

T.C.
CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**TAVŞANLARDA SUBARAKNOİD KANAMA SONRASI
NİTRİK OKSİT DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN
AMPEROMETRİK OLARAK ÖLÇÜLMESİ**

Dr. Hakan Duman
UZMANLIK TEZİ

Danışman Öğretim Üyesi
Yard. Doç. Dr. Ünal Özüm

SİVAS
2008

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir (CÜBAP Proje no: T-357)

TEŞEKKÜR

Tıp eğitiminde bana emeği geçen tım hocalarıma ve nöröşirurji alanında beni yetiştiren, ilgilerini eksik etmeyen, tezimi hazırlamamda deneyim ve bilgileriyle bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Ünal Özüme teşekkür ederim. Prof. Dr. H. Zafer Kars, Doç. Dr. Mustafa Gürelik ve Doç. Dr. Özen Karadağ' a nöröşirürji eğitimime olan katkılarından dolayı teşekkür ederim. Uzmanlık eğitimim boyunca beraber çalıştığım tım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, candan teşekkür ederim.

Çalışmalarımnda bana yardımcı olan Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinin çalışanlarına, çalışmanın istatistiksel değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Ziyet ınar'a teşekkür ederim.

ÖZET

L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi aracılığı ile sentezlenen nitrik oksit (NO) bir çok fizyolojik sistemdeki ana düzenleyici moleküldür. Subaraknoid kanama (SAK) sonrasındaki fizyopatolojik süreçte NO'in önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yakın zamana kadar metabolitlerindeki değişikliklerin analizi ile belirlenebilen NO düzeyi artık dokularda amperometrik yöntem ile doğrudan ölçülebilmektedir.

Bu çalışmada deneysel SAK oluşturulan tavşanların sağ frontal subkortikal NO düzeyleri amperometrik yöntemle ölçülmüştür. Serum fizyolojik (SF) ve 7-aminoguanidin infüzyonları yapılan iki grup tavşanda SAK öncesinde, SAK'dan hemen sonra ve takip eden 1., 2., 3. ve 4. günlerde beyin dokusunda NO düzeyleri ölçülmüştür.

SF infüzyonu yapılan deneklerde SAK'dan hemen sonra beyin dokusunda NO miktarında anlamlı düşme, 1. günde anlamlı yükselme tespit edilmiş, 7-aminoguanidin verilen deneklerde SAK'dan hemen sonra ve SAK sonrası 4. günde beyin dokusunda NO miktarında anlamlı düşme tespit edilmiştir.

Bu çalışma beyin dokusundaki NO düzeyinin amperometrik yöntemle doğrudan ölçülebildiğini göstermiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, SAK'dan hemen sonra beyin dokusunda NO eksikliğinin meydana geldiğini ve takip eden süreçte immünolojik NOS enziminin aktivitesinin arttığını ve endotelial NOS aktivitesinin ise azaldığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler:

Nitrik oksit; Subaraknoid kanama; Amperometrik ölçüm; L-arginin; Nitrik oksit sentaz.

SUMMARY

Nitric oxide (NO) is a potent regulatory molecule in many physiological systems, synthesized via L-arginine oxidation by family of nitric oxide synthase (NOS). It is known that NO plays important role in physiopathological processes after subarachnoid hemorrhage (SAH). While determination of NO level has been decided by analyses of NO metabolites in different samples until now, recently NO is measured directly by amperometric method.

In this study, right frontal subcortical NO level was measured in rabbits with experimental SAH by amperometric method. NO levels were measured in two groups of rabbits which received saline and 7-aminoguanidine before and immediately after SAH, and also 1, 2, 3, and 4 days after SAH.

It is found that NO level significantly decreased immediately after SAH, significantly increased on 1st day of SAH in saline infusion group. NO level decreased immediately after SAH and on 4th day of SAH in 7-aminoguanidine group.

This study shows that NO can be measured directly by amperometric method. Our results show that NO decreases immediately after SAH, immunological NOS is induced and endothelial NOS is inhibited in days following SAH.

Key words:

Nitric oxide; Subarachnoid hemorrhage; Amperometric method; L-arginine, Nitric oxide synthase.

İÇİNDEKİLER:SAYFA

TEŞEKKÜR	3
ÖZET	4
İNGİLİZCE ÖZET	5
KISALTMALAR	8
TABLolar	9
ŞEKİLLER	10
1.GİRİŞ VE AMAÇ	11
2.GENEL BİLGİLER	13
2.1 NİTRİK OKSİT (NO)	13
2.1.1 Tanım ve tarihçe	13
2.1.2 NO sentezi ve nitrik oksit sentaz (NOS)	13
2.1.3 NO etki mekanizması	15
2.1.4.NO metabolizması	16
2.1.5. NO ve beyin kan akımının düzenlenmesi	17
2.1.6. Subaraknoid kanama (SAK) ve NO	18
2.1.7. NO ölçüm yolları	21
2.1.7.1.NOS aktivitesi ölçümü için kullanılan dolaylı yöntemler	21
2.1.7.1.1. NOS yerleşimlerinin immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmesi	21
2.1.7.1.2. NOS mRNA ekspresyonunun Western blot yöntemi ile analizi	22
2.1.7.1.3. NOS aktivitesinin L-arjinin L-sitruline dönüşümü yöntemi ile ölçülmesi	22
2.1.7.1.4. NO metabolitlerinin ölçülmesi	22
2.1.7.2. NOS aktivitesi ölçümü için kullanılan doğrudan yöntemler	23
2.1.7.2.1. NO miktarlarının amperometrik yöntem ile ölçülmesi	23
3.GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deney grupları	26
3.2. Anestezi	26
3.3. NO problemlerinin kalibrasyonu	26
3.3.1. CuSO ₄ eriyiğinin hazırlanması	27
3.3.2. SNAP eriyiğinin hazırlanması	27
3.3.3. Kalibrasyon işlemi	27
3.4. NO problemlerinin bakımı	28
3.5. SAK oluşturulması	29
3.6. NO probunun yerleştirilmesi ve NO ölçümü	29
3.7. Deney protokolü	31

3.8. İstatistiksel değerlendirme	31
4. BULGULAR	32
4.1. Sistemik bulgular	32
4.2. NO ölçüm bulguları	32
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇLAR	41
7. KAYNAKLAR	42

KISALTMALAR

7-AG	7-aminoguanidin
7-Nİ	7-nitroindazol
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
ADP	Adenozin difosfat
AGM	Agmatin
ATP	Adenozin trifosfat
BKA	Beyin kan akımı
cGMP	Siklik guanozin monofosfat
EDRF	Endotel bağımlı gevşetici faktör
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
iNOS	İndüklenen nitrik oksit sentaz
L-NAME	L-N ^G -nitro arjinin metil ester
L-NA	N ^G -nitro-arjinin
L-NAA	N ^G -amino-L-arjinin
L-NNA	L-N ^G -nitroarjinin
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arjinin
L-NİO	Nöiminoetil-L-ornitin
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NMDA	N-metil-D-aspartam
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
OAB	Ortalama arteryel basınç
SAK	Subaraknoid kanama
SDMA	Simetrik dimetil arjinin
SF	Serum fizyolojik
SNAP	S-nitrozo-N-astilpenisilamin

TABLÖLAR

	Sayfa
Tablo 1. NOS inhibitörleri.	5
Tablo 2. NO'in doğrudan ölçüm yöntemleri, yararları ve kusurları.	14
Tablo 3. Kalibrasyon işlemlerinden bir tanesinde SNAP, elde edilmesi planlanan NO ve ölçüm sırasında kaydedilen NO düzeyi.	19
Tablo 4. Kontrol grubu deneklerinin ortalama arteriyel basınçlarının, vücut ısılarının, beyin ısılarının ortalamaları.	22
Tablo 5. SAK grubu deneklerinin, ortalama arteriyel basınçlarının, vücut ısılarının, beyin ısılarının ortalamaları.	22
Tablo 6. Kontrol-SF ve Kontrol-7-AG gruplarındaki beyin dokusu NO düzeyleri.	23
Tablo 7. SAK-SF ve SAK-7-AG gruplarındaki SAK öncesi, SAK sonrası, 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki beyin dokusu NO düzeyleri .	26

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. L-arjinin-sitrullin tepkimesinde NO oluşumu	4
Şekil 2. NO ölçüm odası.	15
Şekil 3. Kalibrasyon eğrisi örneği. Bu kalibrasyon işleminde regresyon katsayısı 0,9945 ve formülü $y=7,4833x$ olan doğrusal grafik elde edilmiştir. Bu regresyon katsayısı olan bir doğrusal grafiğin elde edilmesi ölçümün güvenilirliğini göstermektedir.	18
Şekil 4. Kraniektomi işlemi.	20
Şekil 5: NO probu ve kafa içi ısı probunun ölçüm sırasında sabitlenmesi.	20
Şekil 6. SAK-SF, SAK-7-AG gruplarındaki SAK öncesi, sonrası ve takip eden günlerde beyin dokusu NO düzeyindeki değişim.	25

1. GİRİŞ VE AMAC

Beyin damar hastalıkları arasında aterotromboz, embolizm ve birincil intraserebral kanamayı takiben dördüncü sırada yer alan subaraknoid kanama (SAK), kanamalı inme olgularının % 6-8'ini oluşturur. SAK'ın en sık nedeni travmalardır; spontan subaraknoid kanamaların en sık nedeni ise % 75-80 sıklıkla anevrizmalardır (39).

Anevrizmal SAK sonrası kanın subaraknoid mesafeye dolması ile bir çok kimyasal ve fizyolojik süreç başlar. Kanama ile birlikte arterlerde hemen bölgesel ya da genel daralma (erken vazospazm) meydana gelir; bu anevrizmaya gelen kanı azaltmaya yani kanamayı durdurmaya yardımcı eder, kanama bölgesinde tıkaç oluşturma ve pıhtılaşma süreci ile kanamanın tam durması mümkün olabilir. Akut vazospazmda hangi süreçlerin rol oynadığı açık değildir. Subaraknoid mesafedeki kanın yıkılmaya başlaması ile yeni bir fizyolojik ve kimyasal süreç başlar. Bu süreç yeniden kanama, geç vazospazm, hidrosefali, epilepsi ve ekstrakranial patolojilere (kalp iskemisi gibi) neden olur. Bu süreçte nitrik oksit (NO) önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarla özellikle geç vazospazmda NO'nun rolünün fazla olduğu ortaya konulmuştur. Vazospazm nedeni olarak NO'nun üretiminde veya etkinliğinde azalmanın ve NO üretiminin genetik olarak kusurlu olmasının etkili olduğu; anevrizma oluşumunda ve oluşan anevrizmaların kanamaya yatkınlığında NO'nun önemli rolü olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. (7, 13, 14, 24)

NO yarı ömrü 10-60 sn olan uçucu bir gazdır. NO, L-arjininin NOS tarafından enzimatik oksidasyonu sonucu sentezlenir. NO'nun bilinen en önemli fonksiyonu başta arterler olmak üzere damarsal yatakta meydana getirdiği genişlemedir. NO ayrıca trombosit agregasyonu ve adezyonunu, lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu engeller, düz kas proliferasyonunu indükler, bağışıklık sistemini düzenler, damar geçirgenliğini artırır, trombosit ve lökosit membranı geçirgenliğini artırır (6, 32, 52).

NO'nun kısa yarılanma ömrü araştırmacılar için her zaman sorun olmuştur. Yakın zamana kadar NO'nun doğrudan ölçülememesi araştırmacıları doğrudan olmayan yöntemleri kullanmaya yöneltmiştir. Bu yöntemlerden biri NO düzeyinin göstergesi olarak NO yıkım ürünleri nitrat ve nitritin düzeylerine bakmaktır. Bir diğer

yöntem NO sentez aşamalarını engelleme yöntemidir. Bu yöntemde NO sentezleyen NOS izoenzimlerinin genel ya da özgül inhibitörleri kullanılarak NO sentezi engellenmeye çalışılmıştır. NO öncülü olan L-arjinin verilerek NO düzeyinde değişim amaçlamak ve etkinliğini ölçmek bir başka yöntemdir. Diğer bir yöntem ise doğrudan NOS enzim aktivitelerine bakmaktır (65, 66, 74).

Doğrudan NO ölçüm tekniği olan amperometrik (elektrokimyasal) ölçümde özgül bir sensör kullanılır. Bu sensörün ölçüm tekniği, NO'nun gaz geçirgen bir membrandan geçip ince bir elektrolit tabakasından diffüzyonu ve takiben ölçüm elektrodlarını okside etmesine dayalıdır. Bu oksidasyon, membranın dışındaki NO'nun konsantrasyonu ile orantılı bir akım yaratır. Bu ölçüm için özgülleştirilmiş yazılımlar kullanılır. Yakın tarihlerde bu ölçüm tekniği kullanılarak çeşitli dokularda NO düzeyleri farklı patolojik süreçlerde ölçülmüştür (11, 47).

SAK meydana geldikten sonraki dönemde beyin dokusu içerisinde NO düzeyinin doğrudan bilinmesi ve zaman-konsantrasyon grafiğinin ortaya konması ve inflamasyon sonucu artan iNOS'un NO'nun düzeyine etkilerinin bilinmesi, SAK sonrası fizyopatolojik ve kimyasal süreçlerin daha iyi anlaşılmasına yardım edecek ve SAK sonrası ortaya çıkan ve henüz tedavileri istenilen düzeyde olmayan vazospazm gibi komplikasyonların tedavisine yönelik yeni yöntemlerin gelişmesine katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmamızda deneysel olarak SAK oluşturulmuş tavşanlarda, SAK oluşumunu takip eden akut dönemde ve sonrasındaki günlerde beyin dokusu içerisindeki NO'yu amperometrik yöntemle doğrudan ölçmeyi planladık. Ayrıca SAK sonrası dönemde inflamasyon ile ortaya çıkan iNOS'un NO düzeyine olan etkisini seçici iNOS inhibitörü olan 7-AG kullanarak belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NİTRİK OKSİT (NO)

2.1.1. Tanım ve tarihçe

NO lipofilik, kimyasal olarak kararlı, reseptör bağımsız, bilinen en düşük molekül ağırlıklı serbest radikal bir gazdır (13).

1970'li yılların sonlarında Dr. Robert Furchgott'ın iki teknisyeni aynı deney protokolünde birbirine zıt iki veri elde etti. Teknisyenlerden biri tavşan aortasında asetilkolin ile bir miktar kasılma elde ederken diğer teknisyen tam tersine gevşeme elde etti. Furchgott teknisyenlerden kasılma elde edenin aortayı çıkarırken özensiz davrandığını endoteli zedelediğini, gevşeme elde edenin ise daha itinalı davrandığını fark etti ve basit bir deney protokolü ile damar endotelinin asetilkolin gevşemesi için zorunlu olduğunu ve kısa yarılanma ömrü olan bir maddenin gevşemeden sorumlu olduğunu yayımladı. Bu kısa yarılanma ömrü olan maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) adını verdi (22).

1986-87 yıllarında Furchgott ve Ignarro birbirinden bağımsız olarak EDRF'nin NO olabileceğini iddia ettiler (23, 33).

1992 yılında beyin ekstrelerinde NO aktivitesinin varlığı bulundu (13).

2.1.2. NO sentezi ve nitrik oksit sentaz (NOS)

NO, NOS aracılığı ile sentezlenir. NO sentezinde rol oynayan NOS'un üç formu vardır.

Nöronal NOS (nNOS ya da Tip 1)

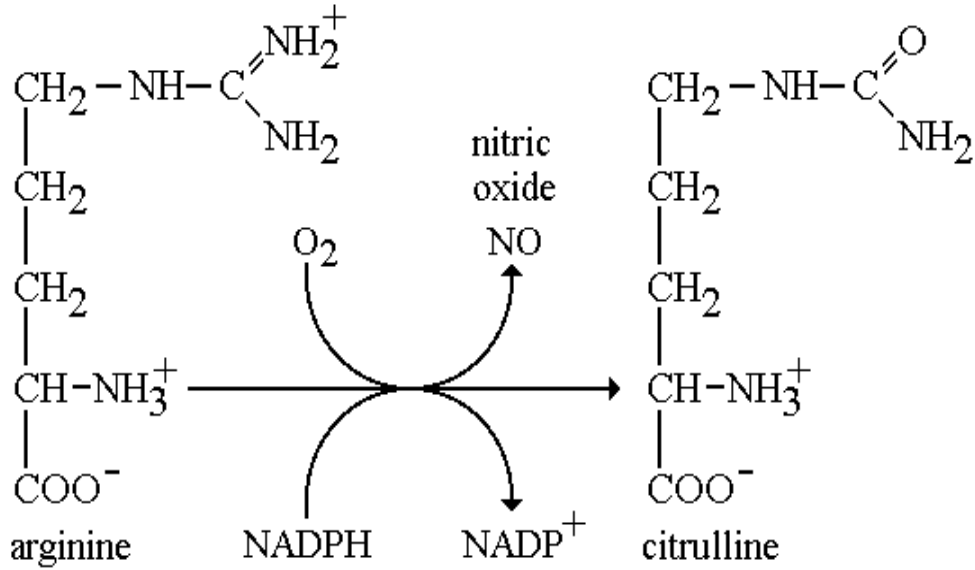
İmmunolojik NOS (iNOS ya da Tip 2)

Endotelial NOS (eNOS ya da Tip3) (13, 32).

NO, NOS aracılığı ile L-arjininden iki basamakta sentezlenir.

1- Arjininden hidroksiarjinin oluşumu (NADPH, O₂, Ca⁺⁺ kullanılır; CO tepkimeyi engeller).

2- Hidroksiarjininden NO ve sitrullin oluşumu (NADPH, O₂, Ca⁺⁺ kullanılır; CO ve arjinin analogları tepkimeyi engeller, ayrıca oluşan NO, NOS'un prostatik grubuna bağlanarak bu basamakta negatif *feedback* ile üretimi azaltır) (Şekil 1) (32).



Şekil 1. L-arjinin-sitrullin tepkimesinde NO oluşumu.

Endotelial NOS ve nöronal NOS devamlı aktif halde iken, iNOS devamlı aktif halde bulunmaz. Toksik ve enfeksiyöz uyarı ile aktif hale geçer. nNOS ve eNOS'un aksine iNOS kalsiyum bağımlı değildir. iNOS uyarı sonucu devamlı ve yüksek oranda NO sentezleyebilir böylece iNOS'un sitotoksik özelliği ortaya çıkar. eNOS ve nNOS ise küçük miktarlarda ve aralıklı olarak NO sentezler. Bunlar NO'nun moleküler *messenger* işlevine uygun olarak yüksek kontrol altında çalışır (32).

Astrositlerde L-arjininden doğrudan NO sentezleyen nNOS enziminin varlığı söz konusudur. Üretilen NO, astrositlerin ayaksız uzantılarından difüzyonla damar duvarına ulaşır (20, 56).

Hipoksi, makrofajlarda iNOS transkripsiyonunu uyarır. Ayrıca birçok hücrede lipopolisakkarit ve sitokinler iNOS'u uyarır. eNOS için aralıklı uyarıcılar protein 1, protein 2, nükleer faktör 1, akut faz reaktanları ve gerilme stresidir. nNOS enzimi için uyarıcılar protein 2, akut faz reaktanları, nükleer faktör 1, nükleer faktör kappa B ve glutamattır. Her üç tip NOS formu için enzim yıkım yolu ile kontrol mekanizması vardır (20, 32). Bir diğer kontrol yolu ise L-arjininin tükenmesi durumunda NOS enziminin üzerine aldığı iki elektronu NO sentezinde değil, süperoksit anyon sentezinde kullanması durumudur. NOS, hem NO hem de süperoksit anyonunu

birlikte sentezleyebilir (25, 32).

NO, nöronlarda nörotransmitter taşıyan veziküller içinde bulunmaz. Postsinaptik reseptörleri yoktur. Nöronal etkisini difüzyonla yer değiştirerek gösterir (20, 56). nNOS nöron, astrosit ve mikroglia da bulunur. Serebellar fastigial nükleusta da NOS aktivitesi vardır (31, 32). Postsinaptik alandaki NMDA reseptörlerinin presinaptik aralığa salınan eksitatör aminoasit olan glutamat tarafından aktivasyonu sonucu nNOS, NO sentezler. NO difüzyonla damar çevresindeki sinir terminaline ulaşır ve damar duvarında etkisini gösterir. Pterigopalatin ve sfenopalatin ganglion nonkolinerjik, nonadrenerjik sinir liflerinin çıkış yeridir. NOS aktivitesi Willis poligonunun anterior bölümünde daha belirgindir. Pterigopalatin ve sfenopalatin ganglionlarının etki mekanizması NO bağımlı, endotel bağımsızdır (20, 56). NO üretimi, aşağıda sıralanan NO inhibitörleri ile kompetitif olarak inhibe edilebilir (Tablo 1). Bu olay L-arjinin verilerek tersine çevrilebilir.

Tablo 1. NOS inhibitörleri.

<u>NOS İnhibitörleri</u>	<u>Kısaltma</u>	<u>İnhibitör</u>
N ^G -monometil-L-arjinin	L-NMMA	nNOS = eNOS › iNOS
N ^G -nitro-ajinin	L-NA	nNOS = eNOS › iNOS
N ^G -amino-L-arjinin	L-NAA	nNOS = iNOS › eNOS
L-N ^G -nitroarjinin	L-NNA	
7-nitroindazol	7-Nİ	nNOS = eNOS = iNOS
L-N ^G -nitro arjinin metil ester	L-NAME	
Nöiminoetil-L-ornitin	L-NİO	iNOS › eNOS = nNOS
7-Aminoguanidin	7-AG	iNOS › eNOS = nNOS
Agmatin	AGM	iNOS › iNOS › nNOS

2.1.3. NO etki mekanizması

NO lipofilik bir maddedir. Bu nedenle damar endotelinden düz kas hücrelerine kolaylıkla difüze olarak, guanilat siklaz enziminin hem grubuna bağlanır. Bu enzimi aktif hale getirip, düz kas hücrelerinde cGMP düzeyini artırır. cGMP miktarının artması, damar düz kas hücrelerinde gevşemeye, trombosit adezyon ve

agregasyonunda inhibisyona neden olur (6).

İnsanlarda NO bazal durumda damar endotelinden sürekli olarak salıverilir ve oluşturduğu vazodilatör etki ile damar direncinin düzenlenmesine katkıda bulunur. L-arjininden sentezlenen NO'nun depolanma mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (6, 43).

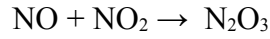
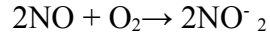
NO beyin arterlerinde substans P, vazopressin, ATP ve ADP gibi bir çok vazodilatatörün gevşetici etkilerine aracılık eder ve kısmen de endotelin, norepinefrin, 5-HT gibi bazı vazokonstriktörlerin kasıcı etkilerini önler (51). NO hiperkapni, asidoz, metabolizmada artış ve eksitator aminoasitlerin varlığında vazodilatasyon yapar. Yapılan çalışmalarda hiperkapni sırasındaki ve düşük pH'ya bağlı oluşan vazodilatasyon NOS inhibitörleri kullanılarak engellenmiştir (14). L-arjinin/NO/cGMP yolu damar tonusunun kontrolünde çok önemli görülmekte ve son zamanlarda giderek daha fazla araştırmacı tarafından BKA düzenlenmesinde ana belirleyici olarak kabul edilmektedir (2, 13, 14, 37).

Nitrik oksidin iskemik beyin modellerindeki koruyucu etkileri; vazodilatasyon, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, lökosit adezyonunun inhibisyonu, serbest oksijen radikalleri ile reaksiyona girerek bu yapıların ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Toksik etkileri ise; süperoksit anyonlarla peroksinitritleri oluşturarak sitotoksik etki, demir metabolizmasının bozulması, DNA sentezinin engellenmesi, elektron transportunun bozulmasıdır (32).

2.1.4. NO metabolizması

NO dokularda ve oksijenlenmiş fizyolojik sıvılarda hızlı şekilde yıkılır. NO'nun yarılanma ömrü 10-60 saniye arasında bulunmuştur. Süperoksit dismutaz enziminin ortama katılması NO'nun inaktivasyonunu hızlandıran serbest oksijen radikallerini nötralize eder. NO yıkımı yavaşlar ve etkisi artar (6, 43).

NO, düşük konsantrasyonlarda ve oksijen yokluğunda kararlı olmasına karşın oksijenin ve serbest oksijen radikallerinin bulunduğu biyolojik ortamda kararlı değildir (50). NO gaz halindedir ve sudaki çözünürlüğü zayıftır. Hidrofobik özelliği ve ufak yapısı NO'nun fizyolojik işlevleri için çok önemlidir ve serbestçe hücre membranından geçebilmesine izin verir. Gaz fazında NO oksijenle reaksiyona girer, NO₂ ve dinitrojen trioksit (N₂O₃) oluşturur (29).



Oksihemoglobin ve oksimiyoglobin gibi oksihemoproteinlerin yokluğunda sıvı fazda NO'nin otooksidasyonu %100 oranında NO_2^- oluşturur (34).



Biyolojik sistemlerde NO, oksihemoproteinlerle NO_3^- 'e (34) ve süperoksit anyonu varlığında peroksinitritlere (ONOO^-) dönüşür (8). İn vivo ortamda dominant olarak NO_3^- oluşur ve kanda NO'nun majör metaboliti NO_3^- 'dür (53). Ayrıca kuvvetli okside edici ajanlar varlığında NO_2^- 'den de NO_3^- oluşur (50).

2.1.5. NO ve beyin kan akımının düzenlenmesi

Yapılan bir çok çalışmada NO'nun kuvvetli bir vazodilatatör olduğu bulunmuştur (13, 14, 20, 32).

Endotelium, nöronlar, astrositler ve damar çevresindeki sinir uçlarından, damar duvarı düz kas dokusuna ulaşan NO, damar duvarındaki gevşemeyi şu mekanizma ile sağlar: NO çözünebilir guanilat siklazın bir parçası olan hem içerisindeki demire bağlanıp damar düz kasındaki cGMP üretimini uyarır. cGMP daha sonra protein kinazı uyarır. Bu ise myozinin ince zincirini fosforile ederek damar düz kasında gevşemeye sebep olur (13, 14, 20, 31, 32).

Beyin damar tonusunun belirlenmesinde rolü olduğu düşünülen diğer vazoaktif maddelerin bir çoğunun etkisinin NO üzerinden olduğu araştırmalar sonucu bulunmuştur. NOS inhibitörlerinin verilmesi, asetilkolin, bradikinin, substans P, nörokinin A ve B, nöropeptit K, trombin A23287, vasopressin, oksitosin, adenozin trifosfat, serotonin, prostasiklin ve histamin ile oluşan gevşemeyi geri çevirmiştir. Bradikinin ve prostasiklininin doğrudan gevşetici etkilerinin olduğu da bilinmektedir (12, 13, 14).

NO; hiperkapni, asidoz, hipermetabolizma ve glutamat gibi eksitatör aminoasitlerle kortikal hiperstimülasyon durumlarında vazodilatasyon oluşturur. Hiperkapni ve düşük pH durumunda oluşan vazodilatasyon, NOS inhibitörleri kullanılarak engellenmiştir. NOS inhibitörleri ile düşük pH'ya bağlı vazodilatasyonun azaltılması ekstraselüler pH'ın, beyin arteriollerinin tonusundaki hiperkapniye bağlı değişimleri modüle ettiğini ortaya koymaktadır. Vazodilatasyonu yapan NO;

endotelial, glial ya da nöronal kaynaklı olabilir. Beyin metabolizmasındaki artma sonucunda beyin kan akımı artar. Bu ilişkide NO önemli bir rol oynar. Glutamat, NMDA reseptörlerini uyarır. Uyarılan bu reseptörler nNOS'un, NO sentezlemesini sağlar. Sonuçta cGMP artar ve vazodilatasyon gelişir (14).

Beyin korteksinin kimyasal ya da mekanik olarak uyarılması sonucunda, nöronal depolarizasyon oluşur ve bütün kortekse yayılır. Böylece eksitator aminoasitler artar ve buna bağlı olarak metabolizma artar. Metabolizmanın artması ile vazodilatasyon gelişir. NOS inhibitörleri verilerek vazodilatasyon engellenir ancak nöronal depolarizasyon engellenemez (14).

Beyin arteriollerinin topikal endotoksin ile muamelesi zamana bağlı vazodilatasyon oluşturur. Deneysel menenjitlerde beyin arterielleri genişlemiş ve beyin kan akımı artmıştır. Bu vazodilatasyon seçici olmayan NOS inhibitörü olan L-NAME verilerek geri döndürülmüştür. Buradaki vazodilatasyonda endotoksine bağlı olarak iNOS enzimi aktive olmaktadır. Dekzametazon iNOS'u inhibe ederek, endotoksine bağlı vazodilatasyonu azaltırken, eNOS'a bağlı vazodilatasyonu etkilemez (14, 46).

2.1.6. Subaraknoid kanama (SAK) ve NO

SAK ve NO ilişkisi ile ilgili bilgilerin geçmişi NO'nun bir damar genişletici olmasının bulunmasına kadar dayanmaktadır. Tüm vücuttaki arterlerin yanında özellikle beyin arterlerinin düz kaslarının NO tarafından gevşetildiğinin öğrenilmesi ile ihtiyaca göre kasılıp gevşeyen beyin arterlerinin bu çap düzenlenmesinde etkin olan kasıcı-gevşetici dengesinin gevşetici tarafının hemen hemen tamamen NO tarafından meydana geldiği hipotez konusu edilmiş ve ispatlanmaya çalışılmıştır. Beyin arterlerinin bu dinamik çap değişikliği işlevinin beyin kan akımının düzenlenmesinin temelini teşkil ettiği dolayısı ile NO'nun de beyin akımının düzenlenmesinde arterleri gevşeten görevi ile en temel unsur olduğu artık kabul gören bir bilgidir. SAK ile NO ilişkisine yönelik araştırmalar, NO'nun bu arter gevşetici özelliği nedeni ile daha çok SAK sonrası gelişen vazospazm konusuna odaklanmıştır. Literatürde bulunan SAK-NO ilişkisi araştırmalarının çoğu bir vazospazm-NO araştırması gibidir. SAK-gevşeyemeyen beyin arterleri-geç vazospazm ilişki zincirinde gevşeyemeyen beyin arterlerinin neden NO etkiliğinden

yoksun kaldığı sorusunda genel olarak şu cevaplar araştırılmıştır:

NO tükenmiş midir? NO'nun SAK sonrası birkaç gün içerisinde bir şekilde azaldığı ve gevşetici etkinin ortadan kalkması sonucu vazospazmın geliştiği ileri sürülmüştür. Bu fikri desteklemek için olmayan ya da azalan NO yerine konmaya çalışılmıştır (1). Bu NO tükenmişliği sorunu NO'nun kendisinin yerine öncüllerinin verilmesi ile de aşılmaya çalışılmıştır (44, 57, 71).

NO sentezi mi bozulmuştur? Bu konu birkaç başlık altında irdelenmiştir:

eNOS enzimi baskılanmış mıdır? Yapılan araştırmalarda NO sentezleyen eNOS enzimin bir şekilde baskılandığı düşünülmüş ve nedenleri araştırılmıştır. Bulunan en önemli etkenlerden bir tanesi ADMA'dır.

eNOS ve nNOS enzimleri üzerinden NO sentezi negatif *feedback* mekanizması ve L-arjininin metilasyonu ile kontrol edilir. L-arjininin protein-arjinin metil transferaz enzimi aracılığı ile metilasyonu sonucu SDMA ve ADMA'ya dönüşür. SDMA'nın görevi bilinmemektedir, ancak ADMA etkin bir eNOS enzim baskılayıcısıdır. ADMA hidrolize olarak inaktif hale geçer. SAK sonrasında ortaya çıkan kan yıkım ürünlerinden özellikle bilirübinin ADMA'nın hidrolizini engellediği ve ADMA düzeyinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir. Artan ADMA'nın ise eNOS'u inhibe ettiği ve NO miktarının azaldığı düşünülmüştür (58).

NOS enzimi genetik olarak sorunlu mudur? Yapılan araştırmalarda genetik olarak eNOS enzimlerinde kusur saptanan insanlarda SAK sonrası vazospazmın daha sık ve şiddetli olduğu tespit edilmiştir. (41, 42).

NO sentezi için gerekli olan L-arjinin tükenmiş midir? Yapılan çalışmalarda L-arjinin verilerek beyin damarlarında gevşeme elde edilmiş ve bu sonucun bir şekilde NO sentezi için yeterli miktarda L-arjinin kalmadığı ya da artan NO ihtiyacını karşılayacak L-arjininin bulunmadığı şeklinde yorumlanmıştır (25).

NO yıkımı artmış mıdır? SAK sonrası ortaya çıkan kan yıkım ürünlerinin hızlıca NO serbest oksijen radikallerine dönüştürerek ortamdan uzaklaştırdığı ileri sürülmüştür (49, 67, 68, 77).

Kasıcı etkinin artması karşısında NO'nun izafi bir yetmezliği söz konusu mudur? Bu başlık altında beyin arterlerini gevşeten taraftaki sorundan ziyade beyin damarlarını kasan sistemin bir şekilde etkinliğini artırdığı ve bu artan kasıcı etki karşısında gevşetici tarafında bulunan NO'nun göreceli olarak yetersiz kaldığı savı

ileri sürülmüştür (30).

NO'nun son doku duyarsızlığı söz konusu mudur? NO sentezinde aslında bir sorun olmadığı aksine NO miktarında artma olduğu ancak endotel hasarı meydana geldiği ve dolayısı ile NO'nun gevşetici etkisini gösteremediği ileri sürülmüştür. Hayvan ve insan NO örneklem çalışmalarında SAK sonrası geç dönemde NO miktarında NO yıkım ürünleri olan nitrat ve nitrit düzeylerine bakılarak bir artışın olduğu tespit edilmiştir (72). Bu artışın iNOS enzimi tarafından gerçekleştirildiği fikri ileri sürülmüştür. SAK sonrası iNOS enzim aktivitesinin arttığı çalışmalarla gösterilmiştir (56, 77).

SAK-NO ilişkisi SAK'a neden olan beyin arteri anevrizmalarının neden ve nasıl meydana geldiği ya da neden yırtıldığı konularında araştırma konusu olmuştur. Beyin arterlerinin tonusunu belirleyen NO'nun beyin arterlerinin mimari yapısının korunmasında çok önemli rol oynadığı, NO salınım düzensizlikleri ya da aşırılıklarının bu mimaride bozulmalar meydana getirerek anevrizma oluşumuna hatta anevrizmaların yırtılmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (35).

SAK-NO ilişkisi SAK sonrası erken vazospazmı açıklamak için de kullanılmıştır. SAK sonrası erken ve koruyucu etkisi olan vazospazmın ani NO düşüşü sonucu meydana geldiği bazı veriler sonucu ileri sürülmüştür (69).

SAK sonrası beyin dokusundaki oksijen kullanımı, enerji metabolizması gibi beyin dokusu hasarı hakkında bilgi veren parametrelerle NO arasındaki bağlantı da araştırma konusu olmuştur.

SAK-NO ilişkisi şu yöntemlerle ortaya konulmaya çalışılmıştır:

- Doğrudan NO metabolitleri olan nitrit ve nitrat düzeylerine BOS, beyin dokusu, kan ve idrar gibi örneklerde bakarak NO düzeyi hakkında fikir elde etmek.
- NOS enzim aktivitelere bakmak.
- NOS enzimini kodlayan gen bölgelerinin analizlerini yapmak.
- NOS enzim inhibitörleri kullanarak damar çapı değişiklikleri gibi NO işlevlerini analiz etmek.
- NO analogları kullanmak.
- L-arjinin kullanmak.
- Doğrudan NO düzeyine bakmak.

2.1.7. NO ölçüm yolları

NO'nun in vivo olarak düşük miktarlarda olması ve oluştuktan sonra hızla moleküler oksijen ile reaksiyona girmesi biyolojik sistemlerde NO konsantrasyonunun ölçümünü güçleştirmektedir. NO yarılanma ömrünün çok kısa olması da (kan gibi fizyolojik ortamlarda yarılanma ömrü 6-20 saniye kadar) bazal koşullarda NO ölçümünü güçleştirmektedir (18, 54). Son yıllarda NOS ve NO ölçümünün doğrudan, güvenilir, hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmesine olanak sağlayan yöntemler geliştirilmiştir.

2.1.7.1. NOS aktivitesi ölçümü için kullanılan dolaylı yöntemler

Biyolojik örneklerde guanil siklaz (38) ve NOS aktivitesinin ölçümü (75), damar ve/veya damar dışı düz kas preparatlarının kullanıldığı biyoanaliz, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, L-arjinin (61), cGMP (33), L-sitrülin (45), biyopterin ve nitrit/nitrat (18) gibi NO metabolizmasının dayanıklı son ürünlerinin ölçülmesi NO varlığı hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca NO sağlayıcıları (5, 74), NOS inhibitörleri (5, 63) ve guanozin trifosfat siklohidrolaz 1 inhibitörleri (28) gibi NO oluşumu üzerine etkili maddelerin kullanılması NO oluşumu üzerine bir tahmin sağlamaktadır. Bu yöntemlerin hepsinin özellikleri farklıdır ve NO oluşumu ile ilgili olarak doğrudan olmayan bilgiler sağlamaktadır. Sadece cGMP veya sitrülin konsantrasyonlarının ölçümü, NO miktarı ile ilgili nicel bir bilgi sağlamaktadır (16). NO ölçümü için kullanılan bu yöntemlerin özellikle L-arjinin analogları kullanıldığında yanlış bilgiler elde edileceği de bildirilmiştir (4, 10, 26).

2.1.7.1.1. NOS yerleşimlerinin immünohistokimyasal yöntemler ile gösterilmesi

eNOS, iNOS ve nNOS olmak üzere her üç NOS izoformu immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle görüntülenebilir. Bunun için öncelikle uygun fiksasyonla kesitler elde edilir. Elde edilen kesitler özel proteinlerle yıkandıktan sonra NOS proteinlerine bağlanacak olan antikolarla muamele edildikten sonra flüoresan mikroskop ile değerlendirilir (74).

2.1.7.1.2. NOS mRNA ekspresyonunun Western blot yöntemi ile analizi

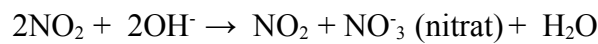
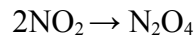
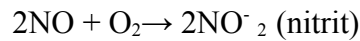
Hücre ve dokudaki NOS protein düzeyleri özel antikorlar kullanılarak Western blot yöntemi ile saptanabilir. Bu yöntemde elde edilen dokulardan kan tamamen temizlenir. Elektroforez yapılarak proteinler ayrıştırılır. Daha sonra proteinler, protein bağlama özelliği olan blot kağıdına veya zarına aktarılır. Protein içeren zarlar, çapraz reaksiyonu engellemek amacıyla özel eriyiklerle yıkanır. Son olarak özel antikorlarla inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra kağıt veya zar üzerindeki özel bantlar saptanır (48, 62, 74).

2.1.7.1.3. NOS aktivitesinin L-arjininin L-sitruiline dönüşümü yöntemi ile ölçülmesi

NOS enzimi L-arjinin, NADPH varlığında ve oksijen kullanarak NO, NADP⁺ ve sitrulin oluşumuna neden olur. Bir başka deyişle NOS L-arjinin L-sitruilin tepkimesini katalizler. Bu yöntem NO düzeyini ölçmemekte sadece NOS aktivitesini değerlendirmektedir. Ölçümün yapılacağı dokular küçük parçalara ayrılıp özel tamponlarla yıkanır, dokulardaki L-arjinin uzaklaştırıldıktan sonra ortama L-arjinin eklenecek şekilde L-sitruilin ölçülür ve NOS aktivitesi belirlenir (15, 21, 27).

2.1.7.1.4. NO metabolitlerinin ölçülmesi

NOS enzimleri aracılığı ile oluşan NO biyolojik dokularda bir dizi reaksiyon sonucu nitrit ve nitrata dönüşür.



NO'nun fizyolojik ortamlardaki yarılanma ömrünün çok kısa olması nedeniyle doğrudan ölçümünün zor olması, bir çok çalışmada araştırmacıları NO'nun dayanıklı son ürünleri nitrit ve nitratın düzeylerini ölçmeye itmiştir. Bu şekilde yapılmış bir çok çalışma mevcuttur (29).

Fizyolojik koşullarda NO 3:2 oranında nitrit ve nitrata okside olmaktadır. NO metabolizmasının en iyi göstergesi nitrit ve nitratın ikisinin birden ölçülmesi ile elde edilir. Günümüzde nitrit ve nitrat miktarları iki aşamalı şekilde ölçülür. Önce nitrat enzimatik dönüşüm veya metalik kadmiyum ile nitrite indirgenir. Oluşan toplam

nitrit ise hemen hemen her örnekte kullanılabilen bir yöntem olan Griess yöntemi ile ölçülür (74).

2.1.7.2. NOS aktivitesi ölçümü için kullanılan doğrudan yöntemler

NO'nun doğrudan olarak gerçeğe yakın konsantrasyonlarının ölçümüne olanak sağlayan yöntemler bulunmaktadır. NO ölçümü için sıklıkla kullanılan aletli yöntemler spektroskopik ve elektroanalitik yöntemlerdir. Bu yöntemlerden bazıları Tablo 2'de verilmiştir. Bu yöntemlerden başka florometrik (54, 74), gaz kromatografisi, gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (4, 19), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (19, 60, 76) ve kapiller elektroforez (19) gibi yöntemler de kullanılmaktadır.

2.1.7.2.1. NO miktarlarının amperometrik yöntem ile ölçülmesi

NO tayini ile ilgili bir çok yöntem olmasına karşın bir kısmı gelişmiş ve pahalı aletlere ihtiyaç gösterirken bir kısmı da gereken hassasiyette olamamaktadır. Son yıllarda çok hassas nanomol (nM) düzeyinde ölçüm yapabilen elektrokimyasal yöntemler geliştirilmiştir. Günümüzde en çok kullanılan elektrokimyasal sensörlerden biri Clark tipi elektrodlardır. Bu sensörün ölçüm ilkesi, NO'nun gaz geçirgen bir membrandan ve ince bir elektrolit tabakasından difüzyonu ve bunu takiben ölçüm elektrodlarını okside etmesine dayanır. Bu oksidasyon membranın dışındaki NO'nun konsantrasyonu ile orantısal bir akım yaratır. Clark problemleri porfirinik esaslı NO sensorlarından daha az duyarlıdır, ancak bu problemler ticari olarak mevcut değildir. Diğer bir NO ölçüm yöntemi ise oksihemoglobinin NO tarafından methemoglobine dönüşümünü içeren yöntemdir. Bu yöntemin duyarlılığı Clark ile mukayese edilebilir düzeydedir fakat gerekli seçicilikten yoksun olabilmektedir. Çünkü HbO₂'nin Met-Hb'e dönüşümü aynı zamanda süperoksit anyonları ile de gerçekleşebilir ve NO'nun yaptığı spektral değişim, aynı zamanda ONOO⁻ tarafından da oluşturulur. Bu tür etkileşimler amperometrik NO ölçümünde görülmez (3, 11, 70).

Amperometrik esasa göre ölçüm yapan bir NO probunda, gaz geçirgen membrandan geçen NO gazı, elektrolitle dolu elektrodun içinde kendi konsantrasyonu ile orantısal bir akım oluşturur. Bu akımın şiddeti NO-metrede

yükseltilecek veri kaydedici ortama aktarılır (79).

Tablo 2. NO'nun doğrudan ölçüm yöntemleri, yararları ve kusurları.

Yöntem	İlke	Ölçüm Hacim (ml)	Ölçüm Sınırı (M)	Yarar	Kusur
Kemolüminesans	NO'nun ozon ile etkileşmesi sonucu ortaya çıkan ışığın spektroskopik ölçümü	2.0	2×10^{-8} - 2×10^{-7}	Doğrudan ve yüksek duyarlılıkla ölçüm. Gaz ve sıvı örneklerde ölçüm kolaylığı, klinikte inhalasyon NO ve nitritinin ölçülebilmesi	Ortamdaki ozon ile etkileşen maddeler nedeniyle ölçüm zorluğu
Elektron paramanyetik rezonans	NO'nun nitronlar veya nitrozo bileşikler gibi nitroksitler veya hemoglobin ile etkileşmesi sırasında oluşan enerjinin spektroskopik ölçümü	0.25	4×10^{-6} - 5×10^{-5}	Sulu ortam, hücreler ve dokularda basit ve yüksek duyarlılıkla ölçüm yapabilmesi	Donanımı oldukça özel ve pahalı olması; ortamın pH'sına bağlı olarak NO-Hb etkileşimi ile sonuçların doğru alınamaması
Methemoglobin spektrofotometrisi	İndirgenmiş Hb'in (Fe^{2+}) NO tarafından methemoglobine (Fe^{3+}) oksidasyonu sırasında oluşan NO_3^- 'ün verdiği absorbansın spektroskopik ölçümü	1.0	2×10^{-9} - 2×10^{-7}	Kolaylıkla ve kısa sürede ölçüm yapılabilmesi	Ortamda bulunan nitrozil gruplarında ölçülmesi
Elektrokimyasal yöntemler	Spesifik elektrotlar üzerinde NO oksidasyonu sırasında oluşan akımın ölçülmesi			Biyolojik örneklerde in situ ölçüm yapılabilmesi	
Clark elektrodu	Platin (anot) ve gümüş (katot) elektrotlardan oluşan modifiye oksijen elektrodu üzerinde sabit bir akım uygulandıktan sonra NO'nun anot üzerinde oksidasyonu ve bu sırada oluşan değişikliğin amperometrik ölçümü	0.1	1×10^{-6} - 3×10^{-4}	Kullanılan elektrodun NO'ya özgün olması; yüksek miktarların ölçülebilmesi; dokularda lokal olarak oluşan NO'nun ölçülebilmesi, kısa zamanda yanıt alınabilmesi	Elektrotları ayıran yarıgeçirgen membrandan geçebilen oksijen ile reaksiyona girerek nitrit oluşumu ile duyarlılığın azalabilmesi
Porfirinik mikroelektrod	NO oksidasyonunun polimerik metalloporfirin üzerinde olması ve oluşan akımın amperometrik ölçümü	1×10^{-9}	1×10^{-8} - 3×10^{-3}	Kullanılan elektrodun NO'ya özgün olması yüksek miktarların ölçülebilmesi, alıcının küçük ve hızlı yanıt vermesi. Endotel ve düz kas hücre kültürlerinde ölçüm yapılabilmesi	Ortamdaki katekolaminlerin de ölçülmesi

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (03.04.2008/121). Bu çalışmada her iki cinsten, 50 adet, 2400-3200 gr arasında beyaz Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Devam eden ölçümler sırasında prob giriş yerlerinde enfeksiyon bulguları olan denekler, genel durumu kötü olan ve ölen denekler çalışma dışı bırakıldı (toplam 18 tavşan). Deney süresince tavşanlar Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde tutuldu. Tüm tavşanlar için ortam ısısı ve nemi aynıydı. Deney sırasında serbest beslenme rejimi uygulandı. Tüm deney Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinde özel olarak hazırlanmış bir bölümde gerçekleştirildi (Şekil 2).



Şekil 2. NO ölçüm odası.

3.1. Deney grupları

Denekler aşağıdaki şekilde gruplandırıldı.

1-Kontrol grubu (n=16)

- a) Kontrol-SF grubu (n=8)
- b) Kontrol-7-AG grubu (n=8)

2-SAK grubu (n=16)

- a) SAK-SF grubu (n=8)
- b) SAK-7-AG grubu (n=8)

Kontrol-SF grubu, SAK oluşturulmadan intravenöz SF infüzyonu yapılarak beyin dokusunda NO ölçümü yapılan deneklerden meydana gelmiştir.

Kontrol-7-AG grubu, SAK oluşturulmadan intravenöz 7-AG infüzyonu yapılarak beyin dokusunda NO ölçümü yapılan deneklerden meydana gelmiştir.

SAK-SF infüzyon grubu, SAK yapılmadan önce ve sonrasında intravenöz SF infüzyonu yapılarak beyin dokusunda NO ölçümü yapılan deneklerden meydana gelmiştir.

SAK-7-AG infüzyon grubu, SAK yapılmadan önce ve sonrasında intravenöz 7-AG infüzyonu yapılarak beyin dokusunda NO ölçümü yapılan deneklerden meydana gelmiştir.

3.2. Anestezi

Tüm deneklerde anestezi için intramuskuler yolla ketamin hidroklorür (Ketalar-Eczacıbaşı) 50 mg/kg ve xylazine (Rompun-Bayer) 5 mg/kg dozunda uygulandı. Analjezi için carprofen (Rimadyl-Pfizer) 4mg/kg subkutan verildi.

3.3. NO probleminin kalibrasyonu

NO ölçümlerinin güvenliği problemlerin kalibrasyonunu sık sık gerektirmektedir. Problemlerin kullanımı, bakımı ve saklanması sırasında meydana gelebilecek hasarlar problemlerin NO ölçümünü doğru yapmamasına neden olmaktadır. NO ölçümünün güvenilir olması sık sık yapılacak kalibrasyon işlemi ile doğrulanmalıdır.

Bu deneyde SNAP'ın yıkılması yöntemi ile kalibrasyon yapılmıştır. SNAP,

kararlı NO içeren ve eriyikler içerisinde ortama istenilen miktarda NO çıkmasını sağlayan bir kimyasal maddedir. Yapılan çalışmalarda bu yöntemin güvenilir NO ölçüm kalibrasyonu yaptığı gösterilmiştir (79, 80). Bu deneyde SNAP'daki NO'nun serbestlenmesi için CuSO_4 kullanılmıştır. CuSO_4 , SNAP'ın NO'ya katalizlenmesini yavaş ve kısmi olarak sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu dönüşüm oranının %60 olduğu tespit edilmiştir (55).

3.3.1. CuSO_4 eriyiğinin hazırlanması

CuSO_4 eriyiği, C.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya AD laboratuvarında hazırlanmıştır. CuSO_4 eriyiğinin hazırlanması için; 5 mg EDTA 250 ml ultradistile su içinde eritildi. Hazırlanan EDTA'lı eriyiğe 5 gr CuSO_4 eklenerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. 0,1 M CuSO_4 eriyiği elde edildi. Hazırlanan eriyikler 20 ml'lik kaplar içine konularak -20 C^0 'de saklandı. Günlük eritilerek kullanıldı. Hazırlanan eriyikler 15 günde bir yenilendi.

3.3.2. SNAP eriyiğinin hazırlanması

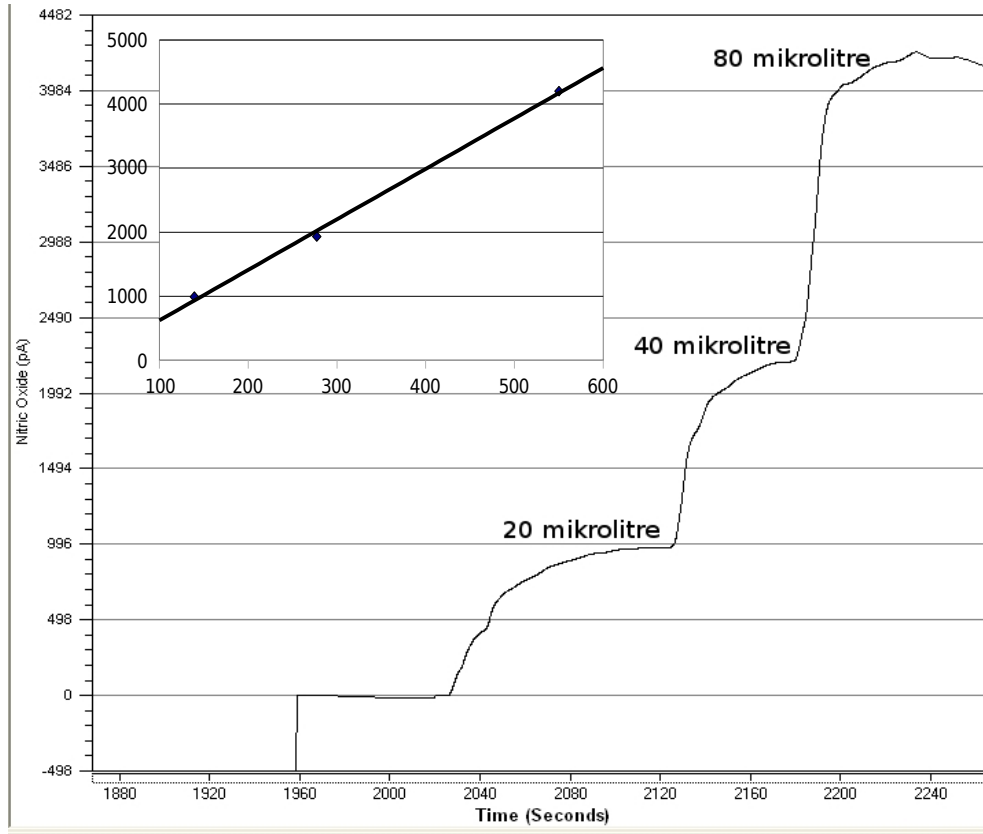
SNAP eriyiği C.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya AD laboratuvarında hazırlanmıştır. Standart SNAP eriyiğinin hazırlanması için; 5 mg EDTA, 250 ml ultradistile su içinde eritildi. Hazırlanan EDTA'lı eriyiğe 5 mg SNAP eklenerek manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı ve 2 ml'lik kaplara konularak -20 C^0 'de saklandı. Günlük eritilerek kullanıldı. Hazırlanan eriyikler 15 günde bir yenilendi.

3.3.3. Kalibrasyon işlemi

20 ml 0.1 M CuSO_4 eriyiği manyetik karıştırıcının olduğu behere konarak NO probu eriyiğe batırıldı. Bilgisayar ortamındaki değer sabitlenene kadar beklendikten sonra mikropipet yardımı ile sırasıyla 20 μl , 40 μl , 80 μl SNAP karışıma eklendi ve NO kalibrasyon eğrileri elde edildi (Şekil 3). CuSO_4 eriyiğine eklenen SNAP, CuSO_4 aracılığı ile SNAP'tan serbestlenmesi beklenen (%60) NO ve kalibrasyon sırasında elde edilen NO Tablo 3'te verilmiştir.

3.4. NO probleminin bakımı

NO probunun, önce enzimatik deterjan eriyiğinde (Enzol, World Precision Instruments, Sarasota, ABD) 5 dakika, ardından distile su içerisinde 5 dakika bekletilerek temizlendi. Problemin sterilizasyonu %3,4 glutaraldehide (Cidexplus, World Precision Instruments, Sarasota, ABD) ile gerçekleştirildi. Bu işlemler her ölçüm günü sonrasında tekrarlandı.



Şekil 3. Kalibrasyon eğrisi örneği. Bu kalibrasyon işleminde regresyon katsayısı 0,9945 ve formülü $y=7,4833x$ olan doğrusal grafik elde edilmiştir. Bu regresyon katsayısı olan bir doğrusal grafiğin elde edilmesi ölçümün güvenilirliğini göstermektedir.

Tablo 3. Kalibrasyon işlemlerinden bir tanesinde SNAP, elde edilmesi planlanan NO ve ölçüm sırasında kaydedilen NO düzeyi.

SNAP	NO = 0,6 X SNAP	Ölçülen NO (pA)
232,4 nM	139,4 nM	992,2 pA
462,0 nM	277,2 nM	1932,0 pA
916,8 nM	550,1 nM	4201,2 pA

pA: pikoAmper, nM: nanoMol.

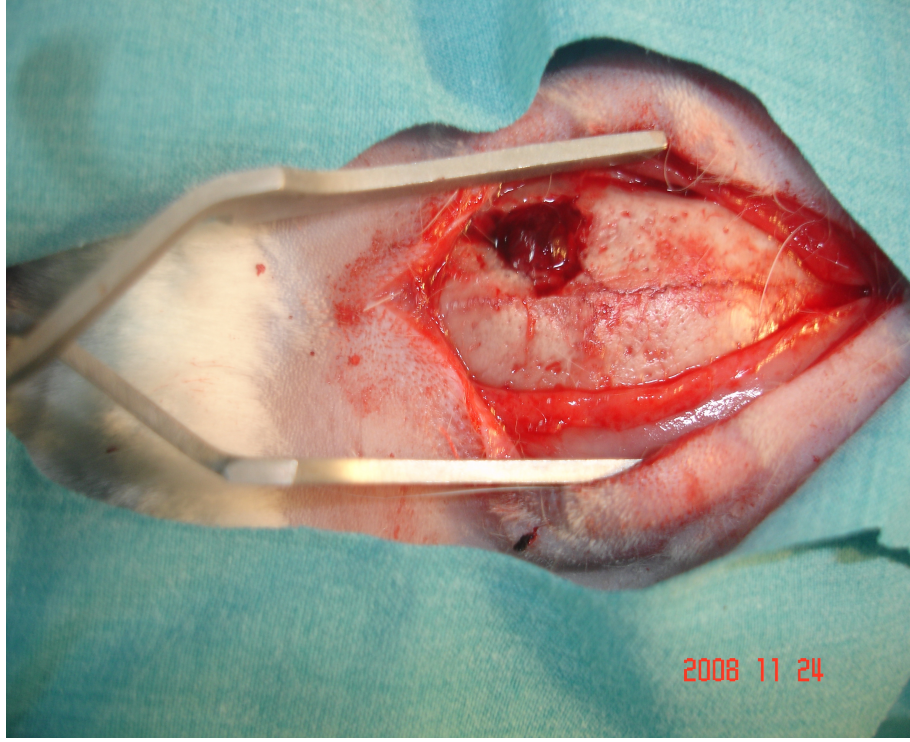
3.5. SAK oluşturulması

Deneklerin suboksipital bölgeleri traş edildikten sonra 23 G iğne ile perkütan olarak sisternal ponksiyon yapıldı. 1 ml BOS alındıktan sonra kateterize kulak arterinden alınan heparinize olmayan kan 1 ml/kg miktarında 1 dakika içinde sisterna magnaya verildi. Denekler kanın subaraknoid mesafeye yayılması için 10 dakika süre ile 45° baş aşağı pozisyonda tutuldu.

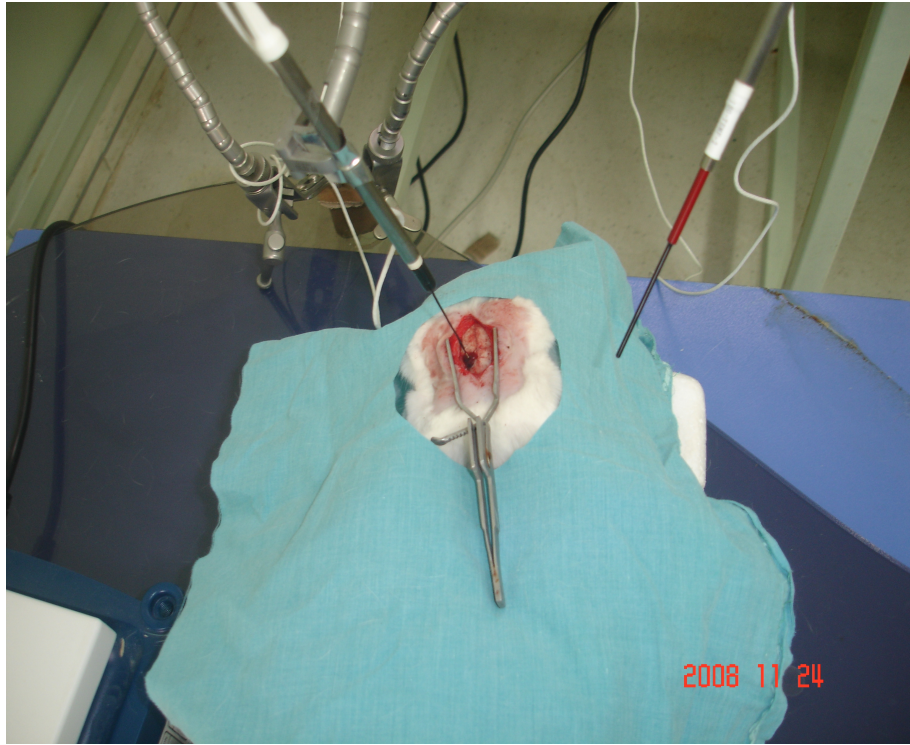
3.6. NO probunun yerleştirilmesi ve NO ölçümü

Prone pozisyonda frontal bölgede gerekli alan temizliği yapıldı ve steril şekilde örtüldü. Orta hat 2 cm vertikal kesi ile cilt, cilt altı geçildikten sonra periost sıyrıldı. Otomatik ekartör yerleştirilerek sol frontale orta hattın 3 mm lateralde kalacak şekilde matkap yardımı ile delik açıldı. Delik yaklaşık 2 cm çapında genişletilerek kraniektomi yapıldı (Şekil 4). Dura, kortikal laserasyon yapılmadan açıldı ve dura açıldıktan sonra mikroskop altında sol frontal beyin dokusu içerisine avasküler bir alana NO ölçüm probu (ISO-NOPF 100 µm, World Precision Instruments, Sarasota, ABD) yerleştirildi. Problar ölçüm boyunca Leyla ekartör tutucusu ile sabitlendi (Şekil 5).

NO ölçümünün birçok dış uyarandan etkilenmesi nedeni ile NO düzeylerinin analizi için ölçülen anlık NO düzeyi değil, 15 dakika süresince her 30 saniyede ölçülen NO düzeylerinin ortalaması kullanıldı.



Şekil 4. Kraniektomi işlemi.



Şekil 5. NO probu ve kafa içi ısı probunun ölçüm sırasında sabitlenmesi.

3.7. Deney protokolü

Kontrol-SF, kontrol-7-AG, SAK-SF ve SAK-7-AG gruplarında tüm ölçümler sırasında deneklerin ortalama kan basınçları, beyin içi ve rektal ısıları monitörize edildi.

Kontrol-SF grubundaki deneklere NO ölçüm probu yerleştirildikten sonra 1 ml/saat hızında SF infüzyonuna başlandı. 15 dakika süre ile beyin dokusu içinden NO ölçümü yapıldı.

Kontrol-7-AG grubundaki deneklere NO ölçüm probu yerleştirildikten sonra 100mg/kg dozunda, 20ml/saat hızında 7-AG infüzyonuna başlandı. 15 dakika süre ile beyin dokusu içinden NO ölçümü yapıldı.

SAK-SF grubundaki deneklerde NO ölçüm probu yerleştirildikten sonra 1 ml/saat hızında SF infüzyonuna başlandı. 15 dakika süre ile beyin dokusu içinden NO ölçümü yapıldı. Daha sonra deneklerde SAK yapıldı, SAK sonrası NO ölçüm probu tekrar yerleştirildi ve 15 dakika süre ile NO ölçümü tekrarlandı.

SAK-7-AG grubundaki deneklerde NO ölçüm probu yerleştirildikten sonra 100mg/kg dozunda, 20ml/saat hızında 7-AG infüzyonuna başlandı. 15 dakika süre ile beyin dokusu içinden NO ölçümü yapıldı. Daha sonra deneklerde SAK yapıldı, SAK sonrası NO ölçüm probu tekrar yerleştirildi ve 15 dakika süre ile NO ölçümü tekrarlandı.

SAK-SF ve SAK-7-AG grubundaki deneklerin yara yerleri dikilerek steril pansuman altında bırakıldı. Takip eden 4 gün boyunca günün aynı saatlerinde aynı bölgeye NO ölçüm problemleri yerleştirilerek beyin dokusu içinden 15 dakikalık NO ölçümleri tekrarlandı. Tekrar eden bu ölçümler sırasında SAK-SF grubundaki deneklere ölçüm boyunca 1 ml/saat hızında SF, 7-AG grubundaki deneklere 100mg/kg dozunda, 20ml/saat hızında 7-AG verildi.

3.8. İstatistiksel değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulguların istatistiksel analizli için SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versiyon 14.0 programı kullanıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde Mann-Whitney U testi, Kruskal Wallis testi ve Friedman testi kullanıldı. Sonuçlar % 95' lik güven aralığında, anlamlılık $p < 0,05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Sistemik bulgular

Kontrol-7-AG, kontrol-SF grubundaki deneklerle SAK-7-AG ve SAK-SF grubundaki deneklerin SAK öncesi ve sonrası beyin dokusu NO ölçümleri sırasında kaydedilen ortalama arteriyel kan basınçları, vücut ısıları ve beyin ısıları birbirleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık bulunamamıştır ($p>0.05$), (Tablo 4), (Tablo5).

Tablo 4. Kontrol grubu deneklerinin ortalama arteriyel basınçlarının (OAB), vücut ısılarının, beyin ısılarının ortalamaları.

	OAB	Vücut ısısı	Beyin ısısı
Kontrol-SF	85	37,6°C	37,4°C
Kontrol-7-AG	87	37,5°C	37,5°C

Tablo 5. SAK grubu deneklerinin ortalama arteriyel basınçlarının (OAB), vücut ısılarının, beyin ısılarının ortalamaları.

	OAB		Vücut ısısı		Beyin ısısı	
	SAK öncesi	SAK sonrası	SAK öncesi	SAK sonrası	SAK öncesi	SAK sonrası
SAK-SF	85	85	37,5°C	37,6°C	37,5°C	37,5°C
SAK-7-AG	89	88	37,4°C	37,7°C	37,2°C	37,5°C

4.2. NO ölçüm bulguları

Kontrol-SF grubundaki deneklerin beyin dokusu ortalama NO düzeyi $3911,38\pm395,85$ pA, Kontrol-7-AG grubundaki deneklerin beyin dokusu ortalama NO düzeyi $3864,62\pm273,53$ pA olarak ölçülmüştür (Tablo 6).

Kontrol-SF ve kontrol-7-AG gruplarındaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında farklar istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Tablo 6).

Tablo 6. Kontrol-SF ve Kontrol-7-AG gruplarındaki beyin dokusu NO düzeyleri.

Kontrol-SF (pA±SD)	Kontrol-7-AG (pA±SD)	
3911,38±395,85	3864,62±273,53	($p>0.05$)

pA: pikoAmper, SD: Standart sapma

SAK-SF grubundaki deneklerin SAK yapılmadan önceki beyin dokusu ortalama NO düzeyi $4048,50\pm395.85$ pA olarak ölçülmüştür. SAK-SF grubundaki SAK yapılmadan önceki beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile kontrol-SF ve kontrol-7-AG grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri karşılaştırıldığında fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK'ı takiben 15. dakikada beyin dokusu ortalama NO düzeyinde anlamlı düşüş olduğu görülmüştür. SAK sonrası 15. dk ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK öncesi ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ve her iki kontrol grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

Takip eden 1. günde beyin dokusu ortalama NO düzeyinde anlamlı yükselme tespit edilmiştir. 1. günde ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi sırası ile SAK öncesi, SAK sonrası 15. dk ve her iki kontrol grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri ile karşılaştırıldığında farklar anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), (Şekil 6) (Tablo 7).

SAK'ı takip eden 2. günde beyin dokusu ortalama NO düzeyinde kısmi bir düşüş tespit edilmiştir. Bu anda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK sonrası 15. dk ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$), sırası ile SAK öncesi, SAK sonrası 1. gün ve her iki kontrol grubunda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki fark ise anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK'ı takip eden 3. günde beyin dokusu ortalama NO düzeyindeki düşüş eğilimi devam etmiştir. Bu anda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK sonrası 15. dk ve SAK sonrası 1. günde ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$), SAK öncesi ve her iki kontrol grubundaki beyin

dokusu ortalama NO düzeyi arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK sonrası 4. günde beyin dokusu ortalama NO düzeyindeki düşüşün devam ettiği tespit edilmiştir. Bu anda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK sonrası 1. günde ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$), diğer zamanlarda ölçülen ve her iki kontrol grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK-7-AG grubundaki deneklerin SAK yapılmadan önceki beyin dokusu ortalama NO düzeyi $3936,38\pm 333.28$ pA olarak ölçülmüştür. SAK-7-AG grubundaki SAK yapılmadan önceki beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile kontrol-SF ve kontrol-7-AG grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri karşılaştırıldığında fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

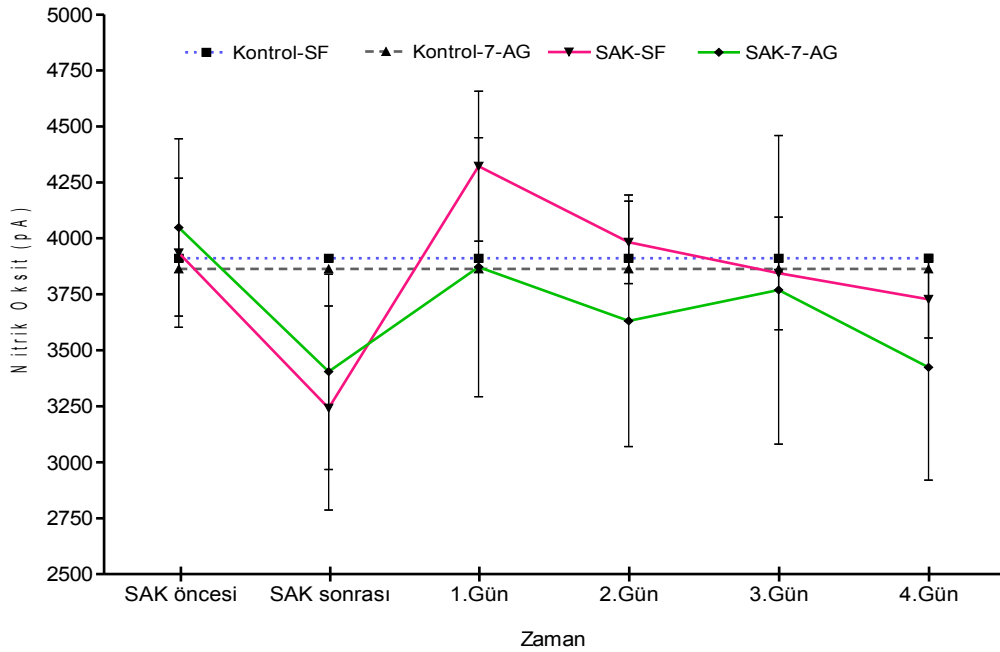
SAK'ı takiben 15. dakikada beyin dokusu ortalama NO düzeyinde anlamlı düşüş olduğu görülmüştür. SAK sonrası 15. dk ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK öncesi ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ve her iki kontrol grubundaki ortalama NO düzeyleri arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

Takip eden 1. günde beyin dokusu NO düzeyinde yükselme tespit edilmiştir. Ancak 1. günde ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi sırası ile SAK öncesi, SAK sonrası 15 dk ve her iki kontrol grubundaki ortalama NO düzeyleri ile karşılaştırıldığında farklar anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK'ı takip eden 2. ve 3. günlerde NO düzeyinde ılımlı bir düşüş tespit edilmiştir. Bu anlarda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri ile sırası ile SAK öncesi, SAK sonrası 15. dk SAK sonrası 1. gün ve her iki kontrol grubunda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki farklar anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK sonrası 4. günde beyin dokusu NO düzeyindeki düşüşün devam ettiği tespit edilmiştir. Bu anda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi ile SAK öncesi ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyi arasındaki fark anlamlı ($p<0.05$), diğer zamanlarda ölçülen ve her iki kontrol grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki fark anlamsız bulunmuştur ($p>0.05$), (Şekil 6), (Tablo 7).

SAK-SF ve SAK-7-AG gruplarında ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri birbirleri ile karşılaştırıldığında 1. günde SAK-SF grubunda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyinin 1. günde SAK-7-AG grubunda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyinden anlamlı şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Takip eden günlerde SAK-SF grubundaki beyin dokusu ortalama NO düzeyinin SAK-7-AG grubunda ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyine göre yüksek kalmaya devam ettiği tespit edilmiş, ancak her iki gruptaki bu günlerde ölçülen beyin dokusu ortalama NO düzeyleri arasındaki farklar anlamsız bulunmuştur ($p>0,05$), (Şekil 6), (Tablo 7).



pA: pikoAmper

Şekil 6. SAK-SF, SAK-7-AG gruplarındaki SAK öncesi, sonrası ve takip eden günlerde beyin dokusu NO düzeyindeki değişim.

Tablo 7. SAK-SF ve SAK-7-AG gruplarındaki SAK öncesi, SAK sonrası, 1., 2., 3. ve 4. günlerdeki beyin dokusu NO düzeyleri ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

	SAK öncesi	SAK sonrası	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün
SAK-SF (pA \pm SD)	3936,38 \pm 333,28	3242,12 \pm 456,08	4322,88 \pm 334,31	3982,00 \pm 184,01	3844,12 \pm 251,63	3727,88 \pm 173,35
SAK-7-AG (pA \pm SD)	4048,50 \pm 395,85	3404,25 \pm 435,88	3871,62 \pm 577,72	3631,50 \pm 561,71	3770,25 \pm 689,36	3425,37 \pm 503,74
	p>0,05	p>0,05	p<0,05	p>0,05	p>0,05	p>0,05

pA: pikoAmper; SD: Standart sapma

5. TARTIŞMA

Subaraknoid mesafeye kanın boşalması ile başlayan fizyopatolojik süreçte hangi yol ya da yolların rol oynadığı geniş araştırma konusu olmuştur. Bu yollardan en dikkat çeken NO'nun dahil olduğu yoldur. NO'nun tüm vücutta olduğu gibi kafa içerisindeki damarlar üzerine de etkin gevşetici etki gösterdiği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (32, 59). Beyin damarları üzerindeki bu gevşetici etkinin kafa içi kan akım dinamiğinin sağlanmasında en önemli işlev olduğu artık bilinen bir gerçektir. Hemodinami üzerine olan bu etkinin anevrizma gibi damarların şekilsel hastalıklarından SAK sonrası gelişen vazospazm gibi işlevsel patolojilere ve beyin dokusu harabiyetinin miktarına kadar çeşitli sonuçlar meydana getirdiği de artık bilinmektedir. SAK sonrası hatta öncesi meydana gelen bu patolojilerde NO'nun rolünü daha iyi anlamak için SAK meydana geldikten hemen sonra ve takip eden günlerde NO'nun düzeyinin bilinmesinin önemi kavranmıştır. Yakın zamana kadar NO metabolitlerinin ölçülmesi bu amaç için kullanılmıştır. Gelişen doğrudan NO ölçme tekniği sayesinde NO düzeyinin bilinmesi mümkün olabilmektedir.

SAK sonrası meydana gelen fizyopatolojik süreçlerde NO'nun yeri birkaç başlık altında toplanabilir:

1. Erken vazospazmdaki rolü
2. Geç vazospazmdaki rolü
3. Kan-beyin bariyerinin bozulmasındaki rolü
4. Toplam mortalite ve morbitideye olan katkısı

Bunlara ek olarak NO'nun SAK sonrası nasıl bir değişim gösterdiği herhangi bir damarsal/BKA patolojisi ile ilişkilendirilmeden de bu çalışmalarda metabolitlerine bakılarak irdelenmiştir (64, 73).

Erken vazospazmın gelişimde NO'nun nasıl bir etki gösterdiği açık değildir. Yapılan bazı çalışmalarda SAK sonrası 10. dakikada NO metabolitlerinin (nitrat, nitrit) beyin çeşitli bölgelerinde azaldığı tespit edilmiş ve bunun erken vazospazmın bir nedeni olabileceğini iddia edilmiştir (69).

SAK sonrası NO düzeyinin en çok ilişkilendirildiği sorun geç vazospazm olmuştur. Çeşitli çalışmalarda geç vazospazm ile NO düzeyi arasında ilişki aranmıştır. Woszczyk ve ark. geç vazospazm gelişen hastaların serumlarında NO metabolitlerini

anlamli olarak yuiksek bulmuşlar, bu durumu NO'nun beyin iskemisi sonucu yuikseldiği ya da yuiksek NO'nun damar endotelini bozduğu şeklinde açıklamışlardır (78). Bu NO yuiksekliğinin iNOS aktivitesinde artma sonucu meydana gelebileceği bir çok çalışmada gosterilmiştir (9, 67, 68).

NO düzeyinin yuiksekliği ile beyin dokusu hasarı ve kütü prognoz arasında ilişkiler bulunmuştur. iNOS enzimi aracılığı ile ortaya çıkan NO metabolitlerinin yuiksek bulunduğu hastalarda enerji metabolizmasında bozukluk, beyin dokusu oksijen miktarında azalma ve kütü prognoz tespit edilmiştir (40, 65).

Bu alışmada NO düzeyi SAK oluşturulduktan hemen sonra SF ve 7-aminoguanidin verilen deneklerde anlamli şekilde dűřműřtür. Bu durum ilgili yayınlarda bildirilen verilere paraleldir. Erken vazospazmın bu NO dűřűřü ile açıklanması olası gürnmektedir. Subaraknoid mesafeye dolan kandaki hemoglobin, mevcut eNOS tarafından sentezlenen ve damar çapını kontrol eden NO'yu hızla bağlayarak ortamdan uzaklaşmasına neden olmuş ve NO miktarı azalmış olabilir. Damar gevşetici faktörde bir kusur meydana geleceğinden vazokonstriksiyon meydana gelecektir. Bu çalışmada damar çap analizi yapılmadığından varsayımda bulunulmak durumunda kalınmıştır. Ancak ilgili yayınlarda eNOS kaynaklı NO'nun damar duvarına etkisi ayrıntılı biçimde açıklanmıştır. Henüz inflamasyon gelişmediğinden iNOS aktif hale gelmemiştir. iNOS'un NO sentezine katkısı henüz ortaya çıkmamıştır. Nitekim SAK-SF ve SAK-7-AG gruplarında SAK meydana geldikten hemen sonra ölçülen NO düzeyleri arasında fark bulunamamıştır.

SAK sonrası 1. günde NO düzeyinde ciddi bir yuikselme tespit edilmiştir, bu yuikselme SAK-SF grubunda daha fazladır. Nitekim SAK-SF grubunda NO düzeyi SAK öncesi düzeyin anlamli şekilde üzerine çıkarken SAK-7-AG grubunda ancak SAK öncesi düzeye kadar çıkabilmiştir. Bu yuikselme birkaç şekilde izah edilebilir.

iNOS aktivasyonu. İnflamasyonun bařlaması ile aktif hale gelen iNOS'un ařırı ve kontrolsűz NO salgılamaya bařlamıştır. SAK sonrası dönemde iNOS aktivitesinin arttıđı bir çok çalıřma ile gosterilmiştir (67, 68). SAK-SF grubundaki 1. günde ölçülen NO düzeyi ile SAK-7-AG grubundaki 1. günde ölçülen NO düzeyine göre anlamli řekilde yuiksek ölçülműřtür. 7-AG seçici olarak iNOS enzimini baskıladıđından SAK-7-AG grubundaki NO düzeyi SAK-SF grubuna göre dűřűk kalmıştır. Bununla beraber, SAK-7-AG grubunda da 1. günde ölçülen NO düzeyi

SAK oluşturulduktan sonra ölçülen NO düzeyine göre yüksek çıkmıştır. Bu durum 1. günde 7-AG'nin iNOS'u yeterince inhibe edemediği yani verilen dozun yetersiz kaldığı şeklinde yorumlanabilir.

NO'nun bağlanmasıdaki doygunluk. Subaraknoid mesafede aktif kanama durduğundan kan yıkım ürünlerinin miktarı bir süre sonra düşmeye başlayacaktır, oysa NO üretimi devam etmektedir. SAK sonrası 1. günde azalan kan yıkım ürünlerinin bağlanmasından kurtulan NO miktarı yüklemeye başlamıştır. Henüz damar endotelinde hasar meydana gelmemiştir ve eNOS enzimatik faaliyetini sürdürmektedir. 7-AG ile iNOS'un baskılanmasına rağmen SAK-7-AG grubundaki 1. günde görülen NO artışı da bu şekilde açıklanabilir. Artan iNOS faaliyeti ve henüz devam eden eNOS faaliyeti birlikte SAK sonrası 1. günde NO miktarını artırmıştır.

1. günden sonra NO düzeyinde her iki grupta da düşüş tespit edilmiştir. Bu düşüş SAK-7-AG grubunda daha belirgin olmuştur. 4. günde SAK-SF grubunda NO düzeyi hemen hemen SAK öncesi değere dönerken SAK-7-AG grubunda SAK öncesi düzeyin de altına inmiştir; bu anda ölçülen NO düzeyi ile SAK öncesi ölçülen NO düzeyi arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Bu düşüş yayımlardaki bilgilerle uyuşmamaktadır İlgili yayımlarda NO düzeyinde kanamayı takip eden günlerde hep yükselme tespit edilmiştir. Bu durum çeşitli patolojilerle bağdaştırılmış ve iNOS aktivasyonuna bağlanmıştır.

SAK-7-AG grubunda 4.günde meydana gelen aşırı NO düşüşü hem iNOS blokajı hem de bozulmuş eNOS enzim aktivitesi ile açıklanabilirken SAK-SF grubundaki aşırı olamayan NO düşüklüğü de olmayan eNOS aktivitesinin iNOS tarafından ikame edilmesi ile açıklanabilir. SAK sonrasında endotelde hasar meydana geldiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (17, 35). Ayrıca ADMA'in eNOS'u inhibe ettiği yakın zamanlarda yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (36, 58). Endotel hasarı ve ADMA'nın inhibisyonunun kan yıkım ürünleri ile inhibisyonu eNOS kaynaklı NO üretiminde azalma olarak karşımıza çıkacaktır. Yayımlarda tespit edilen geç dönem aşırı NO yüksekliği ile bizim bulgumuzun uyuşmaması geç SAK döneminde NO metabolitlerinin ölçüm tekniğindeki bir sorundan kaynaklanabilir. Doğrudan NO ölçümü gerçek sonucu vermiştir.

NO'yu doğrudan ölçmenin bazı zorlukları vardır. Bunlardan bir tanesi problemlerin ölçüm güvenilirliğidir. Yapılan çalışmalarla kullandığımız problemlerin doğru ölçüm

yaptığı gösterilmiştir (79).

Bir diğer sorun kalibrasyon güvenilirliği ve sık sık kalibrasyon yapma gereğidir. Kalibrasyon tekniği çalışmalarla açıklanmış olmasına rağmen sık kalibrasyon yapma gereği sorunu aşılmış görünmemektedir (79, 80).

Bir başka sorun NO ölçüm sırasında artefakt yapabilecek unsurların çokluğudur. En tipik artefakt sebebi problemlerin hareket etmesidir. Ayrıca hava akımı, güneş ışığı, manyetik unsurlar da artefakta neden olmaktadır. Bu çalışmada artefaktı engelleyecek tüm önlemler alınmış ve anlık ölçümler yerine doğrusal bir plato elde edildikten sonra belirlenen bir süre ölçülen değerlerin ortalaması kullanılmıştır. Meydana gelen aşırı ve ani sapma durumlarında denek çalışma dışı bırakılmıştır.

Çalışmamızda ölçümlerin 4. günde sonlandırılması, BOS içerisinde ölçüm yapılmaması, NO ölçüm işlemine ilave olarak kafa içi basıncı, beyin kan akımı gibi parametrelerin ilave edilmemiş olması ve NO yıkım ürünlerinin ölçümünün eş zamanlı yapılmamış olması bu çalışmanın eksikleridir. Elde ettiğimiz veriler beyin dokusunda NO düzeyindeki değişimi ortaya koymuş SAK sonrası görülen patolojik süreçlere ışık tutabilecek veriler sağlamıştır.

6. SONUÇLAR

1. Beyin dokusunda NO düzeyi amperometrik yöntemle doğrudan ölçülebilir.
2. SAK'dan hemen sonra NO düzeyi beyin parankiminde ani ve anlamlı olarak düşmektedir.
3. SAK'dan sonraki 1. günde NO düzeyi anlamlı olarak yükselmektedir.
4. SAK'dan sonraki 2. günde ve sonrasında NO düzeyi yükselmeye devam etmekte ve SAK öncesi düzeye dönme eğilimi göstermektedir.
5. SAK'dan sonra eNOS kaynaklı NO miktarında azalma olurken iNOS kaynaklı NO üretimi artmaktadır.
6. SAK sonrasında görülebilen damarsal ve/veya BKA patolojileri ile NO düzeyi arasındaki ilişkiler doğrudan NO ölçümü ile bu patolojilere has eş zamanlı yapılacak ölçümlerle ortaya konabilir.

7. KAYNAKLAR:

1. Afshar JKB, Pluta R, Book RJ, Thompson BG, Oldfield HE: Effect of intracarotid nitric oxide on primate cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 38: 118-122, 1995.
2. Alabadi JA, Torregrosa G, Miranda FJ, Salom JB, Centeno JM, Aibroch E: Impairment of the modulatory role of nitric oxide on the endothelin-I elicited contraction of cerebral arteries: A pathogenic factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage? *Neurosurgery* 41: 245-251, 1997.
3. Allen BW, Piantadosi CA: Electrochemical activation of electrodes for amperometric detection of nitric oxide. *Nitric Oxide* 8: 243-252, 2003.
4. Archer S: Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J* 7:349-360, 1993.
5. Assereuy J, Cunja FQ, Liew FY, Moncada S: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br J Pharmacol* 108: 833-837, 1993.
6. Atalık KE, Doğan N: Nitrik oksid ve fizyolojik etkileri. *Genel Tıp Derg* 7: 167-169, 1997.
7. Bayındır O, Soydan İ, Ülker S: Nitrik oksidin patolojik olaylardaki rolü, Ege Üniversitesi Yayınları, İzmir, 1996, 89 s.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA: Apperent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implication for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624, 1990.
9. Berra LV, Carcereri De Prati A, Suzuki H, Pasqualin A: The role of constitutive and inducible nitric oxide synthase in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci* 51:1-9, 2007.
10. Bogle RG, Moncada S, Pearson CD, Mann GE: Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell L-arginine transporter. *Br J Pharmacol* 105:768-770, 1992.
11. Boo YC, Tressel SL, Jo H: An improved method to measure nitrate/nitrite with an NO-selective electrochemical sensor. *Nitric Oxide* 16: 306-312, 2007.
12. Bowler JW, Wade JP: Cerebral blood flow. Crockard A, Hayward R, Hoff JT

- (ed), *Neurosurgery The Scientific Basis of Clinical Practice*, Boston: Blackwell Scientific Publications, 1992, s. 123-145 içinde.
13. Brendt DS, Synder SH: Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* 8: 3-11, 1992.
 14. Brian JE, Faraci FM, Heistad DD: Recent insights of the regulation of cerebral circulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:449-457, 1996.
 15. Brown CA, Patel W, Wilkinson G, Boarder MR: P₂ purinoceptors-stimulated conversion of arginine to citrulline in bovine endothelial cells is reduced by inhibition of protein kinase C. *Biochem Pharmacol* 52: 1849-1854, 1996.
 16. Chunningham JM, Rayne RC: Radiochemical measurement of NOS activity by conversion of L-arginine to citrulline using HPLC separation. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 75-81 içinde.
 17. Clower BR, Yamamoto Y, Cain L, Haines DE, Smith RR: Endothelial injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats: effects on brain blood flow. *Anat Rec* 240: 104-114, 1994.
 18. Dejam A, Hunter CJ, Schechter AN, Gladwin MT: Emerging role of nitric oxide in human biology. *Blood Cells Mol Dis* 32: 423-429, 2004.
 19. Ellis G, Adaita I, Yazdunpanah M, Makela SK: Nitrite and nitrate analyses: A clinical biochemistry perspective. *Clin Biochem* 31: 195-220, 1998.
 20. Faraci FM: Endothelium-derived vasoactive factors and regulation of the cerebral circulation. *Neurosurgery* 33: 648-659, 1993.
 21. Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Postol L, Ward J: Activation of nitric oxide synthase by β_2 -adrenoceptors in human umbilical vein endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* 126: 1872-1880, 1999.
 22. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
 23. Furchgott RF, Carvalho MH, Khan MT, Matsunaga K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* 24: 145-9, 1987.
 24. Göksel HM, Karadağ Ö, Turaçlar U, Taş F, Öztoprak İ: Nitric oxide synthase

- inhibition attenuates vasoactive response to spinal cord stimulation in an experimental cerebral vasospasm model. *Acta Neurochir (Wien)* 143: 383-391, 2001.
25. Göksel HM, Özüm Ü, Öztoprak İ: The therapeutic effect of continuous intracisternal L-arginine infusion on experimental cerebral vasospasm. *Acta Neurochir (Wien)* 143: 227-285, 2001.
 26. Greenberg SS, Xie J, Spitzer JJ: Nitro containing L-arginine analogs interfere with assays for nitrate and nitrite. *Life Sci* 57:1949-1961, 1995.
 27. Gürdal H, Can A, Uğur M: The role of nitric oxide synthase in reduced vasocontractile responsiveness induced by prolonged alpha 1-adrenergic receptor stimulation in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol* 145: 203-210, 2005.
 28. Hatakeyama K, Yoneyama T: A sensitive assay for the enzymatic activity of GTP cyclohydrolase. Titheradge MA (ed), Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s.265-272 içinde.
 29. Henry Y, Ducrocq C, Drapier J C, Servent D, Pellat C, Guissani A: Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitroso-iron-protein complexes in whole cells. *Eur Biophys J* 20: 1-15, 1991.
 30. Hirose H, Ide K, Sasaki T, Kobayashi M, Ikemoto F, Yano M, Nishibike M: The role of endothelin and nitric oxide in modulation of normal and spastic cerebral vascular tone in the dog. *Eur J Pharmacol* 277: 77-78, 1995.
 31. Iadecola C: Nitric oxide participates in the cerebrovasodilatation elicited from cerebellar fastigial nucleus. *Am Physiol* 263: 156-161, 1992.
 32. Iadecola C: Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20: 132-139, 1997.
 33. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Nat Acad Sci USA* 84: 9265-9269, 1987.
 34. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE: Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Nat Acad Sci USA*

- 90: 8103-8107, 1993.
35. Jamous MA, Nagahiro S, Kitazato KT, Tamura T, Aziz HA, Shono M, Satoh K: Endothelial injury and inflammatory response induced by hemodynamic changes preceding intracranial aneurysm formation: experimental study in rats. *J Neurosurg* 107: 405-411, 2007.
 36. Jung CS, Iuliano BA, Harvey-White J, Espey MG, Oldfield EH, Pluta RM: Association between cerebrospinal fluid levels of asymmetric dimethyl-L-arginine, an endogenous inhibitor of endothelial nitric oxide synthase, and cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 101: 836-42, 2004.
 37. Kajita Y, Takayasu M, Dietrich HH, Dacey RG: Possible role of nitric oxide in autoregulatory response in rat intracerebral arterioles: *Neurosurgery* 24: 834-842, 1998.
 38. Kanda K, Mitchell JA, de Nucci G, Vane JR: Simultaneous measurement of endothelium-derived relaxing factor by bioassay and guanylate cyclase stimulation. *Br J Pharmacol* 98: 630-636, 1989.
 39. Kassel NF, Torner JC, Haley C: The international cooperative study on the timing of aneurysm surgery. *J Neurosurg* 73: 37-47, 1990.
 40. Khaldi A, Zauner A, Reinert M, Woodward JJ, Bullock MR: Measurement of nitric oxide and brain tissue oxygen tension in patients after severe subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 49: 33-8, 2001.
 41. Khurana VG, Smith LA, Baker TA, Eguchi D, O'Brien T, Katusic ZS: Protective vasomotor effects of in vivo recombinant endothelial nitric oxide synthase gene expression in a canine model of cerebral vasospasm. *Stroke* 33: 782-789, 2002.
 42. Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI, McClelland RL, O'Kane DJ, Meyer FB, Meisser I: Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab* 24: 291-297, 2004.
 43. Kiechle FL, Malinsky T: Nitric oxide; biochemistry, pathophysiology and detection. *Am J Clin Path* 100: 567-575, 1993.
 44. Kiriş T, Karasu A, Yavuz C, Erdem T, Unal F, Hepgul K, Baloglu H: Reversal

- of cerebral vasospasm by the nitric oxide donor SNAP in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 141: 1323-1328, 1999.
45. Knowles RG, Salter M: Measurement of NOS activity by conversion of radiolabeled arginine to citrulline using ion-exchange separation. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998: 67-73.
 46. Koedel U, Bernatowicz A, Poul R: Experimental pneumococcal meningitis; Cerebrovascular alterations, brain edema, meningeal inflammation are linked to the production of nitric oxide. *Ann Neurol* 37: 313-323, 1995.
 47. Levine DZ, Iacovitti M, Burns KD, Zhang X: Real-time profiling of kidney tubular fluid nitric oxide concentrations in vivo. *Am J Physiol Renal Physiol* 281:189-194, 2001.
 48. Martin-Sanz, Bosca L: Measurement of NOS mRNA by northern blotting and the ribonuclease-protection assay. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 163-170 içinde.
 49. Medele RJ, Stummer W, Reulen HJ, Steiger HJ: Evidence peroxidative damage by nitric oxide in experimental chronic cerebral vasospasm. *Neurol Res* 18: 277-280, 1996.
 50. Michelakis ED, Archer SL: The measurement of nitric oxide in biological system using chemiluminescence. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 111-127 içinde.
 51. Miranda F C, Alabadi J A, Torregrosa G, Salom J B, Jover T, Barbera M D, Alborch E: Modulatory role of endothelial and nonendothelial nitric oxide in 5-hydroxytryptamine induced contraction in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 39: 998-1004, 1996.
 52. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Eng J Med* 329:202-12, 1993.
 53. Moshage H, Kok B, Huizenga J R, Jansen P L: Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem* 41:892-896, 1995.
 54. Nagano T: Practical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence* 14: 289-290, 1999.

55. Nelli S, Hillen M, Buyukafsar K, Martin W: Oxidation of nitroxyl anion to nitric oxide by copper ions. *Br J Pharmacol* 131: 356-362, 2000.
56. Pluta RM, Thompson G, Dawson TM, Synder SH, Boock RJ, Oldfield EH: Loss of nitric oxide synthase immunoreactivity in cerebral vasospasm. *J Neurosurg* 84:648-654, 1996.
57. Pluta RM, Oldfield EH, Book RJ: Reversal and prevention of cerebral vasospasm by intracarotid infusions of nitric oxide donors in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 87: 746-751, 1997.
58. Pluta RM, Jung CS, Harvey-White J, Whitehead A, Shilad S, Espey MG, Oldfield EH: In vitro and in vivo effects of probucol on hydrolysis of asymmetric dimethyl L-arginine and vasospasm in primates. *J Neurosurg* 103: 731-738, 2005.
59. Pluta RM, Dejam A, Grimes G, Gladwin MT, Oldfield EH: Nitrite infusions to prevent delayed cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *JAMA* 23: 1477-1484, 2005.
60. Rassaf T, Feelish M, Kelm M: Circulating NO pool: Assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 36: 413-422, 2004.
61. Reckelhoff JF, Kellum JA, Blanchard EJ, Bacon EE, Wesley AJ, Krucenberg WC: Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sci* 55: 1895-1902, 1994.
62. Reiling N, Ulmer AJ, Hauschildt S: Measurement of eNOS and iNOS mRNA expression using reverse transcription polymerase chain reaction. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 155-161 içinde.
63. Russel R J: Use of arginin analogs as inhibitors of nitric oxide synthase in rat aortic rings. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 243-250 içinde.
64. Sadimatsu D, Kroda Y, Nagamitsu T, Tsuruta R, Inoue T, Ueda T, Nakashima K, Ito H, Maekawa T: Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of nitric oxide metabolites in postoperative patients with subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med* 29:77-79, 2001.
65. Sakowitz OW, Wolfrum S, Sarrafzadeh AS, Stover JF, Dreier JP, Dendorfer

- A, Benndorf G, Lanksch WR, Unterberg AW: Relation of cerebral energy metabolism and extracellular nitrite and nitrate concentrations in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1067–1076, 2001.
66. Salter M, Knowles RG: Assay of NOS activity by the measurement of conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by NO. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 61-65 içinde.
67. Sayama T, Suzuki S, Fukui M: Expression of inducible nitric oxide synthase in rats following subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res* 20: 79-84, 1998.
68. Sayama T, Suzuki S, Fukui M: Role of inducible nitric oxide synthase in the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurol Res* 21: 293-298, 1999.
69. Sehba FA, Schwartz AY, Cheresnev I, Bedesob JB: Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 604-611, 2000.
70. Schmidt K, Mayer B: Determinations of NO with a Clark-type electrode. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 101-109 içinde.
71. Sönmez O, Unal B, İnalöz S: Therapeutic effect of intracarotid infusion of spermine/nitric oxide complex on cerebral vasospasm. *Acta Neurochir (Wien)* 144:921-928, 2002.
72. Suziki Y, Osuka K, Noda A, Tanazawa T, Takayasu M, Shibuya M, Yoshida J: Nitric oxide metabolites in the cisternal cerebral spinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 41: 807-812, 1997.
73. Suzuki M, Asahara H, Endo S, Inada K, Doi M, Kuroda K, Ogawa A: Increased levels of nitrite/nitrate in the cerebrospinal fluid of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Rev* 22: 96-98, 1999.
74. Titheradge MA: The enzymatic measurement of nitrate and nitrite. Titheradge MA (ed), *Methods in Molecular Biology*, cilt:100, New-Jersey: Humana Press Inc, 1998, s. 83-91 içinde.
75. Weinberg J B, Misukanis M A, Shami P J, Mason S N, Sauls D L, Dittman W

- A, Wood E R, Smith G K, McDonald B, Bachus K E, Haney A F, Granger D L: Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (iNOS) analysis of iNOS mRNA, iNOS protein, biopterin and nitric oxide production by blood monocytes and peritoneal macrophages. *Blood* 86: 1184-1195, 1995.
76. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Jungersten L, Kieler-Jensen N, Lundin S Westjelt VN, Peterson A, Waagstein F: Metabolism and excretion of nitric oxide in humans. An experimental and clinical study. *Circ Res* 73: 1121-1127, 1993.
77. Widenka DC, Medele RJ, Stummer W, Bise K, Steiger HJ: Inducible nitric oxide synthase: a possible key factor in the pathogenesis of chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 90: 1098-1104, 1999.
78. Woszczyk A, Deinsberger W, Boker DK: Nitric oxide metabolites in cisternal CSF correlate with cerebral vasospasm in patients with a subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* 145: 257-263, 2003.
79. Zhang X, Cardoso L, Broderick M, Fein H, Lin J: An integrated nitric oxide sensor based on carbon fiber coated with selective membranes. *Electroanalysis* 14: 1113-1117, 2000.
80. Zhang X: Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors: From dream to reality. *Front Biosci* 9: 3434-3446, 2004.