdır. Bu kompartmanlaşma süreci NOS induksiyonunun ve inhibisyonunun faydalı ve zararlı olabilmesini açıklar.

NO, eksitator aminoasit salınımını artırır. Presinaptik sinir ucundan salınan glutamatın postsinaptik nöronlarda N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörüne bağlanması ile hücre içine kalsiyum girişi artar. Kalmodulin ile birleşen kalsiyum nNOS'u aktif hale getirir ve NO sentezlenir. Sentezlenen NO tekrar presinaptik nörona diffüze olarak glutamat salınımını artırır.

NO, peroksinitrit ve serbest hidroksil anyonu gibi daha toksik serbest radikallerin oluşumuna neden olur. Bir serbest radikal olan NO, O₂⁻ ile reaksiyonu sonucunda peroksinitrit bileşiğine dönüşür. Peroksinitrit OH⁻ radikali ve nitrojen dioksitide ayrışır (37).

NO; Gliseraldehid 3-fosfat dehidrojenaz enzim aktivitesini arttırarak glikolitik yolun aktivasyonunu sağlar. ayrıca mitokondriyal elektron transport zinciri ve trikarboksilik asit siklusunun enzimi olan akonitazı inhibe ederek hücrenin enerji kaynağını keser ve adeta solunumu felç eder (38).

Çalışmamızda Marmaraou'nun tanımladığı travma modeli kullanılmıştır (49,50). Bu sistemde pleksiglas bir tüp içerisinde segmentli pirinç ağırlığın serbest düşmesinden oluşan basit bir ağırlık düşürme cihazı kullanılarak kafa hasarı yaratılmaktadır. Kalvaria üzerine küçük bir paslanmaz çelik disk yapıştırılarak kafa tasının kırılması önlenemez. İki metreden 450 gr. ağırlık (0,9 kg/m²) düşürülerek ve bir metreden yine 450 gr. ağırlık (0,45 kg/m²) düşürülerek yaygın beyin hasarı oluşturmak mümkündür. Diffüz beyin hasarı yüksek mortalite ve morbidite oranlarıyla birliktelik gösterir. Travmatik koma veri bankası çalışma grubunun yaptıkları güncel çalışmalar hastaneye başvuru anında komada olan hastaların %50'sinin yaygın beyin hasarından muzdarip olduklarını ve bu hastaların %12,6'sının normal bilgisayarlı tomografi bulgularına sahip olduklarını göstermektedir. Bu tipte bir hasarın laboratuvar şartlarında oluşturulması güçtür; çünkü sıvı-perküsyon veya kortikal darbe benzeri mevcut modeller fokal beyin kontüzyonu ve/veya laserasyon ile birlikte deprese kafatası kırığı yaratırlar. Böylelikle yaratılan lezyonun fokal tabiatına bağlı olarak bu modellerden elde edilen sonuçlar insanlarda gözlenen diffüz aksonal hasar aralığını yansıtamama nedeniyle eleştirilmişlerdir. Bizim kullandığımız modelde ise koruma altındaki sıçan kafasına yönelik bir darbe akselerasyonu tasarlanmıştır ve böylece deprese kafa kırığından veya dura matere yönelen travmadan kaynaklanan fokal serebral korteks hasarlarından kaçınılmıştır. Modelin anahtar özelliklerinden olan köpük yatak hareket ve akselerasyon serbestisi sağlamakta böyleliklede koup ve kontr-koup lezyonların önlenmesi sağlanmaktadır (49,50).

1991 yılında Nowicki ve arkadaşları tarafından farede kalıcı fokal serebral iskemi ile indüklenen kortikal infarkt hacminin L-NA tarafından azaltıldığını gösteren

ilk raporun yayınlanmasından günümüze dek NOS inhibitörlerinin tedavi edici potansiyelleri vurgulanmıştır (14). NOS aktivitesinin kısmi inhibisyonu kalıcı serebral iskemide uygulanan fare modelinde koruma sağlamaya yeterli olmuştur. Bununla birlikte, selektif olmayan NOS inhibitörlerinin iskemide üzerindeki etkilerine ilişkin çelişkili sonuçlar bildirilmiştir; bu sonuçlar iskemide hasarın azaltılmasından başlayıp ağırlaştırılmasına kadar uzanır. Multipl L-NA uygulanan bir diğere iskemide çalışmasında ise L-NA'nın koruyucu olmadığına dair elde edilen bulgular selektif olmayan etkinin koruyucu rol oynayan eNOS aktivitesine bağlanmıştır (52).

Nitrik oksit sentetaz inhibitörleri non-spesifik inhibitörler ve spesifik inhibitörler olarak ayrılmaktadır. Non-spesifik inhibitörler Nitro-L-Arginin (L-NA), Nitro-L-Arginin Metil Esteri (L-NAME) gibi arginin türevleri yer alır. Bunlar her üç NOS formunu (eNOS, nNOS ve iNOS) bloke ederler. Bu formlar hem travma hem de iskemide modellerinde denenmişlerdir. L-NA ve L-NAME gibi selektif olmayan NOS inhibitörleri serebral iskemide hasarı arttırabilirler, azaltabilirler veya sonucu etkimeyebilirler (14). Ancak nNOS ve iNOS inhibitörleri serebral iskemide hasarı azaltabilirler. Zira eNOS aktivitesi koruyucu olarak rol oynamaktadır. nNOS'tan yoksun farelerde iskemide hasar belirgin şekilde azalırken eNOS'un L-NA ile inhibe edilmesi farelerdeki infarkt boyutunu genişletmiştir (12). Yine L-NAME ile yapılan bir başka çalışmada NO'nun serebral iskemide hem yararlı hemde yıkıcı olduğuna vurgu yapılarak, selektif olmayan NOS inhibitörü serebral iskemideki enfarkt hacmini azaltabilir yada iskemide hasarı arttırabilir sonucuna varılmıştır (53).

Benzer şekilde, travmatik beyin hasarında selektif olmayan NOS inhibitörleri sinir sistemini koruyucu etki gösterebilirler. Ancak zararlı eNOS inhibisyonuna bağlı olarak hasarı daha da ağırlaştırabilirler. Bu durumda eNOS aktivitesini ayıran selektif NOS inhibitörlerinin kullanımı gereksinimine işaret etmektedir. Enzimatik ve fonksiyonel deneylerde in vitro seçicilik bulunmamasına rağmen selektif nNOS inhibisyonunun kusursuz örneği olarak düşünülen ilk ajan 7-nitroindozoldür ve deneysel felç ve travmada koruma sağladığı gösterilmiştir (14). Güncel olarak, selektif nNOS inhibitörleri olan ARL 17477 ve 1-(2-trifluorometil femil) imidazol (TRIM) kullanımında iskemide beyin hasarının azaldığı gözlenmiştir. L-NA ve bir antioksidanın (örneğin, süperoksit anyon yakalayıcısı) kombine edilmesinin geçici fokal iskemide sinerjik korumayla sonuçlandığının gözlenmesi selektif nNOS inhibitör aktivitesi ile

antioksidan özellikleri birleştiren bileşikler test edilmesine yol açmıştır. Çift inhibisyon etkisine sahip olan bu yeni ajan serisinin prototipi, BN 80933, geçici fokal serebral iskemide infarkt hacmini azaltmış ve nörolojik tabloyu düzeltici etki yapmıştır. Muhtemel sinir sistemini koruyucu ajanlar olarak iNOS inhibitörleri de değerlendirilmiştir. Göreceli şekilde spesifik İNOS inhibitörleri olan aminoguanidin ve agmatin ile hazırda bulunan en selektif iNOS inhibitörü olan 1400 W tedavisi sonrasında deneysel iskemideki infarkt boyutunda azalma gösterilmiştir. Sıçanlarda orta serebral arter oklüzyonunun başlamasından sonra 12. ve 24. saatte uygulandığında en büyük etkiyi gösteren ajan aminoguanidin olmuştur. Bu durum iNOS ekspresyonunun hasarın gecikmeli şekilde yayılmasına neden olan önemli bir faktör olduğunu da düşündürmektedir (34).

Aminoguanidin (AG), kimyasal olarak birbirine eşit iki guanidin nitrojen grubu içeren nükleofilik bir hidrazin bileşiğidir. İlk olarak hücre içi ve hücre dışındaki proteinlerin glikozilasyonu ile meydana gelmiş glikasyon son ürünlerinin (GSÜ) oluşumunu nonenzimatik yoldan inhibe eden bir ajan olarak tanımlanmıştır. Hücre içinde bu ürünlerin (GSÜ) birikimi, diyabetin vasküler, nöronal ve kollajen değişiklikleri ile seyreden komplikasyonlarının ortaya çıkması ile ilişkilidir. Bu nedenle aminoguanidin ilk olarak diyabetik komplikasyonların önlenmesine yönelik yapılmış deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Daha sonra yapısındaki hidrazin grubunun iNOS'a özgü inhibitör etkiden sorumlu olduğu gösterilmiş ve bilinen ilk selektif iNOS inhibitörlerinden biri olarak deneysel çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (54).

N-mometil-L-arjinin (L-NMMA) NOS enziminin üç izoformunu da inhibe edebilen nonselektif bir NOS inhibitörüdür. L-NMMA ile aminoguanidinin karşılaştırıldığı farmokinetik incelemelerde aminoguanidinin NMMA'ya göre eNOS'u 40 kat daha az baskıladığı, nNOS'a göre iNOS'u ise 20-30 kat daha güçlü baskıladığı gösterilmiştir. BU bulgular aminoguanidinin iNOS'a selektivitesini göstermektedir (54).

Aminoguanidin, yarılanma ömrü 6-8 saat kadar kısadır. Hemisülfat ve bikarbonat tuzu şeklinde iki kimyasal formda bulunur. Hemisülfat formu serum fizyolojik içerisinde kolay eridiği halde bikarbonat tuzu erimez (54).

Aminoguanidin deneysel serebral iskemi ve serebral travma modellerinin tedavisinde etkili olduğu bildirilmiş olan oldukça güçlü ve selektif iNOS inhibitörüdür (9,13,15,18,19). Wada ve arkadaşları (55) AG tedavisinin sıçanlardaki travmatik beyin hasarı sonrası iNOS aktivitesi ve total nekrotik nöron sayısını azalttığını ve AG'nin sitokin salınımı ve prostoglandin veya lökotrien sentezi gibi sekonder hasar süreçlerini azaltarak sinir sisteminin koruyucu bir etki gösterebileceğini bildirmişlerdir. V.Danielisova ve arkadaşları (42) ise selektif iNOS inhibitörü aminoguanidini (100 mg/kg) üç gün süreyle, iskemi modeli olarak dört damar oklüzyonu uyguladıkları sıçanlarda NADPH-diaforaz (sinir dokusunda NOS enzimi tarafından üretilen NO'nun yerini tespit etmede kullanılır) pozitif hücre sayısını kontrol düzeyine indirerek koruyucu etki gösterdiğini göstermişlerdir. O.Soy ve arkadaşları deneysel spinal kord hasarında aminoguanidinin etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak spinal kord travmasını takip eden ilk saat boyunca spinal kord dokusunda nitrik oksit seviyelerinin yükselmediğini bulmuşlardır. Travmayı takip eden 3. ve 5. günde spinal kord dokusunda nitrik oksit seviyeleri belirgin şekilde yükselmiştir. Travmadan hemen sonra başlatılan aminoguanidin tedavisinin (100mg/kg) hem nitrik oksit üretimini hem de lipid peroksidasyonunu önlediğini ve hayvanların fonksiyonel durumunu geliştirdiğini göstermişlerdir (51).

Yaptığımız deneysel çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar önce Kruskall Wallis Anova yöntemi ile analiz edildi. Sonuçların anlamlı çıkması üzerine daha ileri aşamada Mann Whitney-U testi yapıldı. Nitrit/nitrat düzeyleri açısından travma grubunda sham grubuna oranla değerlerin artma gösterdiği ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir. Travma grubu (2) ile Aminoguanidine tedavisi uygulanan (4) grup karşılaştırıldığında ise istatistiki olarak anlamlı sonuç elde edildi ($p=0,016$). Bu sonuç Aminoguanidinin iNOS inhibisyonunun bir sonucu olarak değerlendirilmelidir.

MDA düzeylerine bakıldığında MDA'nın travma grubunda sham grubuna artmadığı hatta azaldığı görülmüştür. Bu nedenle diğer grup incelemelerindeki sonuçlar çok değerli kabul edilmemiştir.

Bu deneysel çalışmada doku NO seviyelerinin travma sonrası günlerde anlamlı şekilde arttığını meydana çıkarmıştır. Bu artışın temel kaynağı muhtemelen iNOS'dur. iNOS aşırı NO üretimi ile ilişkili olup bu çalışmada gösterildiği üzere diffüz kafa

travmasını takip eden sekonder hasar üzerinde faaliyet gösteren önemli bir fizyopatolojik mekanizmadır. Travmayı hemen takiben başlatılan aminoguanidin tedavisi nitrit/nitrat değerlerinde anlamlı düşmeye yol açmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar farklı modellerde ve deney hayvanlarında da Aminoguanidin'in etkinliğinin araştırılmasına yönelik çalışmalar için öncül bir çalışma olarak kabul edilebilir.

6. ÖZET

Deneysel Diffüz Beyin Hasarında Nitrik Oksit Sentetaz İnhibitörü Aminoguanidin'in Etkileri

Çalışmamızda nitrik oksit sentetaz inhibitörü Aminoguanidin'in sıçanlarda oluşturulan kapalı kafa travması sonrası meydana sekonder doku hasarı üzerindeki etkilerinin araştırılması planlanmıştır. 40 adet Wistar-albino sıçanı her biri 10 adet sıçan içeren 4 gruba ayırdık. Grup-1'deki sıçanlara sadece skalp insizyonu yapıldı. Grup II'deki sıçanlara kafa travması uygulandı. Grup III'tekilere ise kafa travması oluşturulduktan sonra 1.ve 24. saatte intraperitoneal olarak serum fizyolojik uygulandı. Grup IV'tekilere ise travma sonrası 1. ve 24. saatte intraperitoneal yolla 100 mg/kg olacak şekilde Aminoguanidine verildi. Her bir sıçandan travma merkezi baz alınarak frontopariyetal bölgeden beyin dokusu örneği alındı. Alınan doku örneklerinde nitrik oksit metaboliti olan doku nitrit-nitrat düzeyi ve Malondialdehid düzeyi bakıldı. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Sonuç olarak Aminoguanidinle tedavi edilen gruba (Grup IV) travma oluşturulan ve tedavi uygulanmayan gruba göre doku nitrit-nitrat düzeyi anlamlı olarak düşük bulundu. Malondialdehid düzeylerinde anlamlı sonuç elde edilemedi. Böylelikle diffüz beyin hasarı sonucu meydana gelen sekonder hasar mekanizmalarından NO aracılı olarak oluşan metabolitlere karşı nitrik oksit sentetaz inhibitörü olan Aminoguanidin'in etkili bir nöroprotektif ajan olduğu gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Aminoguanidin, Nitrik oksit, Nitrik oksit sentetaz,
Malondialdehid, Diffüz beyin hasarı

7. SUMMARY

The Effects Of Nitric Oxide Synthase In The Experimental Diffuse Brain Injury

In our study, we were aimed to investigate the effects of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, on secondary tissue damage following the closed-head trauma in rats. 40 Wistar-Albino rats were divided into four groups, each group was including 10 rats. Only scalp incision was done in the Group I. The group II underwent head trauma. The rats in the group III were treated by intraperitoneal saline at the 1st and 24th hours after head trauma. The group IV were aminoguanidine intraperitoneally 1(00 mg/kg) at the 1st and 24th hours after head trauma. Brain tissue samples were taken from the frontoparietal regions of all the rats on a trauma-center base. Levels of tissue nitrate/nitrite, metabolites of nitric oxide, as well as malonilaldehyde were assayed in the tissue samples. The results were evaluated statistically. It was demonstrated that tissue nitrate/nitrite levels in aminoguanidine-treated group (Group IV) was significantly lower than the group which was not treated (Group II). In terms of malonilaldehyde levels we could not obtaine significant results statistically. Therefore, we were demonstrated that, nitric oxide inhibitor aminoguanidine was a neuroprotective agent against the metabolites generated by lipid peroxidation resembling one of the secondary damage mechanism resulting from diffuse brain injury.

Key words: Aminoguanidine, Nitric oxide, Nitric oxide synthase, Malondialdehyde, Diffuse brain injury

8. KAYNAKLAR

1. *Textbook of Neurological Surgery*. Batjer HH, Loftus CM (eds). Volume 3, X.Cranial and Cerebral Trauma Section, 2795- 2803, 2003.
2. *Temel Nöroşirürji*. Kemal Benli (ed), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 2004.
3. *Temel Nöroşirürji*. Kaya Aksoy (ed), Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, 2005.
4. Liao LM, Bergsneider M, Becker DP. Volume 3, Chapter 67, Pathology and Pathophysiology of Head Injury. *Neurological Surgery Youmans* 1998.
5. Gentleman D. Causes and effects of systemic complications among severely head injured patients transferred to a neurosurgical unit. *Int. Surg* 77: 297-302, 1992.
6. Hovda DA, Becker DP, Katayama Y. Secondary injury and acidosis. *J. Neurotrauma* 9: 47-60, 1991.
7. Murr R, Berger S, Schurer L. Relationship of cerebral blood flow disturbances with brain oedema formation. *Acta Neurochir* 59: 11-7, 1993.
8. Krasznai L, Grote H. Acute vasoparalysis after subarachnoid hemorrhage and cerebral trauma: General reflex phenomenon? *Neurol. Res* 16: 40-4, 1994.
9. Nitta M, Tsutsui T, Ueda Y. The effects of an extradural expanding lesion on regional intracranial pressure, blood flow, somatosensory conduction and brain herniation: An experimental study in baboons. *Acta Neurochir* 104:30-7, 1990.
10. Marmarou A, Anderson RL, Ward JD. Traumatic brain tissue acidosis: Experimental and clinical studies. *Acta Neurochir* 57: 60-4, 1993.
11. McIntosh TK. Novel pharmacologic therapies in the treatment of experimental traumatic brain injury: A review. *J. Neurotrauma* 10(3): 215-61, 1993.
12. Choi D, Rothman S. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Ann. Rev. Neurosci* 13: 171-82, 1990.
13. Zuccarello M, Anderson DK. Interaction between free radicals and excitatory amino acids in the blood-brain barrier disruption after iron injury in the rat. *J. Neurotrauma* 10(4): 394-403, 1993.
14. Hayes RL, Lyeth BG, Jenkins LW. Possible protective effect of endogenous opioids in traumatic brain injury. *J. Neurosurg* 72(2): 252-61, 1990.
15. Vink R, Head VA, Rogers PJ. Mitochondrial metabolism following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* 7(1): 21-7, 1990.
16. Siesjö BK. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann. Emerg. Med* 22: 959-69, 1993.
17. Teasdale G. A randomized trial of nimodipine in severe head injury. *J. Neurotrauma* 9 (2): 545-50, 1992.
18. Katayama Y, Becker DP, Tamura T. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J. Neurosurg* 73(6): 889-900, 1990.
19. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: Role of tumor necrosis factor- α . *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev* 6: 341-60, 1993.
20. Hall ED. The role of oxygen radicals in traumatic injury: Clinical implications. *J. Emerg. Med* 11: 31-6, 1993.

21. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Funct. Neurol* 8(1) :51-66, 1993.
22. Braugher JM, Hall ED. Central nervous system trauma and stroke: I. Biochemical consideration for oxygen free radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med* 6(3): 303-13, 1989.
23. Beckman JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J. Dev. Physiol* 15(1): 53-9, 1991.
24. Manwaring JD, Csallary AS. Malondialdehyde containing proteins and their relationship to E. *Lipids Biochem. Biopharmacol* 23: 651-5, 1988.
25. Smith SL, Andrus PK, Zhang JR. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption. *J. Neurotrauma* 11: 393-404, 1994.
26. *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Akkuş İ (ed). Mimoza Yayınları, 1995.
27. Bekereccioğlu M, Uğraş S, Dilek ON, Tercan M, Özyazgan İ. Serbest Radikaller. *Sendrom* 10 (3): 85-95, 1998.
28. Türköz Y, Özerol E. Nitrik Oksit'in Etkileri ve Patolojik Roller. *Journal of Turgut Özal Medical Center* 4 (4): 453-461, 1997.
29. Ignaro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci* 84: 9265-9, 1987.
30. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333: 664-6, 1988.
31. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *Journal Leukoc. Biol* 54 (2): 171-8, 1993.
32. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic Messenger. *Ann. Intern Med* 120: 227-37, 1994.
33. Moncada S. The L-arginine: Nitric oxide pathway. *Acta Physiology Scand* 145(3): 201-27, 1992.
34. Chabrier PE, Demerle PC, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell. Mol. Life. Sci* 55:1029 -1035, 1999.
35. Nara K, Konno D, Uchida J, Kiuchi Y, Oguchi K. Protective effect of nitric oxide against iron-induced neuronal damage. *Journal of Neural Transsmisssion* 106: 835- 848,1999.
36. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacology Reviews* 43(9): 109-37,1991.
37. Wink DA, Mitchell JB. Chemical Biology of nitric oxide: Insights into regulatoty, cytotoxic, and cytoprotective mechanism of nitric oxide. *Free radic. Biol. Med* 25(4/5), 434-56, 1998.
38. Szabo C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous sistem. *Brain Res. Bull* 41: 131-141, 1996.
39. Petrov T, Page AB, Owen CR. Expression of the inducible nitric oxide synthase in distinct cellular types after traumatic brain injury: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Acta Neuropathology* 100: 196-204, 2000.

40. Caroline G, Staffan H, Tiit M. Temporal Profiles and Cellular Sources of Three Nitric Oxide Synthase Isoforms in the Brain after Experimental Contusion (Experimental Studies). *Neurosurgery* 46(1): 169-177, 2000.
41. Chatzipanteli K, Wada K, Busto R, Dietrich WD. Effects of Moderate Hypothermia on Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase Activities After Traumatic Brain Injury in the Rat. *Journal of Neurochemistry* 72(5): 2047-2052, 1999.
42. Danielisova V, Nemethova M, Burada J. The Protective Effect of Aminoguanidine on Cerebral Ischemic Damage in Rat Brain. *Physiol. Res.* 53: 533-540, 2004.
43. Stewart VC, Heslegrave AJ, Brown GC, Clark JB, Heales SJR. Nitric oxide-dependent damage to neuronal mitochondria involves the NMDA receptor. *European Journal of Neuroscience* 15(3): 458-464, 2002.
44. Demougeot C, Garnier P, Mossiat C, Bertrand N, Giroud M, Beley A, Marie C. N-Acetylaspartate, a marker of both cellular dysfunction and neuronal loss: its relevance to studies of acute brain injury. *Journal of Neurochemistry* 77(2): 408-415, 2001.
45. Stewart VC, Sarpe AM, Clark JB, Heales SJR. Astrocyte-Derived Nitric Oxide Causes Both Reversible and Irreversible Damage to the Neuronal Mitochondrial Respiratory Chain. *Journal of Neurochemistry* 75(2): 694-704, 2000.
46. Canals S, Casarejos MJ, Rodriguez E, Bernardo MS, Mena MA. Neurotrophic and neurotoxic effects of nitric oxide on fetal midbrain cultures. *Journal of Neurochemistry* Volume 76(1): 56-64, 2001.
47. Özdemir-Gürsoy Y, Hayrūnnisa B, Saribas O, Dalkara T. Role of endothelial Nitric Oxide Generation and Peroxynitrite Formation in Reperfusion Injury After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke* 31(8): 1974-1981, 2000.
48. Gegg ME, Beltran B, Sales-Pinos S, Bolanos JP, Clark JB, Moncada S, Heales SJR. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurones: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry* 86(1): 228-37, 2003.
49. Marmarou A, Montasser A., Foda E, Brink WVD, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J.Neurosurg* 80 (2): 291-300, 1994.
50. Montasser A., Foda E, Marmaraou A. A new model of diffuse brain injury in rats Part II: Morphological characterization. *J.Neurosurg* 80 (2): 301-13, 1994.
51. Soy O, Aslan Ö, Uzun H, Barut Ş, Akyıldız İA, Belce A, Çolak A. Time-level relationship for nitric oxide and protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir* 10: 701-704, 2004.
52. Spinnewyn B, Corret S, Auguet M, Chabrier PE. Synergistic protective effects of antioxidant and nitric oxide synthase inhibitor in transient focal ischemia. *J.Cereb. Blood Flow Metab* 19: 139-143, 1999.
53. Liu D, Ling X, Wen J, Liu J. The Role of Reactive Nitrogen Species in Secondary Spinal Cord Injury. *Journal of Neurochemistry* 75(5): 2144-56, 2000.
54. Corbett A. McDaniel ML. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by aminoguanidine. *Methods in Enzymology* 268: 398-408, 1996.
55. Wada K, Chatzipanteli K, Kraydich S, Busto R, Dietrich WD. Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43 (6): 1427-1436, 1998.