

T. C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İSKEMİK STROKTA OKSİDATİF STRES VE TOTAL
ANTIOKSİDAN KAPASİTE

Dr. Özlem DOĞAN
UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2010

T. C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İSKEMİK STROKTA OKSİDATİF STRES VE TOTAL
ANTIOKSİDAN KAPASİTE

Dr. Özlem DOĞAN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Üçler KISA

KIRIKKALE

2010

T. C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Biyokimya Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan “İSKEMİK STROKTA OKSİDATİF STRES VE TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE” isimli çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Dr. Özlem DOĞAN’ın “UZMANLIK TEZİ” olarak kabul edilmiştir..

Tez Savunma Tarihi: 16/06/2010

Prof. Dr. Murat KAÇMAZ
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Prof.Dr. Osman ÇAĞLAYAN
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Doç. Dr. Üçler KISA
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, çalışmamın yönlendirilmesi, her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen Doç.Dr. Üçler KISA hocama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim, çalışmalarım ve tezimin hazırlanması aşamasında yardımlarından dolayı Prof.Dr Osman ÇAĞLAYAN hocama teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimimin boyunca bilgi ve deneyimlerinden yaralandığım, mesleki açıdan yetişmemde büyük ilgi ve desteklerini gördüğüm , sevgili hocam Prof.Dr. Osman ÇAĞLAYAN başta olmak üzere Prof.Dr. Murat KAÇMAZ, Doç.Dr. Üçler KISA ve Doç.Dr. Hakan BOYUNAĞA'ya tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Numune toplama sürecinde yardımlarını esirgemeyen Nöroloji Anabilim Dalına teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif duyduğum bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli meslektaşlarım Dr.Hayrunnisa SEZİKLİ, Dr.Ali YALÇINDAĞ, Dr. Hüseyin KURKU'ya teşekkür ederim. Tez çalışma sürecinde yardımlarını esirgemeyen Dr.Hüseyin KURKU, Dr.Arkut İzzet DEMET ve Dr.Nurkan AKSOY başta olmak üzere Ertan KARALÖK ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzakda olsa sevgisini ve desteğini her zaman hissettiğim sevgili eşim Metin DOĞAN'a, sabır ve desteklerinden dolayı aileme sonsuz teşekkürler.

Dr. Özlem DOĞAN

ÖZET

DOĞAN Ö. İskemik Strokta Oksidatif Stres ve Total Antioksidan Kapasite. Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Kırıkkale, 2010

Strok, serebrovasküler hastalığa bağlı ani olarak gelişen çeşitli majör ve bilinmeyen mekanizmalarla oluşan heterojen bir sendromdur. Serebral iskemi sonucu hücre ölümü ve doku hasarına neden olan karmaşık hücresel ve moleküler pek çok olay tetiklenir.

İskemik strok gelişmesinde oksidatif/nitrosatif stres en önemli mekanizmalardan biri olarak kabul görmüştür. Serbest radikaller hücre sinyal iletiminde ve pek çok biyolojik olayda rol oynarlar. Çeşitli enzimatik reaksiyonlarda ve elektron taşıma sisteminde ara ürün olarak sınırlı miktarlarda üretilirler. Oluşan serbest radikaller pek çok antioksidan tarafından çeşitli yollarla zararsız hale getirilirler. Organizmada reaktif oksijen ürünleriyle antioksidan savunma mekanizmaları belli bir denge içerisinde. Bu dengenin bozulması ve serbest oksijen radikalleri oluşumuyla artan oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve inflamasyon gibi birçok olayda yer alarak çeşitli hastalıkların patogeneğinde çok önemli bir rol oynar.

NO pek çok fizyolojik durumda ve hastalıkta anahtar bir role sahiptir. NO düşük düzeylerde beyinde faydalı, düzenleyici ve nöronal aktiviteyi koruyucu etkiler gösterir. Yüksek miktarlarda oksidatif stres ile ilgisine ilaveten hücre hasarına neden olarak öldürücü bir etki gösterir.

Çalışmaya 22 iskemik strok hastası, hipertansiyon ve diabetes mellitus nedeniyle takip edilen 22 hasta ve 27 sağlıklı birey olmak üzere toplam 71 kişi alındı. Şikâyetlerin başlangıcından ilk 24 saat içerisinde hastaneye başvuran ve ilk defa strok öyküsü bildiren iskemik strok hastalarından 0, 24, 48, 72 ve 96. saat kan örnekleri alındı. Strok öyküsü ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan kişilerden sağlıklı kontrol grubu oluşturuldu. Hipertansiyon ve diabetes mellitus strok açısından oldukça önemli risk faktörleri olduğundan, bu hastalıkların her ikisine de sahip endokrinoloji polikliniğinde takip edilen hastalardan hasta kontrol grubu seçildi.

Alınan kan örneklerinden total antioksidan status (TAS), total oksidatif stres (TOS), oksidatif stres indeksi (OSİ), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO), total sülfidril grupları (t-SH), ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri ölçüldü.

Hastaların 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerindeki MDA düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Hasta 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki NO düzeyleri hasta kontrol grubundan ve 96. saat hariç sağlıklı kontrol grubundan yüksek bulundu. İki kontrol grubu karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunun NO düzeylerinin hasta kontrol grubundan anlamlı yüksek olduğu görüldü. Hasta TOS ve OSİ 96. saat değerleri sağlıklı kontrol grubundan, 72 ve 96. saat değerleri hasta kontrol grubundan anlamlı düşük bulundu.

Antioksidan parametreler olan TAS, SOD ve t-SH düzeylerinde gruplar arasında anlamlı diyebileceğimiz farklılıklar tespit edilemedi.

Hasta grubunda yapılan saatler arası karşılaştırmada t-SH, NO, TOS ve OSİ değerlerinde anlamlı farklar bulundu. Özellikle strok sonrası ilk 2 gün yükselen TOS ve OSİ değerlerinin sonraki 2 gün boyunca azalması ilgi çekici sonuçlardan biriydi.

Sonuç olarak iskemik strok fizyopatolojisinde en önemli mekanizmalardan biri olan oksidatif/nitrosatif stres sonucu MDA ve NO'nun arttığı gözlemlendi. TOS değerlerinin 72 ve 96. saatlerde kontrol gruplarındaki değerlerin altına inmesi ve ilk 2 gün yükselen TOS değerlerinin sonraki 2 gün boyunca azalmasının mevcut patolojinin düzelmesine reaktif bir yanıt olabileceği düşünüldü. TAS, SOD ve t-SH'da anlamlı diyebileceğimiz değişikliklerin olmaması bize mevcut patolojinin antioksidan kapasitede belirgin değişikliğe yol açmayacak düzeyde olduğunu gösterse de, tüm bu veriler serebral iskemik strokta daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini destekler niteliktedir.

Ayrıca ölçümlerin periferik kanda yapıldığı düşünüldüğünde; bu ölçümün doku düzeyindeki hasarı ne ölçüde yansıttığı ve dokuya spesifik farklılıklar olup olmadığı da araştırılması gereken diğer hususlardan biridir.

Anahtar kelimeler: İskemik strok, lipit peroksidasyonu, oksidatif stres, total antioksidan kapasite

ABSTRACT

DOGAN Ö. Oxidative Stress and Total Antioxidant Capacity in Ischemic Stroke. Kirikkale University School of Medicine, Medical Biochemistry Department, Thesis of Specialisation, Kirikkale, 2010

Stroke is a heterogeneous syndrome that progresses with various major and unknown mechanisms and occurs suddenly due to the development of the cerebrovascular disease. As a result of cerebral ischemia, many complex cellular and molecular events are triggered which in turn result in cell death and tissue damage.

Oxidative/nitrosative stress has been recognized as one of the most important mechanisms in the development of ischemic stroke. Free radicals play a role in cell signaling and many biological events. They are produced in limited quantities as intermediate products in various enzymatic reactions and the electron transport system. Free radicals are rendered harmless with a variety of ways by antioxidants. Reactive oxygen products and antioxidant defense mechanisms are in balance in the organism. Distruption of this balance and increased oxidative degradation as a result of the formation of free oxygen radicals play an important role in the pathogenesis of various diseases by taking part in a variety of events such as ischemia, hyperoxygenation and inflammation.

NO has a key role in many physiological conditions and diseases. At low levels, NO exhibits useful, regulatory and protective effects of neuronal activity in the brain. At high levels, in addition to its relation to oxidative stress, it shows a lethal effect by causing cell damage.

A total of 71 people were enrolled in the study: 22 patients with ischemic stroke, 22 patients who have been closely watched due to hypertension and diabetes mellitus, and 27 healthy individuals. Blood samples were taken at 0, 24, 48, 72, and 96 hours from the ischemic stroke patients who were admitted to the hospital within 24 hours of the onset of symptoms reporting a history of ischemic stroke for the first time. A healthy control group was formed from the people without history of stroke or any systemic disease. Since hypertension and diabetes mellitus are very important risk factors of stroke, a

patient control group was selected from the patients who have been closely watched by endocrinology clinic due to these two conditions.

The total antioxidant status (TAS), total oxidative stress (TOS), oxidative stress index (OSI), malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), total sulfhydryl groups (t-SH) and superoxide dismutase (SOD) levels were measured in the blood samples. The MDA levels of patients at 0, 24, 48, 72, and 96 hours were found to be statistically significantly higher compared to those of the healthy control group.

The NO levels of the patients at 0, 24, 48, 72, and 96 hours were found to be higher than those of the control patient group and those of the healthy control group except for the 96-hour level in this healthy group. When two control groups are compared, NO levels of the healthy control group were found to be significantly higher than those of the patient control group. The 96-hour TOS and OSI values of the patients were found to be significantly lower than those of the healthy control group and the 72- and 96-hour values of the patient control group.

No significant differences were detected in the levels of antioxidant parameters of TAS, SOD and t-SH when compared among the groups.

Significant differences were found in the t-SH, NO, TOS and OSI values when a time comparison is made within the patient group.

It was especially an intriguing result to observe decreasing values of TOS and OSI for two days which initially had increased for 2 days after the onset of stroke.

In conclusion, it was observed that MDA and NO increased as a result of oxidative / nitrosative stress, one of the most important mechanisms in ischemic stroke pathophysiology. The decline of TOS values below the values of control groups at 72- and 96 hours and the decrease of TOS values for two days after an initial 2-day increase immediately after stroke was thought to be a reactive response to the recovery of the existing pathology. The absence of significant changes in TAS, SOD, and t-SH shows us that existing pathology is in a state that will not lead to a significant change in the antioxidant capacity, however all these data and results support the idea that further detailed studies should be conducted in cerebral ischemic stroke.

In addition, considering that the measurements were performed in the peripheral blood, how well these measurements reflect the extent of tissue damage and whether there are tissue-specific conditions are couple of points that should be studied.

Key words: Ischemic stroke, lipid peroxidation, oxidative stres, total antioxidant capacity

ETİK KURUL ONAYI:

Bu alışmaya TC Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Lokal Etik Kurul Başkanlığı tarafından 27.04.2009 tarih ve 2009/046 sayılı kararı ile ETİK KURUL onayı verilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER	ix
TABLolar	xi
ŞEKİLLER	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemik strok	3
2.2. Serbest Radikaller	12
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	35
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	35
3.3. Kullanılan Yöntemler	36
3.4. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
5. TARTIŞMA	45
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
7. KAYNAKLAR	59

SİMGELER ve KISALTMALAR

- Ca⁺²: Kalsiyum
NO: Nitrik Oksit
SOD: Süperoksit Dismutaz
GPX: Glutasyon Peroksidaz
SAK: Subaraknoid kanama
TACI: Total anterior dolaşım infarktları
PACI: Parsiyel anterior dolaşım infarktları
POCI: Posterior dolaşım infarktları
LACI: Laküner infarktlar
TOAST : Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
K⁺: Potasyum
ATP: Adenozin Trifosfat
GA: Glutamat
NMDA: N metil D aspartat
Cl⁻: Klor
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
O₂⁻ : Süperoksit Radikali
H₂O₂ : Hidrojen Peroksit
•OH: Hidroksil Radikali
ONOO⁻ : Peroksinitrit
NO₂⁻ : Nitrit
NO₃⁻ : Nitrat
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
Fe⁺²: Demir
DNA : Deoksiribonükleik asit
RNA: Ribonükleik asit
RS[•]: Tiyol
RCOO[•]: Organik peroksitler
cNOS: Konstitütif Nitrik Oksit Sentaz

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
nNOS: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
GMP: Guanozin Monofosfat
iNOS: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
NAD(P)H: Nikotinamid-adenin Dinükleotid Fosfat
O₃: Ozon
MDA : Malondialdehit
LOOH : Lipid hidroperoksit
EC-SOD: Ekstrasellüler Süperoksit Dismutaz
GSH: Glutasyon
TOS : Total Oksidan Status
TAS: Total Antioksidan Status
OSİ : Oksidatif Stres İndeksi
t-SH : Total Sülfidril Grupları
GSSG : Okside Glutasyon
GST : Glutasyon S-Transferaz
VCl₃ : Vanadyum Klorür
NEDD : N-(1-Naptil) Etilendiamin Dihidroklorit
HCl : Hidroklorik Asit
TBA : Tiyobarbitürik asit
TMP : Tetrametoksipropan
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
DTNB : Dithio-2-nitrobenzoik asit
NGF: Nerve Growth Faktör

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Bamford ve ark.'larına göre iskemik inme alt gruplarının sınıflandırılması

Tablo 2.2. TOAST sınıflandırması

Tablo 2.3. Serbest Radikal Tipleri

Tablo2.4. Daha potent reaktif ürünleri oluşturmada metal iyonlarının rolleri

Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Ürünleri

Tablo 2.6. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO₂, NO⁺, NO⁻)

Tablo 2.7. Endojen antioksidanlar ve etkileri

Tablo 5.1. Çalışma grubunun yaş ortamları ve cinsiyet dağılımları

Tablo 5.2. Hasta, Sağlıklı Kontrol ve Hasta Kontrol T-SH, MDA, NO,SOD, TAS, TOS, OSI (ort±SD)

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. İskemik Strok Fizyopatolojisi

Şekil 2.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Şekil 2.3. Glutatyon Sentezi

Şekil 2.4. Oksidan ve Antioksidan Denge

Şekil 2.5. Oksidatif/Nitrosatif Stres

Şekil 2.6. Nitrik Oksit Sentaz

Şekil 5.1. Hasta grubu T-SH değerlerinin günlerarası değişimi

Şekil 5.2. Hasta grubu NO değerlerinin günlerarası değişimi

Şekil 5.3. Hasta grubu Total Oksidatif Stres değerlerinin günlerarası değişimi

Şekil 5.4. Hasta grubu Oksidatif stres indeksi değerlerinin günlerarası değişimi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde nöroloji kliniklerinde yatan hastaların yarısından fazlasının tanısı olan serebrovasküler hastalıklar tüm dünyada kardiovasküler hastalıklar ve kanserden sonra en sık ölüm nedenleri arasında üçüncü sırada yer alır. Tam iyileşmenin olmayışı ve uzun dönem sakatlığa yol açmasının yanısıra aileler ve sağlık kurumları için çok büyük sosyoekonomik ve emosyonel sorunlara yol açmakta ve önemli ölçüde iş gücü kaybına da neden olmaktadır (1,2).

Serbest radikaller hücre sinyal iletiminde ve pek çok biyolojik olayda rol oynarlar. Çeşitli enzimatik reaksiyonlarda ve elektron taşıma sisteminde ara ürün olarak sınırlı miktarlarda üretilirler. Organizmada reaktif oksijen ürünleriyle antioksidan savunma mekanizmaları belli bir denge içerisinde. Bu dengenin bozulması çeşitli patolojik problemlere yol açmaktadır. Serbest oksijen radikalleri oluşumuyla artan oksidan yıkım; iskemi, hiperoksijenizasyon ve inflamasyon gibi bir çok olayda yer alarak çeşitli hastalıkların patogeneğinde çok önemli bir rol oynar (3,4,5,6).

Beyin, yüksek oksidatif metabolizma ve yoğun glutamaterjik aktivite nedeniyle pek çok dokuya göre eksitotoksisteye ve serbest radikal hasarına oldukça duyarlıdır (4). Serebral iskemi fizyopatolojisinde, kalsiyum (Ca^{+2}) salınımının, eksitotoksistenin, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunu arttığı hızlanmaktadır. Dokularda yaygın olarak bulunan nitrik oksit'in (NO) fazla miktarlarda oluşması da hücre hasarına neden olmaktadır. NO zayıf bir serbest radikal olmasına rağmen oksidan stresin arttığı durumlarda toksik oksijen türlerine dönüşebilir (4).

Fizyolojik koşullarda organizma serbest oksijen radikallerine karşı süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX) ve katalaz gibi enzimatik, C ve E vitamini gibi non-enzimatik çok sayıda antioksidan tarafından korunur. Yapılan pek çok çalışmada hayvanlara verilen çeşitli antioksidanların stroktan kaynaklanan beyin hasarını azalttığı gösterilmiş ve serbest radikal reaksiyonlarını azaltmanın, dokuları post iskemik hasardan koruyabileceği belirtilmiştir (5,6).

Çalışmamızda mortalite ve uzun süre sakatlık bırakması açısından ülkemiz için de oldukça sık rastlanan bir sorun olan, iskemik strok hastalarında oksidan stres, antioksidan kapasite ve NO düzeylerini ölçüp, stroksonrası günlerde (1-4 gün) değişimlerini gözlemleyerek kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak iskemi strokta oksidatif stres seyrini ve etkilerini değerlendirdik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. STROK (İNME)

Serebrovasküler hastalıklar beyin damarlarının bir veya birden fazlasını ilgilendiren emboli veya trombüle tıkanma, damarın yırtılması, damar duvarının geçirgenliğinin değişmesi, kan akımının vizkositesinin değişmesi gibi herhangi bir patolojik süreç sonucunda beyinde oluşan bozukluklardır. Strok ise serebrovasküler hastalığa bağlı olarak, ani gelişen, fokal yerleşimli bir sendromdur (1,7).

Dünya Sağlık Örgütüne göre strok özellikle 50-80' li yaşlar arasını etkileyen, hızla gelişen, serebral işlevlerin fokal, bazen global bozukluğuna bağlı klinik semptom ve/veya bulgulardır. Strokta vasküler nedenler dışında başka bir neden saptanmaz. Semptomların 24 saatten uzun sürmesi veya ölüm gelişmesi de diğer kriterleridir (7,8).

Strok, yaşa bağlı olarak artan insidans oranları ve değişik risk faktörlerine sahip pek çok klinik alt tiplerin bir karışımıdır (9).

2.1.1. STROK EPİDEMİYOLOJİSİ

Strok, dünyada yaşlı popülasyonun artışı ve risk faktörleri açısından değerlendirildiğinde önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Yapılan bir çok çalışmada ülkeler arasında farklılık göstermekle beraber ilerleyen yaş ve erkek cinsiyette mortalite oranlarının daha yüksek olduğu gösterilmiştir (7,10-16). Strok geçiren hastaların 1/3'ü bir yıl sonra ölmekte, 1/3'ü özürlü kalmakta ve 1/3'ü de kısmi defektli olarak iyileşmektedir. İnme bu açıdan da en fazla sakatlığa ve bağımlılığa yol açan hastalıklar arasındadır (15-18).

2.1.2. STROK İNSİDANSI VE PREVELANSI

Yıllık inme insidansı yaşlara göre incelendiğinde 55-64 yaş arasında 1.7-3.6/1000, 65-74 yaş arasında 4.9-8.9/1000, 75 yaş üzerinde 13.5-17.9/1000'dir (7,12,19). Nencini ve aa.yaptıkları çalışmada 15-45 yaş inme insidansını 10/100.000 olarak bildirmişlerdir (20).

Erkeklerde inme insidansı kadınlara göre 2-3 kat daha fazla iken ileri yaşlarda bu fark azalmaktadır(11,14,21). Siyah ırkta da inme insidansı beyazlara göre daha yüksek bulunmuştur (11,22).

Prevalans, eski ve yeni olgu sayısının risk altındaki kişi sayısına bölünmesiyle elde edilir ve yaşa bağlı olarak artmaktadır. Batı ülkelerinde inme prevalansı 8/1000, Japonya'da 20/1000 olarak bildirilmiştir (7,11). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ortalama yaşam süresinin uzamasına rağmen risk faktörlerinin daha iyi kontrol edilebilir olmasına bağlı olarak ölüm oranlarının azaldığı görülmektedir (9,10,21).

Ülkemizde serebrovasküler hastalıklar nedeniyle hastaneye başvuran olguların yarısından fazlasını stroklu hastalar oluşturmaktadır. Nüfusu giderek yaşlanan bir ülke olduğumuz düşünüldüğünde strok çok önemli ve önlenebilir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir (1,23). Ancak hala strok ile ilgili yeterli ve sağlıklı verilerimiz yoktur.

Kumral ve arkadaşlarının 1998'de 2000 strok hastasında yaptıkları çalışma ülkemizdeki en ayrıntılı çalışmalardan biridir. Bu çalışma ile Ege Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran 2000 hasta epidemiyolojik ve risk faktörleri açısından değerlendirilmiştir. Yaş ortalaması $62,3 \pm 12$ olan 2000 hastanın %55,6'sının erkek ve %44,4'ünün kadın olduğu görülmüştür. Strok hastalarının nedenleri; %77'si iskemik strok, %19'u intraserebral kanama ve %4'ü subaraknoid kanama olarak bulunmuştur (23).

2.1.3. RİSK FAKTÖRLERİ

Serebrovasküler olay ve buna neden olabilecek risk faktörlerinin belirlenmesi, prognoz tayini ve sekonder bir atakdan korunmak için önemlidir. İnme tiplerine göre patolojik durumlar farklılık gösterdiğinden risk faktörleri de birbirinden farklıdır. En önemli risk faktörleri hipertansiyon, kalp hastalığı, atriyal fibrilasyon, diabetes mellitus, sigara ve hiperlipidemidir. Major risk faktörlerine ilave olarak oral kontraseptif kullanımı, postmenopozal dönemde östrojen verilmesi, alkol tüketimi, pıhtılaşma bozuklukları ve azalmış fiziksel aktivite de sayılabilir(1,8,17,24,25).

Kumral ve ark'nın yaptığı çalışmada iskemik stroklu hastalarda, hipertansiyon (%63), hiperkolesterolemi (%37), diabetes mellitus (%35), iskemik kalp hastalığı (%23), atriyal fibrilasyon (%20) ve sigara (%17) risk faktörleri olarak sıralanmaktadır (23).

1- İskemik İnme Risk Faktörlerinin Sınıflandırılması(24,25)

1-Değiştirilemeyen risk faktörleri

- Yaş (en önemli risk faktörlerindendir)
- Cinsiyet
- Irk
- Ailesel

2-Değiştirilebilir risk faktörleri

a- Değiştirildiğinde inme önlenmesindeki etkileri kesinleşmiş faktörler

- Hipertansiyon
- Diabetes mellitus
- Kardiyak hastalıklar
- Geçici iskemik ataklar
- Hiperkolesterolemi ve bazı alt lipid gruplarının yüksekliği
- Asemptomatik karotis stenozu
- Sigara
- Orak hücreli anemi

b- Değiştirildiğinde etkisi kesinleşmemiş faktörler

- Hiperhomosisteinemi
- Sol ventrikül hipertrofisi

3-Etkisi kesinleşmemiş risk faktörleri

- Geçirilmiş inme öyküsü
- Migren
- Oral kontraseptif kullanımı
- Alkol kullanımı
- Fiziksel inaktivite
- Obezite
- Diyet
- Hiperinsülinemi ve insülin rezistansı
- Stres
- Uyku apnesi

- Hemostatik faktörler
- Hiperürisemi
- Hipotiroidi
- Enfeksiyonlar
- Sosyoekonomik özellikler
- İklim ve mevsim (kış mevsiminde daha fazladır)

2.1.4. İNMEDE ETYOLOJİ VE SINIFLANDIRMA

Strok alt tiplerinin sınıflandırmasının klinik pratiklik, epidemiyolojik ve genetik çalışmalar ve randomize akut klinik durumlar açısından kullanılabilir özellikte olması oldukça önemlidir. Strok lezyon bölgesine göre iskemik ve hemorajik (intraserebral hemoraji ve subaraknoid kanama) olarak ikiye ayrılır (8,26).

İskemik strok tüm inmelerin yaklaşık olarak %80'ini, hemorajik inmeler de %20'sini oluşturur (13,27). Ülkemizde, Ege Üniversitesi'nde yapılan çalışmada tüm inmelerin %77'si iskemiktir, bunun %37'si ateroskleroza bağlı inmelerdir (26). İskemik inmelerde ortalama yaş 63 ± 12 , hemorajik inmelerde ortalama yaş 59 ± 12 'dir (26).

2.1.4.1. HEMORAJİK STROK

Hemorajik strok, subaraknoid kanama ve intraserebral hemoraji olmak üzere iki grupta incelenir (1,8). Subaraknoid kanama (SAK); damar içindeki kanın, beyin omurilik sıvısının dolaştığı subaraknoid aralığa açılması demektir. SAK, tüm serebrovasküler hastalıkların yaklaşık %10-11'ini oluşturur. Willis poligonunu oluşturan büyük arterler üzerindeki anevrizmalar olguların %85'inde kanama nedenidir (1,28,34). İntraparankimal kanamalar; putamen, talamus-subtalamus, pons veya serebellumdadır (34). Bu kanamaların büyük çoğunluğu küçük damarların duvarında hipertansiyona bağlı lipohyalin dejenerasyon, fibrinoid nekroz sonucu meydana gelen defektler ve incelmeler sonucunda oluşan zayıf noktalardan yırtılan damarlardan meydana gelmektedir. Hemorajik inmelerin yaklaşık %20 kadarının nedeni hala bilinmemektedir (28,29).

2.1.4.2. İSKEMİK İNMELELER

İskemik strok, beyin damarlarında kan akımının bozulması sonucu oluşan hücre ölümü ve doku enfarktı ile bu damarın beslediği bölgenin fonksiyonlarına bağlı olarak gelişen nörolojik sendromlarla kendini gösterir. Oluşan nörolojik bulgular değerlendirilerek, infarkt yeri ve genişliğini yansıtan infarkt subtiplerinin belirlenmesi ve dolayısı ile prognoz tahmin edilmesi mümkündür. Bamford ve arkadaşları tarafından 1991’de geliştirilen sınıflama bu temele dayanarak yapılmıştır Bamford sınıflamasında etyolojiye yer verilmez, klinik bulgular ön planda tutularak lezyon yeri ve büyüklüğüne göre iskemik inmeler 4 sub tipe ayrılır (30).

Tablo 2.1. Bamford ve aa.’larına göre iskemik inme alt gruplarının sınıflandırılması

- | |
|---|
| 1- Total anterior dolaşım infarktları (TACI) |
| 2- Parsiyel anterior dolaşım infarktları (PACI) |
| 3- Posterior dolaşım infarktları (POCI) |
| 4- Laküner infarktlar (LACI) |

Bu sınıflandırmaya ilave olarak inmeler etyolojik olarak da subtiplere ayrılabilir. Buna göre iskemik strok, aterotrombotik, kardioembolik ve laküner olmak üzere üç klinik kategoriye ayrılır. Ancak bu üç grupta da rahatça sınıflandırılmayan hastalar değişik yazarlar tarafından farklı şekilde sınıflandırılmaktadır. **TOAST** (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) sınıflandırması iskemik inme etyolojisinin beş subtipini belirlemiştir (24,26,31).

Tablo 2.2. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment Sınıflandırması

- | |
|---------------------------------------|
| 1 -Geniş arter aterotrombozu |
| 2- Kardiyembolizm |
| 3- Küçük damar oklüzyonu |
| 4- Strokun nadir görülen etyolojileri |
| 5- Etiyolojisi sınıflandırılmayanlar |

Strok teşhisi klinik bulgular eşliğinde BT/MR ile görüntüleme, kardiyak görüntüleme, ekstrakranial arterlerin görüntülenmesi gibi pek çok tetkik gerektirmektedir (31).

2.1.5. STROK FİZYOPATOLOJİSİ

Vücutta metabolik olarak en aktif olan organlardan biri beyindir. Yaklaşık 1500 gr ağırlığındaki beyin bu aktiviteyi sağlayabilmek için zengin bir kan akımına ihtiyacı vardır. Yetişkin bir insanın beyin dokusunda normal kan akımı her 100 g için ortalama 50-65 mL'dir. Bu miktar bütün beyin için 750-900 mL/dk olup istirahattaki toplam kalp debisinin %15'ini oluşturmaktadır. Beynin metabolizmasına göre, kan akımı değişkenlik gösterebilir ve farklı oranlarda oksijen-glukoz tüketilebilir. Örneğin nöron gövdeleri açısından zengin gri madde yüksek metabolizma ve yüksek serebral kan akımına sahiptir. Metabolik gereksinimleri yüksek olan beyinde kapillerler damarların yoğunluğu fazladır. Beyinde perfüzyon basıncı azaldığında vazodilatasyon, perfüzyon basıncı arttığında vazokonstrüksiyon ile serebral damarlar tarafından kan akımı sabit tutulmaya çalışılır. Serebrovasküler otonöregülasyon olarak adlandırılan bu mekanizma ortalama arteriel basıncı 70-160 mmHg arasında korurken, bu limitleri aşan hipotansiyon ve hipertansiyonda yetersiz kalır.

Beyin kan akımı 100 gr beyin dokusu için dakikada 22 ml'nin altına düştüğü zaman nöronal düzeyde hücre disfonksiyonu görülmeye başlar ve 12 ml'nin altına indiğinde ölüm gerçekleşir. Kan akımı 8-9mL/100g/dk'nın altına düştüğünde süreden bağımsız olarak infarkt oluşur (1).

Temel olarak iskemi 2 fizyopatolojik süreçten meydana gelir:

Birinci süreç; tıkanmaya bağlı beyin dokusunun oksijen ve glikozdan mahrum kalmasıdır.

İkinci süreç; enerji üreten süreçlerin çökmesi nedeniyle gelişen ve sonunda hücre membranının parçalanmasına yol açan bir dizi hücre metabolizma değişikliğidir.

İskeminin sonuçları, yani fonksiyonel ve reversibl mi, yoksa yapısal ve irreversibl mi olacağı iskeminin derecesi ve süresine bağlıdır.

İskemik strokların çoğunda küçük yoğun iskemik merkez ve çevresinde kollateral akımın bulunduğu büyük bir halka bulunur. Buna 'iskemik penumbra' adı verilir. Çevredeki alanda perfüzyon düşüktür ancak kollateral akım sayesinde elektriksel nöronal işlev bozuk olsa da hücrelerde morfolojik değişiklikler olmamıştır, irreversibl harabiyet açısından riskli bir alandır. Bu alandaki iskemik beyin hasarının sanıldığı gibi kısa sürede oluşmadığı da artık bilinmektedir. Penumbra alanı dinamik bir alandır ve belirli bir zaman aralığında uygun tedavi yaklaşımları ile kurtarılabilir. Bu yüzden iskemik strokta terapötik girişimler için hedef alanı oluşturmaktadır. Bu alanda hücreler 4-6 saat canlı kalabilmektedir ve iskeminin şiddet ve süresine bağlı olarak dokuyu infarkta doğru götüren çok kompleks nöronal, glial ve vasküler olaylar meydana gelmektedir. Bu alanda hasarlanmış depolarize hücrelerden hücre dışına K^+ çıkışı artar, protein sentezi suprese olmuştur, ATP azalmıştır. İskemik penumbra elektrofizyolojik olarak aktiftir ve EEG'de yavaşlama görülür. Bu periinfarkt depolarizasyonlar (ya da iskemik depolarizasyonlar), iskeminin oluşumundan sonraki bir saat içinde iskemik çekirdeğin hemen periferinden başlayıp penumbraya doğru yayılmaya başlarlar. Böylece penumbrada başlayan yıkıcı reaksiyonlara karşı yaşam savaşı başlar. Başlangıçta fonksiyonel yetmezlik, metabolik değişiklikler, yapısal bozukluklar ve en son hücre ölümüyle doku nekrozu gerçekleşir (1,4,32,33).

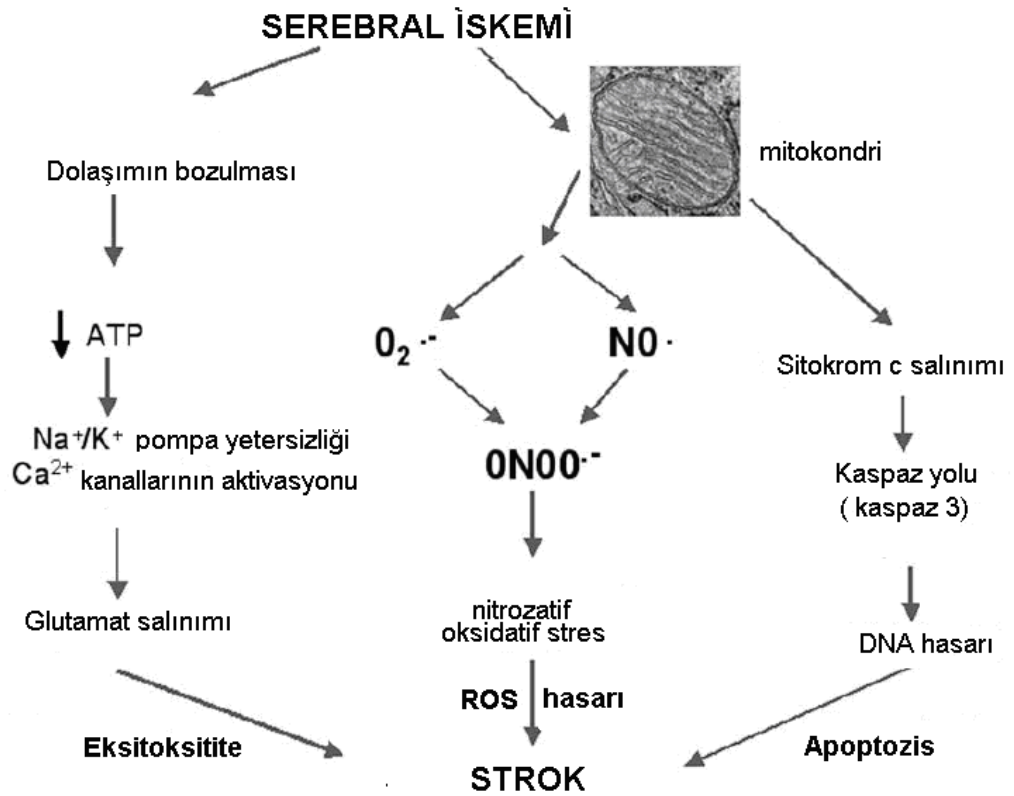
İskemiye bağlı nöron ölümü dört faz olarak özetlenebilir. Bunlar:

- Dakikalar içinde gerçekleşen eksitotoksisite
- Saatler içinde gerçekleşen peri-infarkt depolarizasyon
- Günler içinde inflamasyon
- Apoptoz ve nekroz

Beyin, ihtiyacı olan oksijen ve glukozu sistemik dolaşımdan alır. Sistemik dolaşımdan serebral mikrosirkülasyona gelen kan akımının azalmasıyla ortaya çıkan iskemiden birkaç dakika sonra biyokimyasal bulgular görülür. Beynin enerji metabolizması bozulur, anaerobik glikoliz oluşur. Yüksek enerjili fosfatlar tükenir ve membran iyon pompası iflas eder. İntrasellüler ortamda kalsiyum, sodyum, klor ve su birikir, eksitotoksik nörotransmitterlerin salınımı artar, laktat ve hidrojen iyonları birikmeye başlar. Laktik asidoz ortaya çıkar. Serbest radikaller oluşur, lipaz ve proteaz

enzimlerinin salınımı artar ve hücre ölümü oluşur. Bu fizyopatolojik olaylar sırasında dakikalar ve saatler içinde sitotoksik ödem gelişir ve bu durum reversibl olabilir. 24-72 saat sonra iskemik ödem giderek artar ve yaklaşık 5. gün maksimum düzeylere ulaşır (1,4,32,33,34).

Bu fazlarda rol alan, majör mediatör intrasellüler sitozolik Ca^{+2} 'un kontrolsüz yükselişi, asidoz ve serbest radikallerin artışıdır (4).



Şekil 2.1. İskemik Strok Fizyopatolojisi (35)

2.1.5.1. Glutamat Eksitotoksitesi

Beyindeki en önemli eksitatör nörotransmitterlerden biri glutamik asittir (GA). İn vitro ve in vivo deneysel çalışmalarda aşırı miktardaki eksitatör aminoasitlerin ve analoglarının nörodejenerasyona yol açtığı gösterilmiştir (34). Bu duruma “GA eksitotoksitesi” denmektedir. GA’ın normalde intrasellüler konsantrasyonu, ekstrasellüler konsantrasyonundan çok daha yüksektir ve bunu sağlayan GA taşıyıcı sistemin aktivitesidir. İskemiye maruz kalan nöronlarda ise dakikalar içinde ATP

azalması ile birlikte oluşan nöronal membran depolarizasyonu bu sistemi etkileyerek GA'nın ekstrasellüler konsantrasyonunun artmasına yol açar (4,35).

Ekstrasellüler glutamat artışı kalsiyum kanallarından olan NMDA (N-Metil D Aspartat) ve non-NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna yol açar. Normalde magnezyum ile bloke halde bulunan ve eksitotoksisiteden sorumlu olan NMDA reseptör kanalı, voltaja bağımlıdır. İskemik dokuda nöronal membranlarda NMDA ve non-NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu ile nöron içine Na^+ , Cl^- ve su girişi artar; hücrede şişme meydana gelir. Ancak iskemi sırasında artmış asidite NMDA reseptörünün aşırı aktivitesini inhibe eder. Aktivasyonun daha uzun sürmesi durumunda hücre içine giren Ca^{+2} , fosfolipaz A_2 ve kalpain gibi diğer Ca^{+2} 'a bağımlı enzimlerin aktivasyonuna ve serbest radikal oluşumuna neden olur. NMDA reseptörleri yakınındaki bölgelerde lokal olarak Ca^{+2} yükselir. Ca^{+2} artışının, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini aktive etmesi önemli mekanizmalardan bir diğeridir. Eksitotoksinler mitokondride aşırı miktarda Ca^{+2} birikmesine yol açar; bu da enerji yoksunluğu, sitokrom c salınımı ve süperoksid oluşumunun artışına yol açarak eksitotoksik nöron ölümünü tetikleyebilir (4,32,35,36).

2.1.5.2. Kalsiyum Sitotoksitesisi

Ca^{+2} iyonunun intrasellüler artışı durumunda normal fizyolojik proseslerin aşırı stimülasyonu ile nöronal harabiyet oluşur. İskemide ATP kaybı ile hızlı olarak, masif intrasellüler Ca^{+2} artışı olur. Hücre içine kalsiyum girişinin NMDA ve voltaj-kapılı Ca^{+2} kanallarıyla olduğu düşünülmektedir. Çünkü iskemi ile meydana gelen depolarizasyon sonucu her iki kanal da aktive olmaktadır. İntrasellüler kalsiyumun artışı nöron içinde Ca^{+2} 'a bağımlı birçok enzimin (lipaz, proteaz, endonükleaz) aktive olmasına yol açar. Bu enzimlerin aktivasyonu genel olarak serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu ve protein yıkımına neden olarak nöronun harabiyetine neden olur. Serbest radikal oluşumu Ca^{+2} atılımına engel olarak süreci kısır döngüye sokar. Ayrıca mitokondrideki Ca^{+2} artışının mitokondri membranını daha da hasarlayacağı, enerji azlığını artırıp serbest radikal oluşumunu artıracığı düşünülmektedir (1,4,35).

İnflamasyon

İskemik strokta, saatler içinde inflamatuvar bir reaksiyonun tetiklendiği ve semptomlar ortaya çıktıktan sonraki günlerde de devam ettiği görülmektedir. Lökosit infiltrasyonu sonucu mikroglia ve astrositlerden sitokinler (Tümör Nekrozis Faktör- α , interlökin-1) salınır. İnflamatuvar cevabın önemli göstergelerinden olan sitokinler endotel hücreleri, lökositler ve plateletlerden adezyon moleküllerinin (selektin, integrin) salınımını artırır. Endotele yapışan lökositler kan akım hızının yavaşlamasına neden olur. Aktive lökositlerden sitokin, oksijen radikalleri ve proteazların salınımı hızlanır. Fosfolipaz aktivasyonu ile lökotrienler, eikosanoidler ve platelet aktive edici faktörlerin sentezinde artış meydana gelir. Tüm bu mekanizmalar sonucunda iskemik doku harabiyeti daha da artar. Nöron ölümü tetiklenir (1,4,35).

Apoptoz

Programlanmış hücre ölümüdür. Genetik kontrol altında gelişen apoptoziste hücre kendi ölümünde etkili olan proteinleri sentezlemektedir. Hücre içinde Ca^{+2} ve serbest radikallerin artışı apoptozisi indükler. Kaspaz olarak adlandırılan proteolitik enzimler apoptoziste hücre ölümünün gerçekleşmesinde oldukça önemli bir role sahiptirler (1,4,35).

2.2. Serbest Radikaller

Atom, proton ve nötronlardan oluşan çekirdek ve çekirdeğin etrafında dönen elektronlardan oluşur. Elektronlar enerji seviyelerine göre orbitallere yerleşmişlerdir. Pauli eksklüzyon ilkesine göre her bir orbitalde spinleri zıt yönde iki elektron bulunmalıdır (37,38). Serbest radikaller, bir ya da daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Elektriksel olarak pozitif yüklü, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler, yarı ömürleri oldukça kısadır. Bu tür maddeler ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler. Radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek (redükte veya okside ederek) yeni radikal oluşumuna yol açabilirler ve böylelikle zincir reaksiyonunu başlatırlar (39-42,54).

Tablo 2.3. Serbest radikal tipleri (54)

Radikal tipleri	Örnekler
Hidrojen merkezli	Hidrojen atomu(H [•])
Karbon merkezli	CCl ₃ [•]
Sülfür merkezli	Glutasyon tiyol(GS [•])
Oksijen merkezli	O ₂ ^{•-} , [•] OH, lipid-O ₂ ^{•-}
Delokalize elektron	Phenoksil, C ₆ H ₅ O [•] , NO [•]

Biyolojik sistemde oluşan radikaller organik veya inorganik moleküller halinde bulunurlar. Ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron içeren atom, atom grubu veya moleküller serbest radikal olarak tanımlanırlar. Ancak Fe⁺³, Cu⁺², Mn⁺² ve Mo⁺⁵ gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bazı reaksiyonlardaki katalizör etkilerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar(41).

Tablo 2.4. Daha potent reaktif ürünleri oluşturmada metal iyonlarının rolleri (54)

O ₂ ^{•-}	<i>Fe/Cu</i>	[•] OH
H ₂ O ₂	<i>Fe/Cu</i>	[•] OH
Lipid peroksitler	<i>Fe/Cu</i>	RO [•] , RO ₂ [•] ,
Thiols (RSH)	<i>Fe/Cu ve O₂</i>	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , RS [•] ,
NAD(P)H	<i>Fe/Cu ve O₂</i>	NAD(P) [•] , O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂
Askorbik asit	<i>Cu/Fe</i>	Semidehidroaskorbat,
Katekolaminler,	<i>Fe/Cu/Mn</i>	[•] OH, H ₂ O ₂
Otooksideedilebilir moleküller	<i>Fe/Cu/Mn</i>	O ₂ ^{•-} , H ₂ O ₂ , [•] OH, Semikinonlar

Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir (O₂). O₂, paralel spin durumlu iki ortaklanmamış elektrona sahiptir ve diradikal olarak adlandırılır. Diradikal

yapısındaki oksijen, radikal olmayan maddelerle yavaş reaksiyona girdiği halde serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer (41,42).

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

Organizmada geçiş metalleri (Fe^{+2} ve Cu^{+2} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla moleküler oksijene tek elektron transferi suretiyle oksidasyon reaksiyonları meydana gelir. Moleküler oksijen, diradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROT) oluşturma eğilimindedir (42).

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) oksijenin bir elektron almasıyla oluşur. Eğer iki elektron transfer edilirse oluşan ürün hidrojen peroksittir (H_2O_2). Hidrojen peroksit radikal olmadığı halde kuvvetli oksidan bir maddedir. İki'den fazla elektron alabilir ve oldukça sitotoksik ürünlere dönüşme özelliğine sahiptir. Ferro demir (Fe^{+2}) üçüncü elektronunu hidrojen peroksit'e transfer ederse O-O bağı kırılarak, su ve hidroksil radikali oluşur. $\bullet OH$ radikali en güçlü serbest radikaldir (36,41).

Oluşan reaktif ara ürünlerin hepsi radikal değildir (39-41). Bu özellikleri ile reaktif oksijen ürünleri iki ana başlık altında incelenmektedir. Radikal olmayan bileşiklerin de kimyasal aktivitesi oldukça yüksektir (36,39,40,41,44,45).

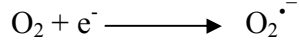
Tablo 2.5. Reaktif Oksijen Ürünleri

RADİKALLER		RADİKAL OLMAYANLAR	
$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit	H_2O_2	Hidrojen peroksit
$\bullet OH$	Hidroksil	1O_2	Singlet oksijen
HO_2^{\bullet}	Hidroperoksil	$HOCl$	Hipokloröz asit
RO^{\bullet}	Alkoksil	$ONOO^-$	Peroksinitrit radikali
ROO^{\bullet}	Peroksil	O_3	Ozon
NO^{\bullet}	Nitrik oksit	$LOOH$	Lipit hidroperoksit
NO_2^{\bullet}	Azot dioksit		

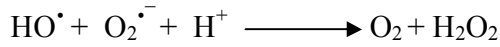
2.2.1.1. Süperoksit Radikalleri($O_2^{\bullet-}$)

Moleküler oksijenin tek elektronla indirgenmesiyle oluşan süperoksit radikali bütün aerobik hücrelerde bulunur. Hem oksitleyici hem de redükleyici özelliğe sahiptir.

Elektron transport zinciri insan vücudunda en büyük süperoksit kaynağıdır. İndirgenmiş geçiş metallerinin oto-oksidasyonu sonucunda da süperoksit radikali oluşabilir (39-41).



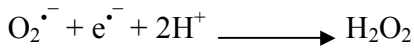
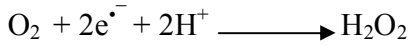
Asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının güçlü bir indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali (HO_2^{\bullet}) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali perhidroksi radikaliyle reaksiyona girince biri okside olur diğeri indirgenir ve moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir (39-41,54).



Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^{\bullet}) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^{\bullet}), hidroksil radikali (OH^{\bullet}), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO^{\bullet}) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (36,39-41).

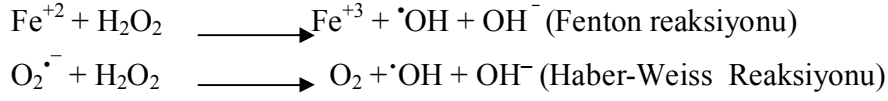
2.2.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Moleküler oksijenin etrafındaki moleküllerden iki e^- alması veya süperoksit radikalının bir e^- alması sonucu oluşur.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($\text{O}_2^{\bullet -}$) dismutasyonu sonucu olur. Dismutasyon sonucu spontan ya da süperoksit dismutazın kataliziyle, iki süperoksit iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturur (39-41,54).

Hidrojen peroksit eşleşmemiş elektronu olmadığı için serbest radikal değildir. Buna rağmen ROT kapsamına girer ve serbest radikal reaksiyonlarında önemli rol oynar. Çünkü Fe^{+2} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu, süperoksit radikalının ($\text{O}_2^{\bullet -}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (HO^{\bullet}) oluşturur (36,39-41,43,54).



Süperoksit radikalinin lipid solubilitesi sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit lipid solubldur. Bu nedenle hidrojen peroksit olduğu yerden uzakta, hasar oluşturabilir (39-41,54).

2.2.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (37,46-48).

Hidroksil radikali son derece oksidan ve yarılanma ömrü çok kısadır. Çok reaktif olduğu için lipid, protein ve nükleik asitler (DNA ve RNA) başta olmak üzere hemen hemen bütün hücrel moleküllerle reaksiyona girebilmektedir. Non-radikal biyolojik moleküllerle zincir reaksiyonlar başlatır. $\cdot\text{OH}$ radikali DNA'nın pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girerek, baz modifikasyonlarına yol açabilir. Hasar çok kapsamlı olursa hücrel koruyucu sistemler tarafından tamir edilemeyebilir ve bunun sonucunda mutasyonlar ve hücre ölümleri meydana gelir (39-41,46,54).

Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyol radikalleri ($\text{RS}\cdot$), karbon merkezli organik radikaller ($\text{R}\cdot$), organik peroksitler ($\text{RCOO}\cdot$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur (41,54).

2.2.1.5. Singlet O_2 ($^1\text{O}_2$)

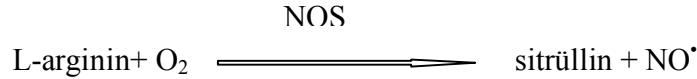
Yapısında ortaklanmamış elektronu bulunmadığından serbest radikal değildir ancak serbest radikal reaksiyonlarını başlattığından serbest radikal sınıfına dahil edilmiştir. Singlet O_2 , oksijenin elektronlarından birinin verilen enerji sonucu kendi dönüş yönünün tersi yönde olan farklı bir yörüngeye yer değiştirmesi neticesi oluşabileceği gibi süperoksit radikalinin dismutasyonu ve hidrojen peroksitin hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda da oluşabilir (39-41).

Tablo 2.6. Reaktif Nitrojen Türleri (NO, NO₂, NO⁺, NO⁻)

NO	Nitrik oksid	NO ⁺	Nitrozil katyon
OONO ⁻	Peroksinitrit	NO [•] ₂	Nitrojen dioksit
ONOOH	Peroksinitröz asid	N ₂ O ₃	Dinitrojen trioksit
NO ⁻	Nitroxyl anyon	HNO ₂	Nitroz asid
NO ₂ Cl	Nitril klorid		

2.2.1.6 Nitrik Oksit (NO)

NO renksiz ve son derece toksik olan atmosferik bir gazdır ve yarı ömrü çok kısadır. NO; bir atom azot ile bir atom oksijenin çiftleşmemiş elektron vererek birleşmesinden meydana gelmiştir ve bu yüzden radikal tanımına uymaktadır. NO lipofilik özellikte olup, oksijensiz ortamda oldukça stabildir ve suda çözünür. Diğer radikallerden farklı olarak düşük dozlarda toksik değildir birçok dokuda fizyolojik süreçlerin kontrolünde yer alan önemli bir sinyal molekülüdür. Nörotransmisyon, immün direnç, apoptozis kontrolü gibi birçok süreçte rol alır. Biyolojik etkilerini hem grupları, sülfidril grupları, demir ve çinko gibi hedef moleküllerde gösterir. NO endotel hücresi, sinir hücresi, makrofaj, trombosit, düz kas hücresi ve birçok hücrede L-Argininden nitrik oksit sentetazlar (NOS) olarak adlandırılan bir dizi enzim tarafından sentezlenir.



NOS fiziko-kimyasal ve kinetik özelliklerine göre iki gruba ayrılır.

a- Konstitutif (yapısal) nitrik oksit sentetaz (cNOS): Özellikle damar endoteli, periferik ve santral sinir sistemi gibi dokularda lokalizedir. eNOS ve nNOS olarak iki izoformu dokularda her zaman mevcuttur, ancak aktif değildir. Hücre içi iyonize Ca⁺² konsantrasyonunun arttığı durumlarda enzim aktiflenir. Bu yüzden, normal biyolojik sistemlerde düşük miktardaki NO sentezinden sorumludur (47-51).

nNOS kaynaklı NO: Santral sinir sisteminde nöromodülatör olarak görev yapar, sinapsların şekillenmesine yardımcı olur, koku alma, görme, ağrıyı algılama, hafızanın oluşması gibi işlevlerde rol oynar.

Periferik sinir sisteminde, nörotransmitterdir, solunum fonksiyonlarında, penil ereksiyonda, gastrointestinal sistem motilitesinde, mesane sfinkter işlevinde ve tüm dokuların kan basınçlarının ve akış hızının düzenlenmesinde rol alır.

eNOS kaynaklı NO: Kan damarı tonusunun ayarlanması, kan basıncının düzenlenmesi ve vazodilatasyondan sorumludur. Endotel kaynaklı NO bilinen en güçlü vazodilatördür. Trombositlerde c-GMP düzeylerini yükselterek hem invivo hem invitro olarak trombosit adezyon ve agregasyonunu inhibe eder.

Lipid peroksit radikalleriyle tepkimeye girerek, hücre içi lipid oksidasyonundaki otokatalitik reaksiyon zincirini bozarak antioksidan ve anti-aterosklerotik etki oluşturur. Düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu artırabilir.

Süperoksit radikalleriyle etkileşir. Süperoksit fazlalığında peroksinitrite bağlı olarak proaterojenik etki oluşabilir. NO fazlalığında ise peroksinitritin prooksidan etkisi NO'nun antioksidan etkisi ile baskılanır ve bu yolla antiaterojenik etki sağlanır (52).

İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz (iNOS): Makrofaj, lökosit, damar endotel hücrelerinde sentez edilmektedir. Aktivasyonu Ca^{+2} 'a bağımlı değildir. Spesifik sitokinlerle aktivasyon sonucu NOS indüksiyonu ve NO sentezi gerçekleşir. İndüksiyon sonrası NO sentezi saatlerce hatta günlerce devam edebilir. Özellikle nonspesifik immünitede önemli rol oynar. Hücrenin genel yapısında mevcut değildir. İskemide olduğu gibi hücrenin sitokinler ile temasını takiben üretimi uyarılır (47-51).

2.2.3. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Serbest radikaller çeşitli dış kaynaklı etkilerle oluşabildiği gibi organizmada normal fizyolojik koşullarda gerçekleşen oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sırasında da oluşan ürünlerdir. Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir (39,41,43).

2.2.3.1. Endojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Metabolizmada normal şartlar altında, bazı biyokimyasal olayların çeşitli basamaklarında serbest radikaller oluşmaktadır. Her ne kadar serbest radikal yapısına

sahip maddelerin organizmaya zarar verme potansiyelleri varsa da, bazı metabolik olayların ilerleyebilmesi için bunların oluşması kaçınılmazdır. ROT hücrede aralıksız olarak üretilmektedir. Hücre organellerinin her biri farklı miktarda radikal oluşumuna sebep olurlar. Kullandığımız oksijenin yaklaşık %3-5'i serbest oksijen radikaline çevrilir (42,53).

- Mitokondriyal elektron transport sistemi fizyolojik koşullar altında serbest radikal üretiminin en önemli kısmını oluşturmaktadır.
- Peroksizomlar güçlü hidrojen peroksit kaynağıdır.
- Endoplazmik retikulumda ve nükleer membranlarda bulunan sitokrom P-450 moleküler oksijeni kullanarak bir çok substratı oksitler.
- Araşidonik asit metabolizması
- Fagositoz
- Hemoglobin gibi metalloproteinler, monoaminler, hormonlar, tiyoller, doymamış membran lipitlerinin otooksidasyonu.
- Glikojen oksidaz, ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz, diamin oksidaz, urat oksidaz gibi enzimlerin katalizlediği oksidan reaksiyonlar (39,41,43,53).

2.2.3.2. Ekzojen Serbest Radikal Üretim Kaynakları

Ekzojen nedenlere bağlı olarak serbest radikaller oluşabilir. Çeşitli yabancı toksik maddeler hücrede serbest radikal üretimini artırır. Bu maddeler ya doğrudan serbest radikal üretirler ya da serbest radikallerin ortadan kaldırılmasını sağlayan antioksidan aktiviteyi düşürürler. Serbest radikal oluşumunun ekzojen kaynakları arasında sigara, pestisitler, çözücüler, petrokimya ürünleri, ilaçlar, alkol, güneş ışınları, stres, X-ışınları hatta yiyeceklerde bulunan bazı bileşikler en önemlileridir. Ağır bedensel aktivite de oksijen kullanımındaki artışla beraber radikal oluşumunu artırmaktadır (39,43).

2.2.4. Serbest Radikallerin Etkileri

Oksijen radikalleri fazla sayıda olmadıkça patolojik etkileri başlamaz. Enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2),

ozon (O₃) ve azot dioksit (NO₂'), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle reaktif oksijen ürünlerinin arttığı iyi bilinmektedir. Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi bütün önemli bileşikler ile tepkimeye girerek hücrede işlev bozukluğu yaparlar (41).

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. İskemi ve sonrasında reperfüzyon da reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak iskeminin oluşturduğu hücre hasarını artırır. Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi kas distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur (42).

Şekil 2.2. Serbest Radikallerin Etkileri



2.2.4.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

ROT ne karşı hücrelerin en hassas kısımları lipitlerdir. Membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin ROT tarafından oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak

bilinmektedir. Lipit peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L•) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO•) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir.

Serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna "nonenzimatik lipit peroksidasyonu" , araşidonik asit metabolizması sonucu oluşan serbest radikallerin neden olduğu lipit peroksidasyonuna ise "enzimatik lipit peroksidasyonu"denir (41,46).

Lipit peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ile membranda lipit radikali oluşur. Lipid radikali (L•) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L•) moleküler oksijenle (O₂) etkileşmesi sonucu lipit peroksit radikalleri (LOO•) ve molekül içi çift bağ pozisyonlarının değişmesiyle konjuge dien yapıları oluşur. Lipit peroksit radikalleri (LOO•), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitlerinin (LOOH) geçiş metalleri iyon katalizi ile aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona erer. Oluşan bileşiklerden biri olan malondialdehid (MDA), membranlarda çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olarak esneklik kaybı, iyon transportu, enzim aktivitesinde bozukluklar ve hücre yüzey determinantlarının agregasyonu gibi pek çok patolojiye yol açar. Lipit peroksidasyon ürünleri ölçümünde tiyobarbitürik asit reaksiyonu, konjuge dienlerin UV absorpsiyonu, oksijen tutma yeteneğinin ölçülmesi gibi pek çok metod kullanılmaktadır. Ayrıca, oluşan dien konjugatlarıyla lipit hidroperoksitlerinin ve son ürünlerden etan ve pentan gibi gazların ölçümü de son yıllarda lipit peroksidasyonunun bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir (39,41,54).

Sonuçta hücre zarının akışkanlığını ve permeabilitesini azaltarak zar bütünlüğünün bozulmasına yol açarlar. Lizozomal membranların hasarı hidrolitik enzimlerin salınması ve intrasellüler sindirimle sonuçlanır. Biriken hidroperoksitler direkt olarak toksik etki göstermenin yanı sıra duyarlı aminoasit kalıntılarını (methionin,

histin, sistein, lizin) okside eder veya zincir polimerizasyon reaksiyonlarıyla enzimleri inaktive edebilirler. Lipit peroksidasyonu sonucu oluşan membran hasarı geri dönüşümsüzdür (41,46).

Nonenzimatik lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve bir çok hastalığa neden olur. Lipit peroksidasyonu ateroskleroz, kanser ,diyabetes mellitus, MI gibi birçok hastalığın ve yaşlanmanın patogenezinde önemli rol oynar (41).

2.2.4.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikal harabiyetine karşı lipidlerden daha az hassasiyet gösteren proteinlerin serbest radikal hasarından etkilenme derecesi içerdikleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Proteinin hücresel lokalizasyonuna ve radikalın toksisite gücüne göre protein hasarının boyutları değişebilir. Doymamış bağ ve kükürt içeren amino asitlerden (triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi) meydana gelmiş proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu yapıları bozulan proteinler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Enzimler de protein yapısında olduklarından enzim aktivitelerinde de (glutasyon redüktaz, gliseraldehid 3 fosfat dehidrogenaz gibi) değişiklikler meydana gelir (39,41,54).(**90-a**)

2.2.4.3. Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyon sonucu iyonlar, serbest radikaller ve aktif moleküller meydana gelir. Oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksisite, büyük oranda, ya nükleik asit baz modifikasyonlarından oluşan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. 8-oxo-D-guanozin mutasyona yol açan en önemli lezyonlardan biridir (39,41,54,55).

2.2.4.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle oluşan ürünler çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Oluşan bu ürünler diabet patogenezinde oldukça önemlidir. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanıp çapraz bağlar oluşturabilirler ve antimitotik etki gösterirler (41,54).

2.2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada okside olabilecek maddelerin (protein, lipid, karbonhidrat, DNA) oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar denir (45,56). Normal hücre metabolizması sırasında oluşan serbest radikaller, karışık bir antioksidan savunma sistemi ile sınırlandırılır. Böylece antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin düşük-sabit konsantrasyonlarda kalmalarını sağlar. Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (45,56).

A- Serbest radikal oluşumunun önlenmesi

- Başlatıcı reaktifleri uzaklaştırıcı etki.
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonunu azaltıcı etki.
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

B-Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

- 1) Toplayıcı etki
- 2) Bastırıcı etki
- 3) Zincir kırıcı etki
- 4) Onarıcı etki

Antioksidanlar, hücre lokalizasyonuna göre; intrasellüler ve extrasellüler, fonksiyonuna göre; radikal oluşumunu önleyen ve radikallerin dokulardaki etkilerini önleyen, yapısına göre de enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılabilirler (53,54).

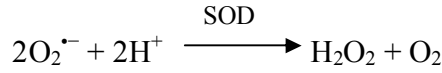
Tablo 2.7. Endojen Antioksidanlar ve Etkileri (41,42,53,57)

ENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon redüktaz Mitokondrial sitokrom oksidaz Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	ETKİLERİ $O_2^{\cdot-}$ anyonunu detoksifiye eder Yüksek konsantrasyonda H_2O_2 detoksifikasyonu Düşük konsantrasyonda H_2O_2 detoksifikasyonu Okside glutasyonun indirgenmesi Radikal oluşumunu önler. $NADP^{+}$ 'ın $NADPH$ 'a dönüşmesi
NONENZİMATİK ANTİOKSİDANLAR α -tokoferol β -karoten Melatonin Askorbik asit Ürat Glukoz Bilirubin Sistein Seruloplazmin Albumin Transferrin Ferritin Laktoferrin Haptoglobulin Hemopeksin Koenzim Q_{10} α -lipoik asit Ürik asit Kreatin	ETKİLERİ Lipit peroksidasyon zincirini kırar Radikal tutar, singlet oksijeni baskılar $\cdot OH$ ve $O_2^{\cdot-}$ tutar E vitamininin rejenerasyonu, $\cdot OH$ ve $\cdot O_2$ tutar Radikal tutar, metal bağlar. $\cdot OH$ tutar Peroksil radikali tutar Elektron vererek organik molekülleri indirger. Bakır bağlar, $O_2^{\cdot-}$ detoksifikasyonunu sağlar. LOOH ve HOCl tutucu, hem ve bakırı bağlar. Dolaşımdaki demiri bağlar. Dokudaki demiri bağlar. Düşük pH'da demir bağlar. Hemoglobin bağlar. Hem bağlar. ETS' de gerekli bir kofaktördür. $\cdot OH$, singlet oksijen, NO tutar $\cdot OH$, peroksil, singlet oksijen tutar. Mitokondri biyoenerjistiklerini korur.

2.2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz

Antioksidan savunmanın ilk basamağını, süperoksidin H_2O_2 ' ye dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimi oluşturur. Spontan olarak da meydana gelebilen bu reaksiyonun hızı SOD varlığında 4000 kat artar (41,58).



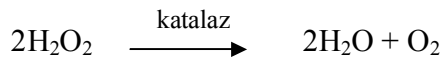
Memelilerde SOD' ın üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ilki dimerik yapıdaki sitozolde ve mitokondrial membranın iç bölümünde yer alan Cu-Zn SOD enzimidir. İkinci tip mitokondrial matriks ve kısmen sitoplazmada bulunan, tetramerik yapıdaki mitokondrial Mn SOD ve üçüncüsü ekstrasellüler alandaki EC-SOD'dır. Genelde hücrede sitozolik Cu-Zn SOD daha fazla miktarlardadır. Her üç SOD aynı reaksiyonu katalizler (41,58).

Genel olarak SOD enzim sistemi, antagonistik olmaktan çok, organizmayı serbest radikal hasarına karşı koruyucu bir sistemdir. Oksidan stresin arttığı bazı klinik durumlarda, aktivitesini arttırarak koruyucu etkinliğini devam ettirmeye çalışır (39,41,56).

Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda aktivitesi yüksektir ve doku pO_2 artışı ile artar. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde intrasellüler süperoksit düzeyi düşük tutulur (6,41).

2.2.5.1.2. Katalaz

Katalaz, dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Sitozolde ve daha çok peroksizomlarda bulunur. Hidrojen peroksitin, moleküler oksijen ve suya dönüşünü katalizler (6,41).

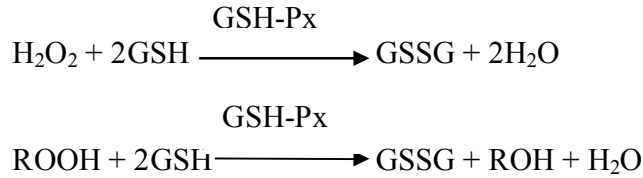


Oksidatif stresin fazla olduğu durumlarda oldukça efektiftir. Özellikle glutatyon miktarının kısıtlı ve azalmış GPx aktivitesinin bulunduğu durumlarda önemli olup,

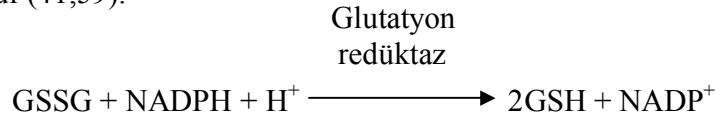
adaptif hücre cevabında oksidatif strese tolerans gelişiminde önemli bir rol oynar (6,41,42,59).

2.2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz

Hücrelerde oluşan hidroperoksitlerin detoksifikasyonundan sorumludur. 4 tane selenyum atomu içerir ve tetramerik yapıdadır. Sitolik bir enzim olan glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ile kolesterol ve yağ asidi hidroperoksitlerine etki ederek su ve lipid alkol oluşumuna yol açar. Oksidatif stresin düşük düzeylerde olduğu durumlarda en önemli korunma şekli GPX/ Glutasyon sistemidir.



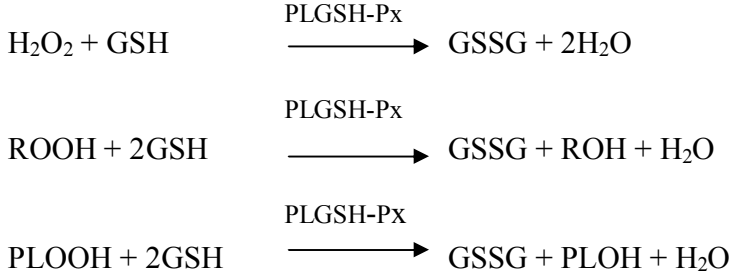
Bu reaksiyonda indirgeyici olarak kullanılan glutasyon (GSH) glutasyon disülfide (GSSG) okside olur. Oluşan GSSG glutasyon redüktaz ile tekrar GSH'a dönüşür (41,59).



Glutasyon proteinlerdeki SH gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra amino asitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar. Sitolde bulunan glutasyon-S- transferazlar selenyumdan bağımsız GSH peroksidaz aktivitesi göstererek serbest radikallerin etkilerinden korunmada ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonundan sorumludurlar (41,55,60).



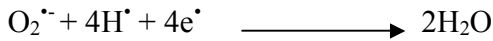
Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi esas olarak membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Membrana bağılı en önemli antioksidan vitamin E yetersiz olduğu zaman PLGSH-Px membranın peroksidasyona karşı korunmasını sağlar (41,55,57).



GSH-Px'in aktivitesindeki azalma veya azalmış glutatyon, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar (41,59).

2.2.5.1.5. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Elektron transport zincirinin son enzimidir ve süperoksidi ($\text{O}_2^{\cdot-}$) detoksifiye eder. Fizyolojik şartlarda sürekli olan normal bir reaksiyondur, bu yolla yakıt maddelerinin oksidasyonu tamamlanır ve bol miktarda enerji üretimi sağlanır. Ancak çoğu zaman süperoksit ($\text{O}_2^{\cdot-}$) üretimi mitokondriyal sitokrom oksidaz enziminin kapasitesini aşar ve bu durumda diğer antioksidan enzimler devreye girerek süperoksidin ($\text{O}_2^{\cdot-}$) zararlı etkilerine engel olurlar (41).

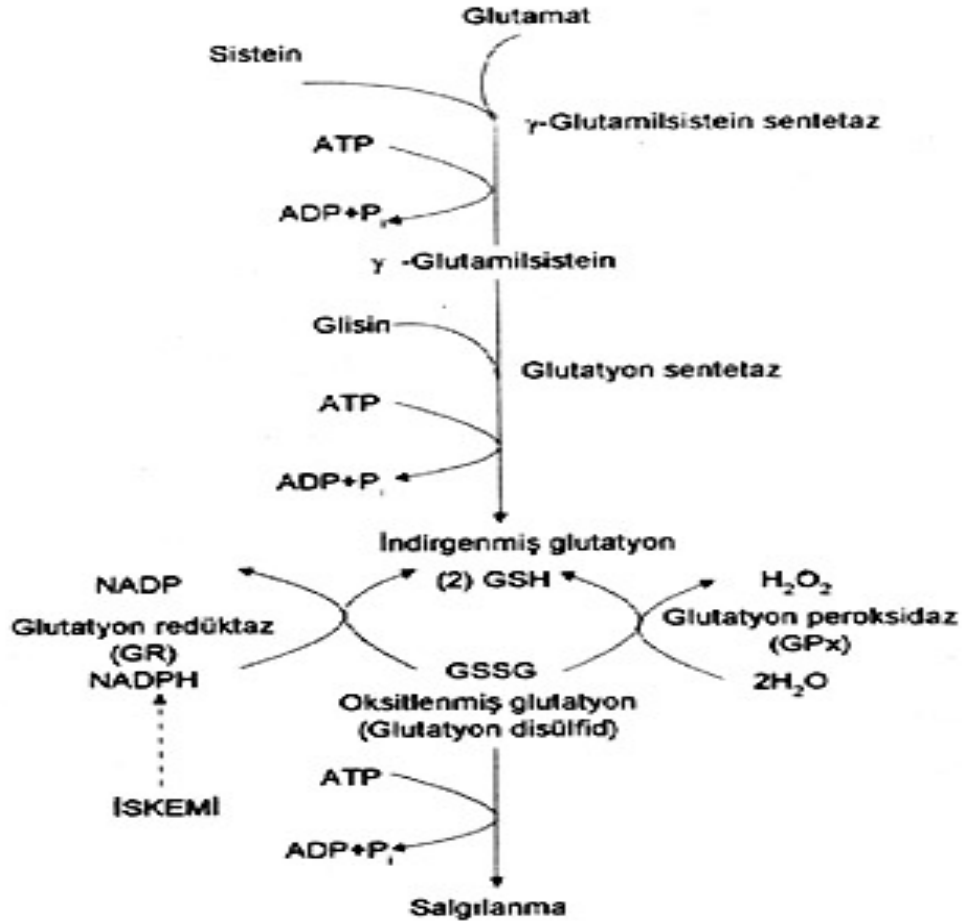


2.2.5.2. Enzimatik Olmayan moleküler Antioksidanlar

2.2.5.2.1. Glutatyon (GSH)

GSH, glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan, intrasellüler konsantrasyonu daha fazla olan bir tripeptiddir. Çok önemli indirgeyici ve antioksidan olan glutatyon, serbest radikaller ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Bunun dışında, proteinlerdeki -SH gruplarının redükte halde tutulması, bazı reaksiyonlarda (gliksilaz reaksiyonu, formaldehid dehidrogenaz gibi) koenzim olarak

görev almasının yanında amino asitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de (tiol-disülfid değişimi) önemli rol oynar (41,57,60).



Şekil 2.3. Glutatyon Sentez ve Siklusu (60)

GSH intrasellüler konsantrasyonu fazla olan bir tiol'dür ve GSH'un GSSG'e oksitlenmesi hücredeki en önemli tiol-disülfid indirgenme reaksiyonlarının kaynağıdır. Tüm bunlar GSH'ın sağlığın devamında oldukça önemli bir faktör olduğunu göstermektedir (55,57).

Glutatyon ve glutatyon metabolizması antioksidan savunma için doku ve kanda mutlaka gereklidir (41,55).

2.5.2.3. Askorbik Asit

C vitamini suda çözünen en güçlü antioksidandır. İnsanlarda sentezlenemediğinden diyetle alınması gerekir. Askorbik asit semidehidroaskorbat radikal ara ürünü üzerinden kolayca dehidroaskorbik aside okside olur. $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$, singlet oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Semidehidroaskorbat da antioksidan etki gösterir. C vitamini, antioksidan aktivite boyunca tokoferoksil radikalinin, α -tokoferole indirgenerek rejenere olmasını sağlar (41,43,61,62).

C vitamini, antioksidan etkileri yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı C vitamini, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olduğu bulunmuştur (41,43,62).

2.2.5.2.2. Vitamin E (α -Tokoferol)

E vitamini yağda eriyen, tokoferol yapısında çok güçlü bir antioksidandır. Hücre zarı fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksid ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, vitamin E'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir.

Vitamin E katıldığı reaksiyonlar sırasında radikal formuna dönüşse de, askorbik asit, glutatyon ve koenzim Q (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline döndürülür. Glutatyon peroksidaz ve E vitamini serbest radikallere karşı birbirlerini tamamlayıcı etki gösterirler. Enzim oluşmuş olan peroksitleri ortadan kaldırırken E vitamini peroksitlerin oluşumunu sentezini (41,55,62).

Deneysel olarak oluşturulan beyin iskemisinde E vitamini seviyesinin azaldığı görülmüştür (41,62).

2.2.5.2.4. Karotenoidler

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -Karotenin singlet oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve $\cdot\text{OH}$, alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan özellik gösterdiği ve lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. Singlet O_2 uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid likopendir (41,62).

2.2.5.2.5.Melatonin

Melatoninin lipid çözünürlüğünün fazla olması nedeniyle doku ve hücrelere kolayca girebilen, sentezi karanlığa bağlı bir hormondur. Son çalışmalar melatoninin hücre çekirdeğinde yüksek miktarlarda bulunduğunu göstermiştir.

Melatonin güçlü bir radikal süpürücü olmasının yanı sıra, radikaller üzerinde dolaylı etkilere de sahiptir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O_2 radikalini H_2O_2 'ye katalizleyen SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NOS enzimini inhibe ederek, antioksidan etki göstermektedir (41,62).

2.2.6. Total Oksidan Status (TOS)

Bilinen pek çok metodla serum ya da plazmadaki oksidan moleküllerin konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilmektedir. Oksidan stresin arttığı durumlarda artan bu moleküllerin oksidan etkileri birbiri üzerine eklenebilir. Ayrıca tek tek ölçümden ziyade total ölçümün daha pratik olacağı düşünülerek tüm oksidanların durumunu yansıtabilecek bir yöntem geliştirilmiştir. Bu metodla in vitro TOS ölçümü yapılabilmektedir (63,64,65).

2.2.7. Total Antioksidan Status (TAS)

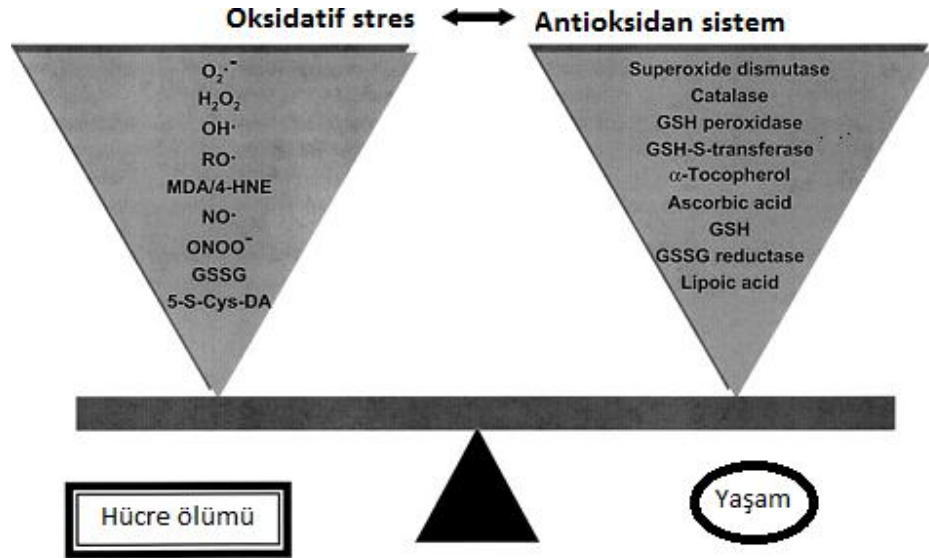
Serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı organizmada ölçülebilir pek çok antioksidan bulunmaktadır. C ve E Vitamini, albumin, bilirubin, ürik asit gibi antioksidan moleküller ve SOD, katalaz, GSH-Px gibi antioksidan enzimler hücreleri oksidan ajanların zararlı etkilerinden korumaktadır. Antioksidan moleküller de

oksidanlar gibi tek tek ölçülebilmektedir. Ancak bu şekilde zaman kaybı ve maliyet açısından daha karmaşık metodlar gerektirmektedir. Son zamanlarda geliştirilen TAS metoduyla enzimatik ve non-enzimatik antioksidanların durumu tespit edilebilmektedir. TAS çeşitli reaktif oksijen ve nitrojen radikallerine karşı organizmanın antioksidan savunma etkisini bir bütün olarak gösterir (64-66).

2.2.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Organizmadaki oksidan/antioksidan dengeyi gösterir. TOS değerlerinin TAS değerlerine yüzde cinsinden oranlanarak bulunur ve oksidatif stresin derecesinin göstergesi olarak kullanılır (67,68).

$$OSİ(\%)= 100 \times (TOS)/(TAS)$$



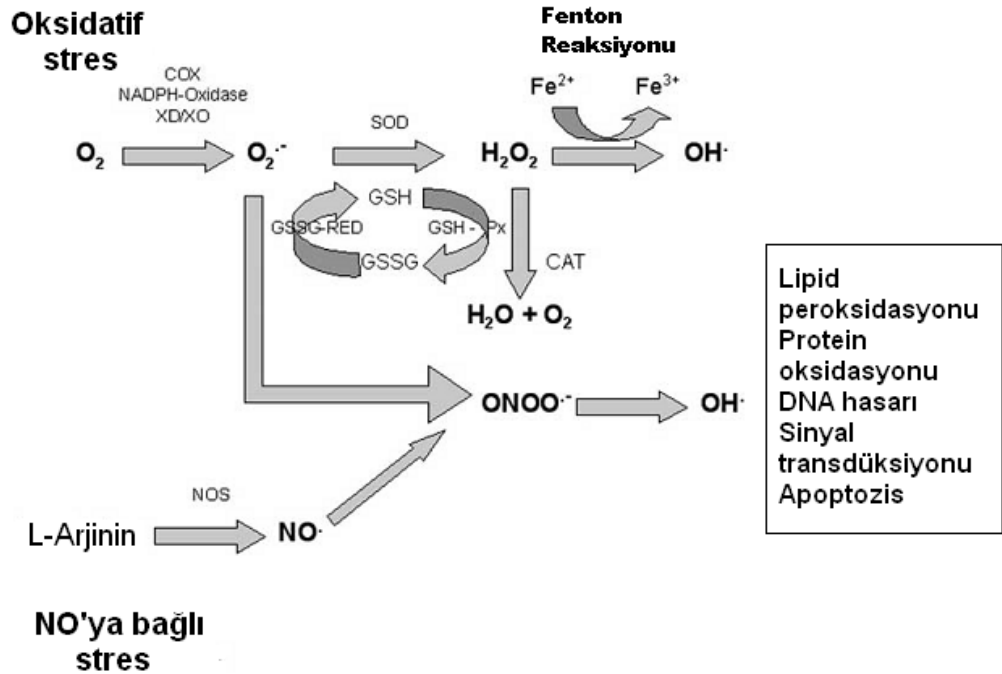
Şekil 2.4. Oksidan ve Antioksidan Denge (60)

İskemik Strok ve Oksidatif Stres

Serbest radikallerin serebral dolaşımında fizyolojik ve patolojik durumlardaki etkileri çok iyi bilinmektedir. Normal şartlarda oluşan süperoksit anyonu ve ürünleri, oksijen homeostazisini düzenlerler, cGMP aktivasyonu ile serebral dolaşımında vazodilatör olarak görev yaparlar ve böylece lokal kan akımının artışında oldukça önemli bir role sahiptirler, immün cevabın oluşmasında, nöronal hücrelerde nerve growth faktör (NGF) iletiminde ve stimülasyonunda etkilidirler (53,69). Serbest radikallerin hücre hasarı oluşturabilmesi için aşırı miktarda oluşması veya antioksidan

mekanizmaların yetersiz olması gerekir. Beyin, vücut oksijeninin %20'sini kullanır. Oksijen ürünleri toksik olduklarından dolayı nöral dokular diğer organlara kıyasla oksidatif hasara daha açıktır. Oksidatif metabolik aktivite hızının yüksek olması, antioksidan sistemdeki yetersizlikler ve lipid içeriğinin fazla olması, gibi nedenlerden dolayı oksidatif strese karşı oldukça sensitiftir (4,46,56,69). İskemide, serbest radikaller ile oksidan ve antioksidan denge oksidatif stres lehine bozulur. Ksantin oksidaz, NAD(P) oksidaz, araşidonik asit metabolizması, monoamin oksidaz ve mitokondrial solunum zinciri gibi hücrel oksidatif metabolik süreçler sonucu süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil ($\cdot OH$) radikallerinin oluşumu artar(70).

Hücredeki intrasellüler kalsiyum artışı ile aktive olan enzimlere bağlı gelişen serbest oksijen radikalleri artışı, nörondaki oksidatif stresin esas nedenidir. Hidroksil radikali ve süperoksit iyonu aşırı reaktiftir ve nükleik asidlere, lipidlere, karbohidratlara ve proteinlere bağlanarak onları zedeler. Serbest radikallerin oluşturduğu hasarda DNA tamir enzimleri ve bazı transkripsiyon faktörleri de hedef olabilir (4,35,56,69,70).



Şekil 2.5. Oksidatif/Nitrosatif Stres (35)

Nitrik Oksit ve İskemik strok

NO pek çok fizyolojik durumda ve hastalıkta anahtar bir role sahiptir. NO düşük düzeylerde beyinde faydalı, düzenleyici ve beyindeki nöronal aktiviteyi koruyucu etkiler gösterir. Yüksek miktarlarda oksidatif stres ile hücre hasarına neden olarak öldürücü bir etki gösterir (35,36,43,52,70,71).

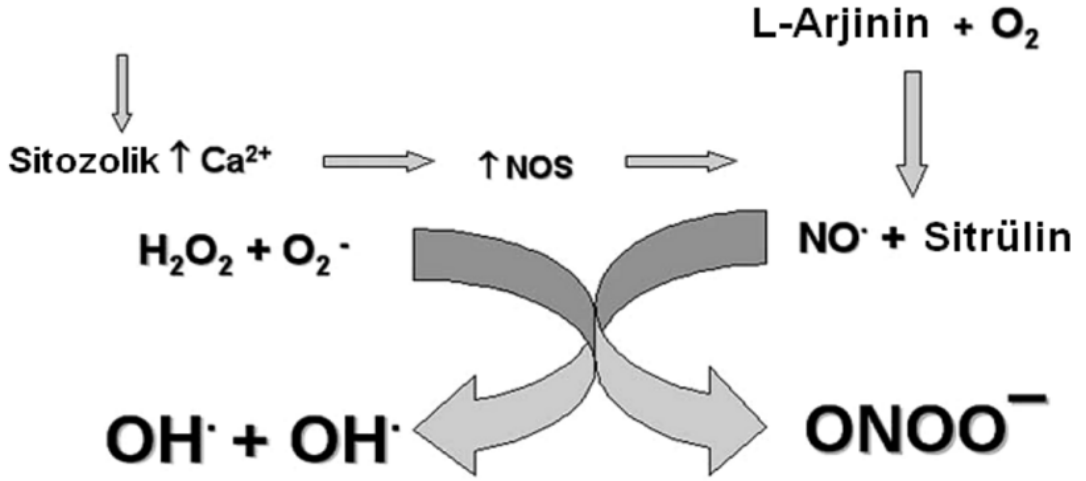
Santral sinir sisteminde NO glutamat ile yakın ilişki içindedir. İskemide glutamat salınımının artışı ile hücre içi kalsiyum düzeyleri artar. Hücre içi artan kalsiyum düzeyleri kalsiyum bağımlı pek çok enzimin (fosfolipaz A₂, kalpain, proteazlar) aktivasyonuna neden olur. Bu enzimlerin aktivasyonu sonucunda membran lipidlerinin peroksidasyonu, proteinlerin lizisi meydana gelir (70,71).

Hücre içi kalsiyum artışı NOS enzimini de uyaran en önemli mekanizmalardandır. NOS yapısal (cNOS) ve uyarılabilir (iNOS) olmak üzere iki ana grupta incelenebilir. Yapısal NOS olan nöronal NOS (nNOS) ve endotelial NOS (eNOS) kalsiyum bağımlı enzimlerdir. İntrasellüler kalsiyum artışı ile nNOS aktive olur ve serbest radikallerin salınımı artar (43,49,70,71).

Endotelial NO salındığı bölgede, düz kas hücrelerine diffüze olup cGMP oluşumunu artırır, düz kaslarda meydana gelen gevşeme kan akış hızını arttırarak iskemi sonrası koruyucu mekanizmalardan birine neden olmaktadır. iskemi sonrası eNOS aktivitesini artıran sebepler hala tam olarak anlaşılammıştır. İskemi ile açığa çıkan ve endotelden NO salınımını direkt olarak uyaran çeşitli moleküllerin bu mekanizmada etkili olduğu düşünülmektedir. Endotel hücreleri üzerinde reseptörleri bulunan asetilkolin, bradikinin, endotelin, serotonin gibi fizyolojik moleküllerin NO salınımına yol açtığı düşünülmektedir. Endotelial NO vasküler tonusu düzenlemesinin yanında, trombosit agregasyonunu ve lökosit adezyonunu azaltarak mikrovasküler sirkülasyonu düzenler (72).

iNOS kalsiyum bağımlı değildir, başta makrofajlar olmak üzere lökosit, damar düz kasları, damar endoteli ve astrositler tarafından üretilebilir. Patolojik süreçlerde ortaya çıkan iNOS iskemi sonrası 24-72 saatte inflamatuvar hücreler ile mikroglia da NO üretimini arttırmaktadır. Artan NO'nin süperoksit radikaliyle tepkimesi sonucu peroksinitrit sentezlenmektedir. Bu süreç sitotoksik inflamatuvar yanıtı oluşturur. iNOS

intraselüler kalsiyum değişikliklerinden bağımsızdır ve geç ama uzun süreli NO artışının kaynağıdır. nNOS ve eNOS iskemi başlangıcındaki artıştan hemen sonra azalmaktadır. Oluşan peroksinitritin (ONOO⁻), NO'e bağlı hücre ölümünde ana mekanizmalardan biri olabileceği düşünölmektedir (48,49,51,52,56,70,71,72).



Şekil 2.6. NOS (35)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

1. Olympus AU400 biyokimya otoanalizörü
2. Spektrofotometre (μ Quant, Biotek Instruments Inc,USA)
3. Benmari (Nüve ST402,Türkiye)
4. Mikro 22 R Hettich santrifüj Cihazı (Almanya)
5. Nüve NF100DR soğutmalı santrifüj (Türkiye)
6. Hassas Terazı (Shimadzu AY220,Kyoto,Japonya)
7. Vortex (Velp Scientifica,İtalya)
8. EL*50 otomatik strip yıkayıcı (Biotek Instruments Inc.USA)
9. Otomatik pipet (100,1000 μ l ve 50-300 μ l 8'li otomatik pipet)
10. Otomatik Pipet Uçları
11. Dispensör
12. Manyetik Karıştırıcı (Velp Scientifica,İtalya)
13. Shaker (IKA- Schuttler MTS 2 Almanya)

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve çözeltiler

1. Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma)
2. Asetik Asit (Merck)
3. Sodyum dodesil Sülfat (Merck)
4. Vanadyum Klorür (VCL_3) (Merck)
5. Sulfanilamid (Merck)
6. Hidroklorik Asit (HCl) (Merck)
7. Sodyum Nitrat (Sigma)
8. Sodyum Asetat (Carlo Erba)
9. Dithio-2-nitrobenzoik asit (DTNB) (Sigma)
10. Tetrametoksipropan (TMP) (Sigma)
11. Tris (Hidroksimetil)-aminometan (Merck)
12. N-(1-Naptil) Etilendiamin Dihidroklorit (NEDD)(Sigma)
13. Etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA)(Merck)
14. Glutasyon (Redükte)(Merck)

15. Metanol (Merck)
16. Etanol (Grup Deltalar)
17. Toplam Antioksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Baran Medikal)
18. Toplam Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Baran Medikal)
19. Superoksit Dismutaz kiti (Cayman Chemical Company, U.S.A)

3.3. YÖNTEMLER

Bu çalışmaya Şubat-Eylül 2009 tarihleri arasında, daha önce iskemik atak öyküsü olmayan ilk defa bu şikayetlerle hastaneye başvuran yaş ortalaması 64 ± 14 olan 22 (12 erkek ve 10 kadın) iskemik strok hastası alındı. Kontrol grubu olarak yaş ortalaması 59 ± 9 olan sağlıklı 27 kişi (12 erkek ve 15 kadın) ve iskemik strok açısından risk faktörü olan hipertansiyon ve diabetes mellitus nedeniyle takip edilen yaş ortalaması 59 ± 12 olan 22 kişi (12 erkek ve 10 kadın) çalışmaya dahil edildi.

Daha önce strok öyküsü olmayan ve şikayetlerinin başlangıcından sonraki ilk 24 saat içinde hastaneye başvuran iskemik strok hastaları çalışmaya alındı. Hastaneye başvurduğu anda alınan venöz kan 0. saat olarak kabul edildi. Hastalar 4 gün boyunca takip edildi. Bu süreç içinde 24, 48, 72 ve 96. saatlerde de kan örnekleri alındı. Sağlıklı kontrol grubu daha önce strok öyküsü ve herhangi bir sistemik hastalığı olmayan kişilerden oluşturuldu. Hasta kontrol grubu da hipertansiyon ve diabetes mellitus strok açısından oldukça önemli risk faktörleri olduğundan, bu hastalıkların her ikisine de sahip endokrinoloji polikliniğinde takip edilen hastalardan seçildi. Alınan venöz kanlar 3000 RPM'de 10 dakika santrifüj edildi, serumları ayrıldı ve tüm örnekler çalışma yapılıncaya kadar $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

Çalışma grubu ve her iki kontrol grubunda; örnek alımı sırasında herhangi bir sistemik hastalığının olup olmadığı, yaşı, cinsiyeti ve ilaç kullanımını sorgulandı

Toplanan serumlardan; Malondialdehit (MDA), Nitrik oksit (NO), total sülfidril grupları (t-SH), superoxide dismutase (SOD) manuel olarak çalışıldı. Total Oksidan Status (TOS), Total Antioksidan Status (TAS) düzeyleri Olympus AU 400 biyokimya otoanalizörüne uyarlanarak çalışıldı. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ); TAS ve TOS sonuçları kullanılarak hesaplandı.

SERUM MDA DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Yagi'nin metodu modifiye edilerek çalışıldı (73).

Reaktifler:

1. % 8,1 w/ v, Lauryl Sülfat: 0,81 g Lauryl Sülfat 10 mL distile suda çözüldü.
2. % 20 v/v, pH 3,5 Asetik Asit : 18 mL Asetik asit, 2,3 g Sodyum Asetat pH ayarlanarak toplam hacim 100 mL olacak şekilde hazırlandı.
3. % 0,53 w/v, TBA: 530 mgTBA 100 mL distile su içinde çözüldü.

Standartlar: 10 µmol / mL standart için 82 µL TMP, 40 mL distile su ve 40 damla konsantre HCl karıştırıldı, distile su ile total hacim 50 mL'ye tamamlandı. Bu standart çözeltilerden;

50 nmol/mL, 25 nmol/mL, 12,5 nmol/mL, 6,25 nmol/mL, 3,125 nmol/mL, 1,562 nmol/mL olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı.

Yapılışı:

- Vidalı kapaklı tüplere 50 µL numuneleri ve standartları pipetledikten sonra 50 µL Lauryl Sülfat, 375 µL Asetik asit, 375 µL TBA ve 150 µL distile su eklendi. Reaktif körü için bir tüpe 50 µL Lauryl Sülfat, 375 µL Asetik asit, 375 µL TBA ve 200 µL distile su pipetlendi.
- Tüpler karıştırılıp ağızları sıkıca kapatılarak 95°C'ye getirilmiş benmaride 1 saat bekletildi. Bulanıklık olmaması için 3500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi.
- Üst fazlardan numune alınarak primer dalga boyu 532 nm, sekonder 700 nm olacak şekilde bikromatik ölçüm yapıldı. Standartlar kullanılarak çizilen grafikten numune MDA konsantrasyonları nmol / mL cinsinden hesaplandı.

SERUM NO DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Miranda ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (74).

Reaktifler:

1. 80 mL Etanol
2. VCl₃ : 400 mg VCl₃ , 45,85 mL distile su içine eklenip, 4,15 mL konsantre HCl ile 50 mL'ye tamamlandı.
3. % 0,1 NEDD: 10 mg NEDD 10 mL distile suda çözüldü.

4. % 2 Sulfanilamid % 5 HCl içinde hazırlandı: 200 mg Sulfanilamid, 8,864 mL distile suya eklendi. 1,136 mL konsantre HCl ile 10 mL'ye tamamlandı.

Standartlar: 17 mg Sodyum Nitrat 100 mL distile suda çözülerek 2 mM konsantrasyonunda hazırlanan çözeltilerden;

50 µmol/L, 25 µmol/L, 12,5 µmol/L, 6,25 µmol/L, 3,125 µmol/L olacak şekilde dilüsyonlar hazırlandı.

Yapılışı:

Deproteinizasyon:

- 100 µL serum 300 µL Etanol ile eppendorf tüp içinde vortekslendi.
- +4°C'de 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.

	Analiz	Analiz körü
Numune, Standart	100 µL	100 µL
VCl₃	100 µL	100 µL
Sulfanilamid	50 µL	–
NEDD	50 µL	–
Distile su		100 µL

- Deproteinizasyon sonucu oluşan süpernatandan ve standartlardan 100 µL analiz ve numune körü küvetine pipetlendi.

- Her iki küvete 100 µL VCl₃ eklendi. 50 µL Sulfanilamid ve 50 µL NEDD analiz küvetine eklendi. 100 µL distile su numune körü küvetine kondu.

- 30 dakika 37°C'de inkübasyon sonrası 540 nm'de mikropate okuyucuda absorban ölçümü yapıldı. Analiz absorbanlarından kör absorbanları çıkarıldı. Standartlar kullanılarak çizilen grafikten numune NO konsantrasyonları µmol/L cinsinden hesaplandı, sonuçlar dilüsyon faktörü (4) ile çarpıldı.

SERUM TOTAL SH DÜZEYLERİNİN ÖLÇÜLMESİ

Sedlak ve arkadaşlarının metodu modifiye edilerek çalışıldı (75).

Reaktifler:

1. 0,2 M, pH 8,2 Tris Tampon: 605,5 mg Tris, 186,1 mg EDTA 15 mL distile suda çözülüp pH ayarlandı ve volüm distile su ile 25 mL'ye tamamlandı.

2. DTNB, 0,01 M: 3,9635 mg / mL olacak şekilde metanol ile çözüldü. Bu çözeltilerden 1 mL hazırlandı.

3. Sodyum Dodesil Sülfat, % 0,5: 500 mg Sodyum Dodesil Sülfat toplam hacim 100 mL olacak şekilde distile suda çözüldü.

***Renk Reaktifi:** 1 birim DTNB+ 79 birim Sodyum Dodesil Sülfat karışımından oluşur. 0,625 mL DTNB + 49,375 mL Sodyum Dodesil Sülfat karıştırıldı.

Standartlar: Glutasyon ile standart solüsyon hazırlandı. 30,73 mg GSH 10 mL distile suda çözülerek 10 mMol / L konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden; 5 mMol/L, 2,5 mMol/L, 1,25 mMol/L, 0,625 mMol/L, 0,3125 mMol/L olacak şekilde standart seri oluşturuldu.

Yapılışı:

	Analiz	Analiz körü	Reaktif körü
Numune, Standart	15 µL	15 µL	–
Tris Tampon	45 µL	45 µL	60 µL
* Renk Reaktifi	240 µL	–	240 µL
Dodesil Sülfat	–	240 µL	–

-Tabloda görüldüğü üzere mikropate'de numune ve standartlardan 15 µL analiz ve analiz körü küvetine pipetlendi. Analiz ve analiz körüne 45 µL Tris tampon eklendi, reaktif körüne 60 µL Tris tampon pipetlendi.

-Analiz ve reaktif körü küvetine 240 µL Renk reaktifi eklendi. Analiz körüne ise 240 µL % 0,5 Dodesil sülfat eklendi.

-30 dakika oda ısısında shaker da inkübe edildi. 412 nm dalga boyunda ikinci dalga boyu 630 nm olmak üzere mikropate okuyucuda absorban ölçümü yapıldı. Standartlar kullanılarak çizilen grafikten numune t-SH konsantrasyonları mMol / L cinsinden hesaplandı.

TOTAL OKSİDAN STATUSUN ÖLÇÜLMESİ (TOS)

Erel'in metoduna göre çalışıldı (63).

Reaktifler: Total Oksidan Status kiti (Rel Assay Diagnostics, Baran Medikal) Olympus AU 400 biyokimya otoanalizörüne uyarlanarak çalışıldı. Örnek içinde bulunan oksidanlar ferröz iyon şelatör komplekslerini ferrik iyonlara çevirir. Oluşan ferrik

iyonlar kromojen solusyonu ile renkli bir kompleks oluşturur ve oluşan bu kompleks örneklerdeki oksidan miktarıyla doğru orantılı olarak 530 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart olarak 20 mikromol / L H₂O₂ solusyonu kullanıldı.

TOTAL ANTIOKSİDAN STATUS (TAS) ÖLÇÜLMESİ

Erel’in metoduna göre çalışıldı (66).

Reaktifler: Total antioksidan kapasite ticari kiti (Rel Assay Diagnostics, Baran Medikal) Olympus AU 400 biyokimya otoanalizörüne uyarlanarak çalışıldı. Örnek içindeki antioksidanlar mavi renkli ABTS radikallerini renksiz indirgenmiş ABTS formuna çevirir. Dalga boyu olarak 660 nm kullanılmıştır. Testin kalibrasyonu için stabil bir antioksidan solüsyonu olan vitamin E analogu Trolox kullanıldı.

OSI hesaplanması

Numunelerin total oksidatif stres değerleri yüzde cinsinden total antioksidan status değerlerine oranlandı ve OSİ değerleri elde edildi. Oksidatif stres indeksi hesaplanırken TAS konsantrasyonları $\mu\text{mol Trolox Equiv./L}$ ‘ye dönüştürülerek;
$$\text{OSI} = 100 * \text{TOS} (\mu\text{mol/ L H}_2\text{O}_2) / \text{TAS} (\mu\text{Mol/L Trolox})$$
 hesaplandı.

SUPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ÖLÇÜLMESİ

Superoksit dismutaz düzeyi CAYMAN ticari kiti ile (CAYMAN, Chemical Company, USA) çalışıldı. Ksantin oksidaz tarafından oluşturulan süperoksit radikallerinin tetrazolium tuzlarıyla ölçülmesi esasına dayanır. SOD’nin Cu/Zn, Mn ve Fe içeren her üç tipini de ölçülebilir.

İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

İstatistiksel değerlendirmede SPSS Windows 13.0 programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edildi. İskemik stroklu hasta, sağlıklı kontrol ve hasta kontrol grubu demografik bilgilerinde Chi-kare testi kullanıldı. Gruplar arası anlamlılığın değerlendirilmesi OneWay-Anova ve Post-Hoc Tukey HSD testi ile yapıldı. Strok hastalarının saatler arası karşılaştırılmasında tekrarlayan ölçümler OneWay-Anova testi kullanıldı. p değerinin < 0.05 olması anlamlı kabul edildi.

5-BULGULAR

Çalışma grubuna yaş ortalaması $64\pm 14,04$ olan 22 (12 erkek ve 10 kadın) iskemik strok hastası, yaş ortalaması $59\pm 8,75$ olan 27 (12 erkek ve 15 kadın) sağlıklı ve yaş ortalaması 59 ± 12 olan hipertansiyon ve diabetes mellitus nedeniyle takip edilen 22 (12 erkek ve 10 kadın) hasta olmak üzere toplam 71 kişi alındı. Her üç grup arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı fark yoktu ($p>0.05$). (Tablo 5.1)

Tablo 5.1. Çalışma grubunun yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları

	Cinsiyet		Yaş (SD)
	E	K	
Strok Hasta (n:22)	12 (%54,5)	10 (%45,5)	64,23 (14,04)
Sağlıklı kontrol (n:27)	12 (%44,4)	15 (%55,6)	59,30 (8,74)
Hasta kontrol (n:22)	12 (%54,5)	10 (%45,5)	59,05 (12,09)

$P>0,05$ (chi-square test)

İskemik strok hastalarıyla (0, 24, 48, 72, 96. saat), sağlıklı kontrol ve hasta kontrol vakalarının t-SH, MDA, NO, SOD, TAS, TOS ve OSİ değerleri Tablo 5.2’de verilmiştir.

Tablo 5.2. Hasta, Sağlıklı Kontrol ve Hasta Kontrol T-SH, MDA, NO,SOD,TAS,TOS,OSİ (ort±SD)

HASTA (n:22)	T-SH (mmol/L)	MDA (nmol/mL)	NO (µmol/L)	SOD (U/mL)	TAS (mmol/L Trolox)	TOS (µmol/L H ₂ O ₂)	OSİ(%)
0. saat	0,85±0,15 ^b	8,43±2,35 ^a	19,61±6,94 ^{ab}	11,67±5,21	1,46±0,27	3,28±2,50	0,22±0,15
24.saat	0,83±0,17	7,99±1,96 ^a	19,09±4,55 ^{ab}	12,74±5,45	1,43±0,27	4,12±2,30	0,29±0,17
48.saat	0,74±0,12	8,16±2,16 ^a	20,81±5,26 ^{ab}	12,09±8,93	1,41±0,26	3,00±1,80	0,22±0,13
72.saat	0,83±0,32	8,49±3,15 ^a	19,47±8,19 ^{ab}	10,81±2,43	1,46±0,26	2,38±1,75 ^b	0,16±0,11 ^b
96.saat	0,71±0,14 ^a	7,88±2,32 ^a	12,94±3,29 ^b	10,24±3,32	1,37±0,28	2,17±1,42 ^{ab}	0,16±0,09 ^{ab}
KONTROL 1 (n:27)	0,83±0,18 ^b	5,99±2,28	13,75±4,27 ^b	13,35±6,13	1,45±0,22	3,44±1,93	0,25±0,17
KONTROL 2 (n:22)	0,71±0,18	6,99±2,37	8,54±3,66	14,24±5,57	1,46±0,32	3,74±1,59	0,27±0,13

Kontrol 1: Sağlıklı kontrol

Kontrol 2:Hasta kontrol

a: sağlıklı kontrol grubundan anlamlı farklı p<0,05

b: hasta kontrol grubundan anlamlı farklı p<0,05

Hastaların 0, 24, 48,72 ve 96.saatlerindeki MDA düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (p<0,05).

Hasta 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki NO düzeyleri hasta kontrol grubundan ve 96. saat hariç sağlıklı kontrol grubundan yüksek bulundu (p<0,001). İki kontrol grubu karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunun NO düzeylerinin hasta kontrol grubundan anlamlı yüksek olduğu görüldü (p<0,05).

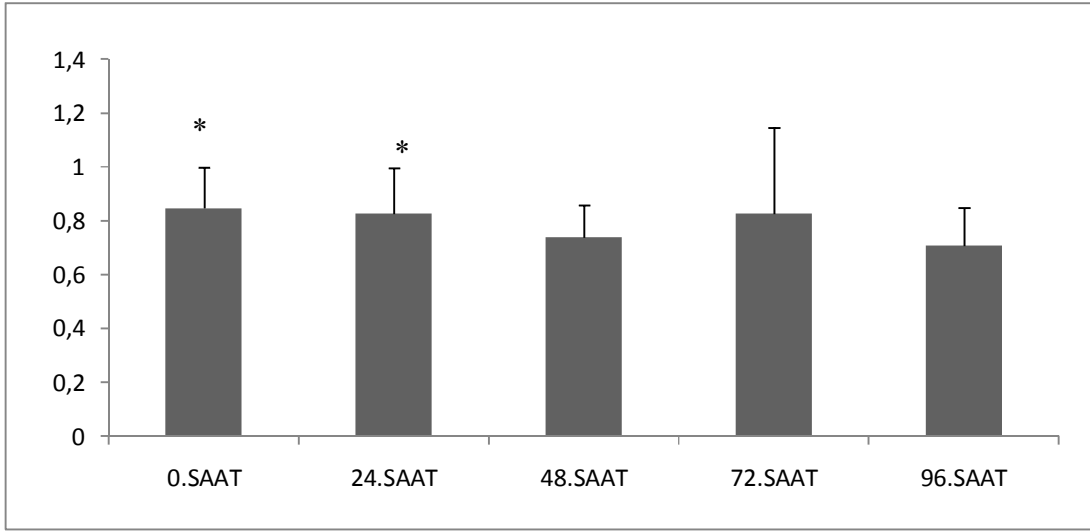
Hasta 0. saat t-SH değerleri hasta kontrol grubundan anlamlı yüksek, 96. saat değerleri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı düşük bulundu (p<0,05). Her iki kontrol grubu karşılaştırmasında ise sağlıklı kontrol grubunun t-SH değerleri anlamlı olarak yüksek bulundu (p<0,05).

Hasta SOD ve TAS değerleri ile her iki kontrol grubu değerleri arasında herhangi bir fark bulunmadı ($p>0,05$).

Hasta TOS ve OSİ 96. saat değerleri sağlıklı kontrol grubundan, 72 ve 96. saat değerleri hasta kontrol grubundan anlamlı düşük bulundu ($p<0,05$).

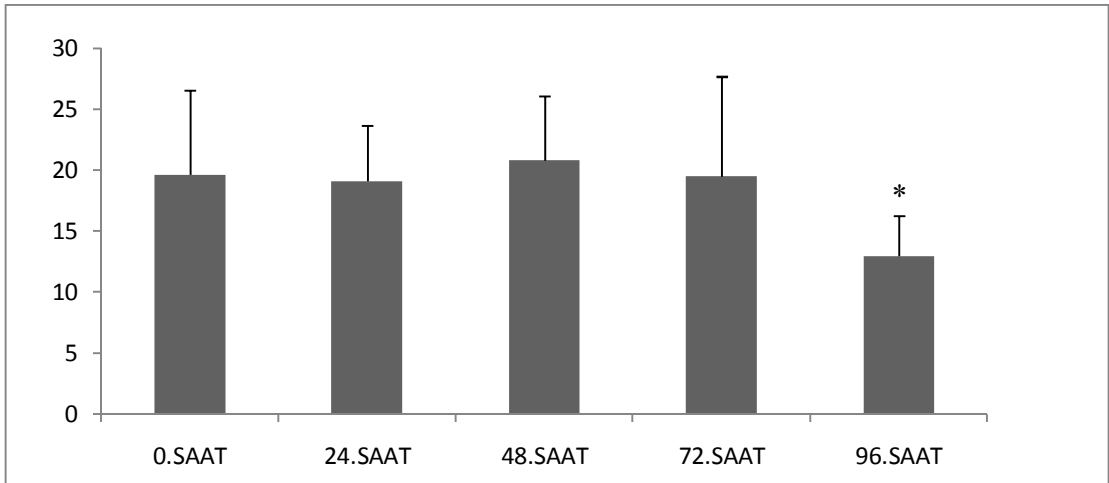
Hasta grubunda yapılan saatler arası karşılaştırmada t-SH, NO, TOS ve OSİ değerlerinde anlamlı fark bulundu.(şekil 5.1, şekil 5.2, şekil 5.3, şekil 5.4)

şekil 5.1. Hasta grubu T-SH değerlerinin günlerarası değişimi



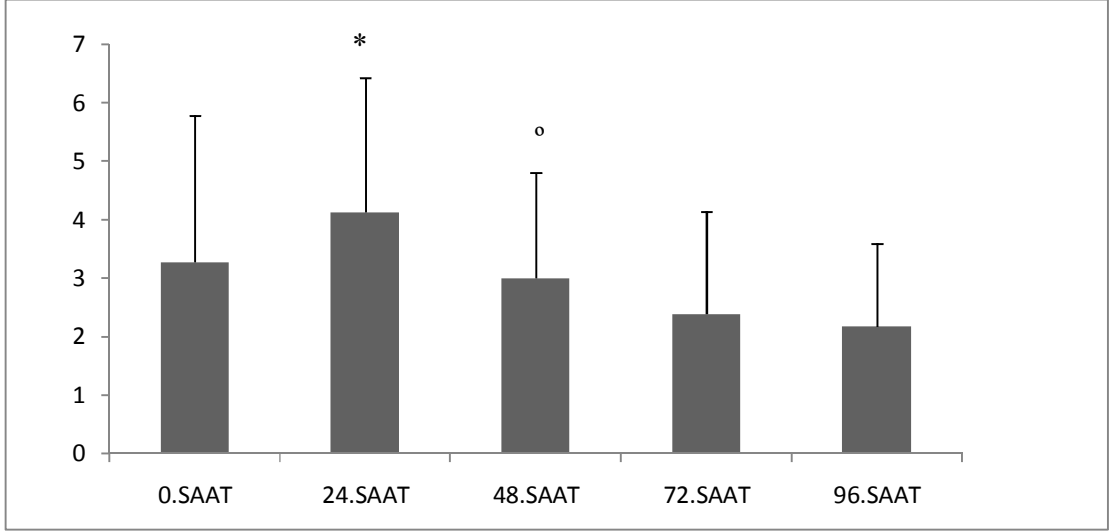
* 48, 96. saat düzeylerinden anlamlı yüksek ($p<0,05$).

şekil 5.2. Hasta grubu NO değerlerinin günlerarası değişimi



* 0, 24, 48 ve 72. saatlerden anlamlı düşük ($p<0,05$).

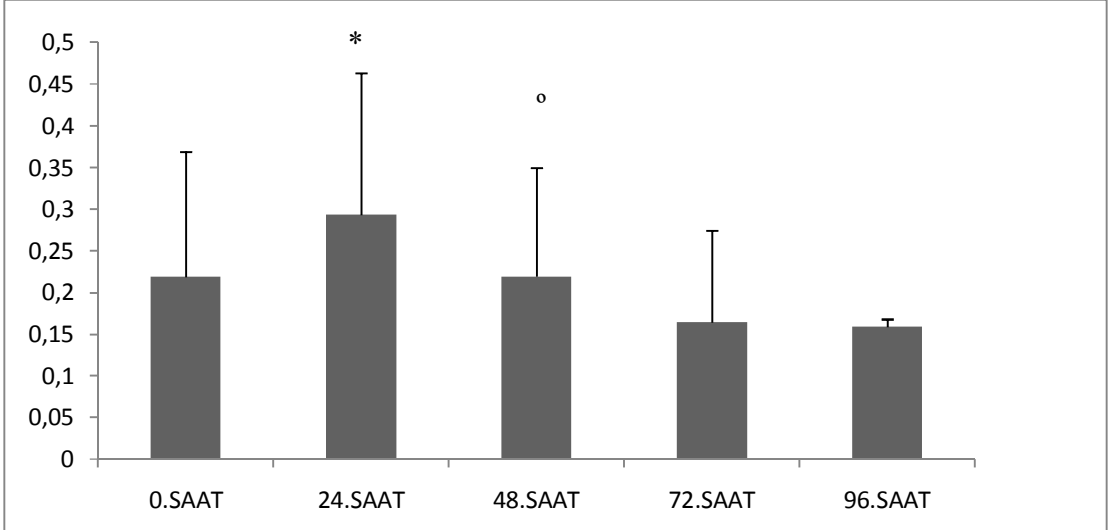
Şekil 5.3. Hasta grubu Total Oksidatif Stres değerlerinin günlerarası değişimi



* 48, 72 ve 96. saat düzeylerinden anlamlı yüksek ($p<0,05$).

° 72. saat düzeylerinden anlamlı yüksek ($p<0,05$).

Şekil 5.4. Hasta grubu Oksidatif stres indeksi değerlerinin günlerarası değişimi



* 48, 72 ve 96. saat düzeylerinden anlamlı yüksek ($p<0,05$).

° 72. saat düzeylerinden anlamlı yüksek ($p<0,05$).

5.TARTIŞMA

Gelişen dünyada iskemik strok en sık ölüm nedenlerinden biridir ve ilerleyen yaşa bağlı olarak önemi giderek artmaktadır. Yapılan pek çok çalışmaya rağmen iskemik hasarın oluşmasındaki nedenler ve fizyopatolojisi hala tam olarak anlaşılammıştır. İskemik strok gelişmesinde oksidatif/nitrosatif stres en önemli mekanizmalardan biri olarak kabul görmüştür (35).

İskemik strok fizyopatolojisinde oksidatif stresin etkisini incelemek ve iskemik strok hastalarında oksidatif stresin oluşturduğu hasarın, günler içerisindeki değişimini araştırdık. Bu amaçla; iskemik strok hastalarında, iskemik strok olduğu andan itibaren 0. 24. 48. 72. ve 96. saatlerde total oksidan stres ve total antioksidan status düzeylerini değerlendirdik. Ayrıca 0. 24. 48. 72. ve 96. saatlerdeki değerleri her iki kontrol grubu ile karşılaştırdık. Çalışmamızda strok hastalarında; 0. 24. 48. 72. 96. saat MDA düzeyleri sağlıklı kontrol grubundan, 0. 24. 48. 72. saat NO düzeyleri sağlıklı kontrol ve 0. 24. 48. 72. ve 96. saat NO düzeyleri hasta kontrol grubundan yüksek bulundu (Tablo 5.1). Bu hastaların saatlik takiplerinde sadece 96. saatte NO'da düşüklük gözlemlendi (Şekil 5.2). Total oksidan status düzeylerini kontrol grupları ile karşılaştırdığımızda; 72. ve 96. saatlerde anlamlı bir düşüklük gözlemlendi (Şekil 5.3). Total antioksidan status, SOD ve t-SH da ise anlamlı bir değişiklik bulunamadı.

Akut serebral iskemide beyin dokusu yeterli oksijenlenemez. Bu durum pek çok metabolik değişikliklere ve hücre ölümüne neden olur (76). Beyin dokusu yüksek oranda oksijen ihtiyacı duyan organlardan bir tanesidir. Nöronal membranların doymamış yağ asitleri açısından oldukça zengin olması, dopamin oksidasyonu ve glutamat eksitoksisitesi gibi kimyasal reaksiyon içeriği ve düşük yenilenme kapasitesi nedeniyle oksidatif strese karşı oldukça duyarlıdır (54,56). Bunun yanında beyin antioksidan enzim içeriği açısından da oldukça fakirdir (76).

Bilindiği gibi iskemik strokta hücre içine Ca^{+2} girişiyle tetiklenen lipid peroksidasyonu artışından pek çok mekanizma sorumlu tutulmaktadır. İskemi sırasında oluşan serbest radikaller, yüksek reaktiviteleri nedeniyle hücre membranlarındaki lipidlere saldırarak lipid peroksidasyonunu başlatırlar (76,78). Lipit peroksidasyonu beyinde serbest radikal kaynaklı hasarda oluşan en önemli sonuçlardan bir tanesidir.

Lipit peroksidasyonu pek çok ikincil ürünle membranlarda yapısal ve fonksiyonel hasara yol açmaktadır (5). En iyi bilinen lipit peroksidasyon ürünlerinden bir tanesi MDA'dır (5,79).

Demirkaya ve ark, araştırmalarında stroktan sonraki ilk 24 saat ve 7. günde eritrosit MDA düzeylerini incelemişler ve bunu infarkt alanıyla karşılaştırmışlardır. 1 ve 7. gün MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlar, MDA düzeyleri düşük olan hastalarda prognozun daha iyi seyrettiğini gözlemlemişlerdir (80).

Polidori ve arkadaşları iskemik strok hastalarında 6, 24. saatler ve 3, 5, 7. günlerdeki MDA düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlardır. Zamana bağlı anlamlı bir değişiklik gözlemlememişlerdir. İskemik strok hastalarında yaptığımız 0. 24. 48. 72. 96. saat MDA ölçümlerinde süreye bağlı herhangi bir değişiklik olmadığını gözlemledik (81).

Sharpe ve ark 6 saat içinde hastaneye başvuran hastaların başvurduğu an (0,saat) ve 48. saat MDA ölçümlerinde 0. saatte kontrol grubuna göre fark bulamamışken, 48. saatte anlamlı bir yükseklik gözlemlemişlerdir (82).

Yıldırım ve ark ile Özkul ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmalarda; 48 saat içinde hastaneye başvuran hastalarda MDA'yı kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (76,77).

Gariballa ve ark, 24 saat içinde başvuran stroklu hastalar ve hastanede yatan strok olmayan (serebrovasküler, iskemik kalp hastalığı ve periferik kalp hastalığı olmayan) hastaları 24, 48-72. saat ve 7. günde sağlıklı kontrol grubuyla yaptıkları karşılaştırmada tiyobarbitürük asit (TBARS) düzeylerini her iki grupta da yüksek bulmuşlardır (83).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda olduğu gibi biz de iskemik strok hastalarında 0, 24, 48, 72 ve 96. saat MDA düzeylerinde anlamlı yükseklik gözlemledik. Hastaneye 24 saat içinde başvuran hastalarda başvurduğu an (0.saat) ve takip eden 4 gün boyunca yapılan ölçümlerde MDA düzeyleri sağlıklı kontrol grubundan anlamlı yüksek bulundu. Bu değerler istatistiki açıdan anlamlı olmamakla birlikte yüksekti (Tablo 5.1).

MDA oksidatif stresin etkisini gösteren en önemli kanıtlardan bir tanesidir. Çalışmamız da diğer çalışmalarda olduğu gibi göstermiştir ki iskemik strokta 24. saatten itibaren MDA oksidatif stresin etkisini gösteren en önemli kanıtlardan bir tanesidir.

Lipit peroksit ürünleri, nöronlar ve gri madde için oldukça zararlıdır ve iskemik hasarı tetiklerler. Serbest radikal üretiminde önemli olan Fe'in beyinde önemli düzeylerde bulunması stroktaki MDA yüksekliğinin nedenlerinden bir tanesidir (77).

İskemide saatler ve günler içinde inflamasyona bağlı lökosit aktivasyonu meydana gelmektedir. Aktive olan lökositler fosfolipaz A₂ aktivasyonu ve araziidonik asit metabolitleri, çeşitli lizozomal enzim ve serbest radikal üretimine yol açarlar. Tüm bunlar kapillerlerin mekanik obstrüksiyonuna ve mikrovasküler sirkülasyonun bozulmasına yol açmaktadır (53,84).

Lipit peroksitlerinin apoptoziste anahtar bir role sahip olduğu, eksitoksisite ve inflamasyon ile ilişkisi düşünüldüğünde (69,77) oldukça kısa yarı ömre sahip MDA'nın bizim çalışmamızdaki 4. gün ve diğer çalışmalarda 7. gün sonundaki yüksekliği lipit peroksidasyonunun niye devam ettiği konusunda bize ışık tutabilir.

Sinan ve ark, iskemik stroklu hastalarda 6 ay sonra MDA değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlardır. Ancak bunun santral sinir sistemi lezyonlarından bağımsız olduğunu, strok ve ateroskleroz risk faktörlerine bağlamışlardır (85).

Tüm bulgular eşliğinde stroklu hastalarda oksidatif stresin eksitotoksisite, inflamasyon ve apoptozisle olan ilişkisi ilaç gelişiminde en önemli hedeflerden biri olabileceğini düşündürür (69) ve strok sonrası kronik dönemdeki MDA düzeyleri değerlendirilebilir.

Oksidatif stres iskemide nöronal hasarı indükleyen mekanizmalardan bir tanesidir. Akut serebral iskemide serbest radikal oluşumunun artışı; N-metil-D-aspartat reseptörlerinin stimülasyonu, mitokondrial disfonksiyon, nöronal nitrik oksit sentazın (nNOS) aktivasyonu, siklooksijenaz 2 indüksiyonu, katekolaminlerin oto-oksidasyonu, araziidonik asit gibi serbest yağ asid metabolizması ve nötrofil ve lökosit migrasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır.

Serebral iskemide, glutamat salınımını artmaktadır (presinaptik nöronların depolarizasyonu nedeniyle). Glutamat salınımıyla NMDA reseptör uyarılmasıyla hücre içine Ca^{+2} girişi artarak NOS stimüle olur ve NO üretimi artar. Sağlıklı dokularda iNOS tespit edilemez, pek çok patolojik durumda makrofaj ve mikroglialardan iNOS salınabilir ve gecikmiş nöronal hücre ölümünden sorumlu tutulabilir. iNOS iskemiden sonra 12 saat içinde salınıp yaklaşık 48 saat içinde maksimuma ulaşır(88).

NO' nun iskemik beyin üzerindeki etkisinin iskeminin değişik basamakları ve sentez yoluna bağlı olduğu düşünülmektedir (88). Aşırı nöronal NO yapımı iskemik hasarın gelişmesinde önemli bir rol oynamakta halbuki endotelial ve perivasküler NO bölgesel kan akımını arttırmak ve trombosit agregasyonunu önlemek suretiyle iskemiye karşı koruyucu olabilmektedir (89).

NO'nun serebral iskemideki rolü hala tam olarak anlaşılamamıştır. İskemiden çok kısa bir süre sonra nNOS ve eNOS aktivitelerinin artması sonucu beyin NO konsantrasyonu yükselir. Yüksek düzeylere çıkan NO koruyucu özelliğini yitirerek, hücrede hasara yol açmaya başlar. Yaklaşık 12 saat sonra iNOS ortaya çıkmaya başlar ve 48 saat sonra maksimum düzeylere ulaşır (62,88,89). iNOS etkisiyle de NO oluşumu indüklenmektedir. NO'nun süperoksit radikaliyle peroksinitrit oluşturmak üzere etkileşmesi iskemik strok patolojisinde oldukça güçlü ve önemli bir olaydır. Oluşan bu peroksinitrit oksidatif stresin markırı olarak kullanılabilir ve lipidler, DNA ve protein gibi yapılarla da etkileşmektedir. Protein nitrasyonundaki artış nörodejeneratif bozukluk gelişimini artırmaktadır (90).

Nanetti L ve Taffi R, plazma ONOO⁻ (peroksinitrit) düzeylerini iskemik strok hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlar ve bunu NO'nun O₂ ile reaksiyonuna bağlamışlardır. NO düzeylerini ise anlamlı derecede düşük bulmuşlardır (90,91).

Özkul ve ark strok sonrası ilk 48 saatte başvuran hastaların NO düzeylerini kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulmuşlardır (76).

Gümüştaş ve arkadaşları ratlarda plazma NO metabolitlerini kontrol grubuna göre yüksek bulmuşlardır (92). Climacao ve ark 24 saat içinde başvuran trombotik strok hastalarındaki NO düzeylerinin kontrole göre düşük olmasını beyinde koruyucu bir

mekanizma olarak açıklayıp, iNOS' un iskemik beyin hasarında kurtarıcı olduğunu düşünmüşlerdir (93).

Güldiken ve ark yaptığı çalışmada diabetik akut stroklu, nondiabetik akut stroklu hastalarda, sağlıklı kontrol grubuna göre NO düzeylerini anlamlı yüksek bulmuşlardır (94).

NO' daki bu karmaşık mekanizmalar ve bulgularla beraber bizim çalışmamızda iskemik strok hastalarında NO 0, 24, 48 ve 72. saat değerleri her iki kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu. 96.saat değerleri sadece hasta kontrol grubundan anlamlı yüksek bulunurken, sağlıklı kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi (Tablo 5.1).

NO, makrofajlar, endotel hücreler, bazı nöronlar, damar düz kas ve kupffer hücreleri tarafından sentezlenebilir. Bilindiği gibi hücre enerji metabolizmasındaki disfonksiyon NO bağımlı nörotoksitede önemli bir faktördür ve hücre içi thiol içeriği oksidatif ve nitrozatif strese karşı hücrenin sensitivitesini açıklamada oldukça önemlidir. Oksidan ve antioksidan dengenin bozulması olarak tanımlanan oksidatif strese, oksidanlar pek çok hastalıkla ilişkili olarak hasara yol açmaktadır (90). Tüm bu bulgular serbest radikal oluşumu ve oksidatif stres iskemik beyin hasarı oluşumunda anahtar bir role sahiptir.

İskemik strok hastalarında, NO saatler arası karşılaştırmada 96.saat değerleri 0,24,48 ve 72. saatten anlamlı düşük bulunmuştur (Şekil 5.2). Kezhou ve ark, Samdani ve ark farelerle yaptıkları çalışmalarda NO'nun nNOS ile akut dönemde salındığını ancak daha uzun süreli hücre ölümünde iNOS ile tetiklendiğini, iNOS'un iskemiden 12 saat sonra yükselmeye başlayıp 48. saatte maksimuma ulaştığını ve 7. günde de normal düzeylere döndüğünü göstermişlerdir (86,88). Bizim çalışmamızda ilk 72 saat sonrasında sağlıklı kontrol seviyelerine inen NO' nun oksidatif stresin oluşturduğu hasarın kendi kendini sınırlandırmaya başlamasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

NO özellikle endotel hücrelerinde merkezi sinyal iletim yollarından biridir. NO'in fibrinolizis hemostazisi, vasküler tonüsü, vasküler düz kas proliferasyonunu ve kan basıncını düzenlediği çok iyi bilinmektedir. Vasküler hastalık gelişiminde NO

biyoyararlanımının azalmasının etkileri çok iyi bilinmektedir, ancak bunun endotelial disfonksiyonun sonucu mu, endotelial disfonksiyonun nedeni mi, yoksa her ikisi birden mi olduğu tam olarak anlaşılamamıştır. NO iletim yollarındaki bozuklukların endotelial disfonksiyona yol açarak hipertansiyon, diabetes mellitus ve serebrovasküler hastalıklara neden olduğu kanıtlanmıştır (71). Çalışmamızda, hasta kontrol NO düzeylerinin hem strok hasta grubundan hemde sağlıklı kontrol grubundan düşük olduğu görülmüştür (Tablo 5.1).

DM'ta ileri glikozilasyon ürünlerinin NO üretimini baskıladığı gösterilmiştir. Böylece NO'nin hem vazodilatör hem proliferatif etkileri önlenmiş olur (95,96). Ayrıca diabetik hastalarda artan süperoksit radikallerinin, NO'nin büyük kısmını bloke ettiği düşünülmektedir. Kronik hipertansiyonlu hastaların çoğunda NO düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (97,98). Hipertansiyonlu hastalara L-arginin ve NO donörleri verilmesinin, kan basıncını düşürdüğü gösterilmiştir (48). Bizim çalışmamızda da bu verileri destekler nitelikte kronik diabet ve hipertansiyonlu hastalarda NO düzeyleri düşük bulunmuştur.

Oksidatif stres, iskemik beyin hasarı birincil ve ikincil fizyopatolojik mekanizmalarında anahtar bir role sahiptir. Oksidatif stres reaktif oksijen ürünleri ve antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlik, antioksidan enzimlerin sentezinin veya aktivitesinin azalmasına bağlıdır (53,91). İnflamasyonda aktive fagositlerden salınan oksijen, nitrojen, karbon kaynaklı reaktif ürünlerin salınımı da oksidatif stresi tetikleyen mekanizmalardan bir tanesidir (45).

Daha önceki bir çok çalışmada oksidatif stresi gösteren çeşitli parametreler iskemik stroklu hastalarda yüksek bulunmuştur (76,77,80,81,91,94,99). Oksidan moleküllerinin tek tek ölçülmesi pratik olmadığı gibi oksidan moleküllerin toplam bir etki oluşturduğu da iyi bilinmektedir. Son yıllarda oksidatif stres parametrelerinin tek tek ölçülmesi yerine TOS metodu kullanılarak topluca ölçülmesi yoluna gidilmektedir. Çalışmamızda MDA gibi oksidan parametrenin yanında TOS ve oksidan/antioksidan dengesi gösteren OSİ değerlerine de baktık. 72. saatteki TOS ve OSİ değerlerini hasta kontrolden, 96. saat TOS ve OSİ değerlerini her iki kontrol grubundan anlamlı düşük bulduk (Tablo 5.1).

72 ve 96. saatten itibaren TOS ve OSİ deki düşme akut iskemik strokta 72. saatten sonra oksidatif stresin kendini sınırlandırmaya başladığı konusunda bilgi veriyor olabilir. Kontrol gruplarının altında değerlere sahip olması iskemik strok fizyopatolojisi düşünüldüğünde tam olarak açıklanamamakta strokta oksidatif stresin kanıtlanmış etkileri düşünüldüğünde bir tezat oluşturmaktadır.

Çalışmamızda TOS ve OSİ 'nin hastanın başvurduğu andan itibaren 24. saat değerleri 48, 72, 96. saatlere göre, 48. saat düzeyleri de 72. saatten anlamlı yüksek bulundu (Şekil 5.3, Şekil 5.4). TOS ve OSİ sonuçları genel olarak yorumlanamamakla beraber daha ayrıntılı çalışmalar önerilmektedir.

Rabus ve arkadaşlarının (100) rheumatic ve dejeneratif kalp kapak hastalıklarında doku ve plazmada Erel'in metoduna göre TAS, TOS ve OSİ ölçümlerinde, doku ve plazma TOS ve OSİ değerlerinde iki grup arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Plazma TAS düzeylerinde anlamlı fark bulamamışken doku TAS düzeylerinde anlamlı fark olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamızda sadece serum TAS, TOS ve OSİ düzeylerine bakıldığı düşünüldüğünde dokudaki hasarın perifer ne derece yansıdığı, dokular arası farklılıklar olup olmadığı, özellikle karmaşık sellüler bir sistem olan kan-beyin bariyerine sahip beyin dokusundaki hasarın perifer yansımada farklı etkilerin olup olmadığı konusunda daha çok bilgi ve çalışmaya ihtiyaç duyulduğu aşikardır.

Fizyolojik koşullarda organizma serbest oksijen radikallerini metabolize eden antioksidan savunma sistemiyle korunmaktadır. İskemik dokularda meydana gelen oksiradikallerin antioksidan savunma sistemi tarafından tamamen yok edilemediği ve iskemi sonrası doku hasarında en önemli sorumlulardan birinin serbest radikal reaksiyonlarının olduğu iyi bilinmektedir (101). Antioksidan parametreler tek tek ölçülebildiği gibi, total antioksidan status düzeylerini belirleyebilecek kit geliştirilmiştir. Bu da bize enzimatik ve non- enzimatik antioksidanlar hakkında bilgi vermektedir.

SOD oksidatif strese anahtar role sahip endojen olarak üretilen antioksidan bir enzimdir. Oksidatif strese karşı oldukça duyarlı olan beyin dokusu düşük katalaz ve orta düzeyde SOD aktivitesine sahiptir (102). Üç tane izozimi bulunan SOD'nin intrasellüler

fraksiyonu ekstrasellüler fraksiyonuna göre oldukça önemlidir ve pek çok hastalıkta artmış olduğu gösterilmiştir (58).

İskemik strok hastalarında; SOD düzeyleri ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda birbiri ile çelişkili veriler bulunmaktadır (77,103,104). Sheikh ve ark tam kan SOD düzeylerini kontrol grubundan anlamlı yüksek bulmuşlardır. Bu artışın iskemi sonrası artan serbest radikal üretimine karşı kompanseuar bir cevap olduğunu düşünmüşlerdir (103). Srkrishna ve Suresh (104), SOD, E vit, C vit düzeylerini, Yıldırım ve ark, serum SOD düzeylerini kontrol grubundan anlamlı düşük, BOS SOD düzeylerini ise anlamlı yüksek bulmuşlardır (77).

Demirkaya ve ark ilk 24 saatte SOD düzeylerinin infarkt alanı büyük olan hastalarda daha belirgin olmak üzere kontrol grubundan anlamlı düşük olduğunu bildirmişlerdir (80).

Spranger ve ark, 24 saat içinde hastaneye gelen strok hastalarında geldiği an, 72. saat, 5 ve 10. günlerde yaptıkları ölçümlerde, 24. saat (geldiği an) SOD düzeylerini diğer günler ve kontrol grubundan anlamlı düşük, 5 ve 10. günlerde kontrol seviyelerinde gözlemlemişlerdir. Spranger ve ark ilk 24 saatteki düşüşü tespit edebilmelerini metodlarından kaynaklanan ölçüm hassasiyetine bağlamışlardır. Ayrıca endotelial hücrelerden salınan ekstrasellüler SOD düzeylerinin serumdaki SOD aktivitesiyle ilgili olabileceğini düşünmektedirler (105).

Gruener ve ark 24 saat içinde hastaneye başvuran 87 akut strok hastasında 24. saat, 2. gün, 3-7, 8-14 ve 15-21. günlerde BOS ve plazma Cu,Zn-SOD düzeylerini kontrol grubuyla karşılaştırmışlardır. Plazma SOD düzeylerinin 24. saatte kontrol grubuna yakın, 8-14. günler arasında anlamlı yükselmiş, 15-21. günlerde tekrar kontrol seviyelerinde olduğunu gözlemlemişlerdir (106).

El kossi ve ark (102) ile Adachi ve ark (58) atak sonrası 48 saat içinde başvuran hastalarda SOD düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı fark bulamamışlardır. Biz de hasta ve her iki kontrol grubu arasında ve saatler arası takipte anlamlı bir fark bulamadık.

Hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda serebral iskemide SOD'nin iskemi/reperfüzyon hasarındaki rolü gösterilmiştir. Yapılan çalışmalardan elde edilen

veriler serebral iskemideki SOD aktivitesi ve salınımlarında in vivo olarak birbiri ile çelişen sonuçlar bildirilmiştir (107,108,109,110,111). Elde edilen bu çelişkili veriler SOD'nin farklı izoformlara sahip olması, ölçüm metodlarının ve hayvan modellerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. Hayvan modellerinde serebral iskemide SOD'nin aktivitesi ve salınımı ile ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiğini göstermektedir.

Cu,Zn-SOD dolaşımında çok kısa yarı ömre sahiptir. Endojen kaynaklı bir enzim olması ve kan-beyin bariyerini çok zor geçmesi serebral iskemide enzim terapisinde kullanılmasını zorlaştırmaktadır (112). Ancak farklı dokulardaki hayvan modellerinde iske mi sonrası, reperfüzyon öncesi SOD verilmesinin post-iskemik hasarda oldukça koruyucu olduğu gösterilmiştir. Beyin içinde aynı koruyucu etkilerin olup olamayacağını değerlendirmek için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Protein SH grupları oksidasyon zincirini kırma özelliğine sahip önemli antioksidanlardır. Glutasyon sülfidril grubu içeren, protein dışındaki sülfidril grubu içeriğinin %90'ını oluşturan bir tripeptiddir. Redükte ve okside olarak iki şekilde bulunur. Protein SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak, oksidasyona karşı korur, yabancı bileşikleri detoksifiye eder ve pek çok reaksiyonda koenzim olarak görev alır. GSH beyinde reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin toksik etkilerine karşı major savunma sistemlerinden bir tanesidir (62,76).

Bizim çalışmamızda hastanın 0.saat t-SH düzeyleri hasta kontrol grubundan anlamlı yüksek, 96. saat hasta düzeyleri sağlıklı kontrolden anlamlı düşük ve sağlıklı kontrol t-SH düzeyleri hasta kontrolden anlamlı yüksek bulundu (Tablo 5.1). Hasta kontrol grubunun kronik hipertansiyon ve diabet hastası olduğu düşünüldüğünde her iki hastalıkta da oksidatif hasar vardır. Protein SH grupları oksidatif hasara karşı oldukça hassas olup lipid peroksid radikallerinin ve malondialdehid gibi yıkım ürünlerinin bu hastalıklarda birikimi sonucu proteinlerin okside edilerek t-SH düzeylerinin düşük olabileceği düşünülmektedir (113).

t-SH saatler arası değişime baktığımızda 0 ve 24. saatler 48 ve 96. saatlerden anlamlı yüksek bulunmuştur. Ancak 96 ve 48. saatlerdeki bu düşüş tam olarak açıklanamamaktadır (Şekil 5.1).

Gariballa ve ark, 24, 48-72. saat TAS ve plazma glutatyon düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir (83).

Correa ve ark, akut strok, kronik strok(en az 6 ay önce) , hipertansiyon hastaları ve kontrol grubu arasında yaptıkları karşılaştırmada akut dönem GSH düzeylerini, kontrol, hipertansif ve kronik stroklu gruptan yüksek bulmuşlardır. Bu sonuçları iskemik olaylar sonrası organizmanın antioksidan mekanizmada koruyucu olarak GSH düzeylerini artırması olarak açıklamışlardır (99). Zimmerman ve ark strok öyküsü olan hastalarda ilk saatlerde GSH düzeylerini kontrol grubundan yüksek bulmuşlar ve bunun oksidatif strese amino asid eksitotoksitesine karşı koruyucu bir atak olabileceği şeklinde yorumlamışlardır (114). Ancak her iki çalışmada hasta grubu sayısının 10 ve 11 olduğu unutulmamalıdır. Özkul ve ark, 48 saat içinde hastaneye başvuran strok hastalarında GSH düzeyleri kontrol grubundan anlamlı yüksek bulmuşlardır (76).

Çalışmamızda TAS düzeylerinde gruplar arası ve saatler arası herhangi bir değişim bulamadık. Daha önce yapılan çalışmalarda TAS düzeylerinin kontrol gruplarından anlamlı düşük (77), anlamlı yüksek (94) veya benzer olduğu (103) yönünde farklı sonuçlar bulunmuştur. Ullegaddi ve ark, iskemik strok hastalarına E vit, ve C vit vermişler, hastanın geldiği an, 7. gün ve 14. gün yaptıkları ölçümlerde bu destek tedavinin antioksidan kapasiteyi düzelttiği ve oksidatif hasarı azalttığını gözlemlenmiştir (61).

Leinonen ve ark plazma antioksidan aktivitesi ve infarkt alanı arasında negatif korelasyon gözlemlenmiştir (115). İmai ve ark, fareler üzerinde yaptıkları çalışmada antioksidan Ebselen iv kullanımı sonucu iskemik hasarın azaldığını gözlemlenmiştir (116).

Daha önceki çalışmalarda TAS düzeylerindeki bu farklı sonuçlara ilaveten bizim çalışmamızda ise herhangi bir fark bulunmamıştır. TAS düzeylerindeki bu farklı sonuçların neden kaynaklandığı daha ayrıntılı olarak araştırılıp antioksidanların tedavi protokolü içinde olup olmayacağı yönünde daha çok çalışmaya gerek duyulduğunu göstermektedir.

Tüm bu veriler bize serebral iskemi sırasında serbest radikal yapımının arttığını ancak sonuçlar arasındaki farklılıkların neden kaynaklandığı konusunda daha ayrıntılı çalışmalar yapılması gerektiğini göstermektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

İskemik strok, beyin damarlarında kan akımının bozulması sonucu gelişen hücre ölümü ve doku enfarktı ile bu damarın beslediği bölgenin fonksiyonuna bağlı gelişen nörolojik sendromlarla kendini gösterir. Gelişmekte olan dünyada yaşlı popülasyonun artışı ve risk faktörleri açısından değerlendirildiğinde önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Ölümle sonuçlanan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadırlar.

Beyin, ihtiyacı olan oksijen ve glukozu sistemik dolaşımdan alır. Sistemik dolaşımdan serebral mikrosirkülasyona gelen kan akımının azalmasıyla ortaya çıkan iskemiden birkaç dakika sonra biyokimyasal bulgular görülür. Beyin enerji metabolizması bozulur, anaerobik glikolizis oluşur. Yüksek enerjili fosfatlar tükenir ve membran iyon pompası iflas eder. İntrasellüler ortamda kalsiyum, sodyum, klor ve su birikir, eksitotoksik nörotransmitterlerin salınımı artar, laktat ve hidrojen iyonları birikmeye başlar. Laktik asidoz ortaya çıkar. Serbest radikaller oluşur, lipaz ve proteaz enzimlerinin salınımı artar ve hücre ölümü gelişir.

Bu fizyopatolojik süreçte serbest radikallerin aşırı miktarda üretilmesi veya antioksidan mekanizmaların yetersizliği sonucu hücre hasarı oluşabilir. İskemide, serbest radikaller ile oksidan ve antioksidan denge oksidatif stres lehine bozulur. Beyin yüksek oksijen ihtiyacı, lipid içeriğinin fazla olması gibi nedenlerden dolayı oksidatif strese karşı oldukça sensitiftir.

Bir dokuda meydana gelen iskemi ve sonrasında meydana gelen reperfüzyon süreçlerine oksidan stresin eşlik ettiği pek çok çalışmada gösterilmiştir. Olay bütün olarak dokular arasında benzer olmakla birlikte detaylarda dokuya spesifik farklılıklar gelişebilmektedir. Ortaya çıkan oksidan stres organizmanın bu tür olaylara karşı savunma mekanizması olan antioksidan sistem tarafından dengelenmeye çalışılmakta başlangıçtaki olayın büyüklüğüne ve organizmanın antioksidan kapasitesinin gücüne bağlı olmak üzere nihai tablo oluşmaktadır. İskemi olaylarında bu oksidan/antioksidan sistemler arası mücadele çeşitli parametreler kullanılarak gösterilebilmiştir. Genel mekanizmalarda bir konsensus olmasına karşılık kullanılan deney modelleri ve klinik vakaların bireysel farklılıklarından dolayı çalışmalarda birbirleriyle tam uyuşmayan hatta çelişen bulgular elde edilmektedir.

Bu tür çalışmalarda karşılaşılan önemli bir husus da periferik kan örneklerinde yapılan ölçümlerin ilgili dokuda meydana gelen olayları ne ölçüde doğru yansıttığıdır. Hasarlı dokudan açığa çıkan çeşitli maddelerin yanı sıra organizmanın gerek o doku düzeyinde gerekse sistemik olarak olaya cevap mahiyetinde ürettiği pek çok madde bir bileşke olarak periferik kandaki ölçüm sonuçlarını oluşturacaktır.

Çalışma grubunda iskemik stroklu hastalarda santral sinir sistemi içerisinde meydana gelen iskemik olayın periferik kana yansımaları araştırılmıştır. Oluşan hasarın ve hasara uğrayan dokunun büyüklüğü yanı sıra konuya özgü olarak kan-beyin bariyeri ölçülen parametreler açısından sınırlayıcı etkiler yapmaktadır. Çalışmaya dahil edilen vakalardaki hasar düzeyi ve alanı nispeten sınırlı kalmıştır. Şöyle ki tüm hastalar maksimum 26 günde taburcu olmuş 13 tanesinde kalıcı hasar meydana gelmiştir. Hasarlı dokudan kan-beyin bariyerini geçebilecek kimyasal yapıda olan moleküller kana geçebilirken daha büyük olanların geçebilmesi ancak bu bariyerde hasar meydana gelmesiyle mümkündür. İskemik strokta bu tür bir hasarın gelişmesi beklenmekle birlikte hasarın derecesi primer patolojinin büyüklüğüyle doğrudan orantılı olacaktır. Bu bağlamda baktığımızda MDA ve NO'nun beklendiği şekliyle kanda yükseldiği belirlenmiştir. Ancak bunun dışındaki parametrelerin düzeylerinde belirgin değişiklik olmamıştır. İlginç bir sonuç 72 ve 96. saatlerde ölçülen TOS değerlerinin kontrol gruplarındaki değerlerin altına inmesidir. Strok sonrası ilk 2 gün yükselen TOS değerleri sonraki 2 gün tedricen azalmıştır. MDA ve NO sonuçlarıyla birlikte değerlendirildiğinde olaydan hemen sonra organizmada oksidatif strese belirgin artış olduğu görülmektedir. Daha sonra muhtemelen patolojideki düzelme ve organizmanın lokal/sistemik savunma sistemleri TOS bağlamında oksidan stresi geriletmiştir. Bu gerileme muhtemelen reaktif olarak 3. ve 4. gün değerlerinin kontrolden daha düşük olmasına yol açmıştır. Ancak oksidan stresi baskılayan etki TAK sonuçlarına yansımamıştır.

Sonuç olarak; ölçümleri periferik kanda yapmamız nedeniyle doku düzeyindeki değişiklikler hakkında kesin ifadeler kullanamamakla birlikte iskemik strokta özellikle ilk 2 gün belirginleşen bir oksidan stres artışı meydana geldiğini söyleyebiliriz. Ancak muhtemelen daha sonra klinik (dokudaki) tablonun düzelmesine paralel olarak bu oksidan etki tedricen gerilemektedir. Baktığımız antioksidan parametrelerde ve TAK'da

değişim olmaması bize mevcut patolojinin antioksidan kapasitede belirgin değişikliğe yol açmayacak düzeyde olduğunu düşündürdü.

İskemik strokta oksidan stres artışı belirgin olmakla birlikte antioksidan tedavinin bu tür durumlardaki etkinliğini belirlemek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Özellikle hayvan modelleriyle yapılan çalışmalarda geniş infarkt alanıyla düşük antioksidan düzeyleri arasındaki ilişki veya tedavide antioksidan kullanımıyla infarkt alanının küçülmesi, iskeminin meydana geldiği dokudaki etkileri belirlemek için daha fazla hayvan deneyleri yapılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Ayrıca organizmayı koruyan antioksidan savunma sisteminin değişikliğe uğrayıp uğramadığı, oluşan hasardan sadece serbest radikal üretiminin mi yoksa antioksidan savunma sisteminin yetersizliğinin de etkili olup olmadığı, antioksidan tedavinin profilaktik mi yoksa olay ertesi tedavi edici olarak mı daha etkin olacağı, hangi tip antioksidanların hangi zaman ve yolla verilmesi gerektiği hususu da ayrıca incelenmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Adams and Victor's. Principles of Neurology. 8. Baskı. 2006; 660-666.
2. Kumral E. Serebrovasküler hastalıkların epidemiyolojisi. T Klin J Neur. 2004;2:15-21.
3. Tonarelli SB, Hart RG. What's new in stroke? The top for 2004/2005. J Am Geriatr Soc. 2006;54:674-679.
4. Yemişçi M, Gürer G, Dalkara T. İskemik inmede gelişen fizyopatolojik olaylar. T Klin Nöroloji. 2004;2:22-30.
5. Cherubini ve ark. Potential markers of oxidative stres in stroke. Free Radical Biology and Medicine. 2005;39:841-852.
6. Warner DS, Sheng H, Haberle IB. Oxidants, antioxidants and ischemic brain. The Journal of Experimental Biology. 2004;207:3221-3231.
7. Aho K, Harmsen P, Hatano S. Cerebrovascular disease in community: results of WHO collaborative study. Bulletin of the World Health Organization. 1980;58(1):113-130.
8. Special report from the World Healthy Organization. Report of the WHO Task Force on stroke and other cerebrovascular disorder. Stroke.1989;20:1407-1431.
9. Thrift AG, Dewey HM, Macdonell RAL. Incidence of major stroke subtypes: Initial findings from the North East Melbourne Stroke Incidence Study (NEMESIS). Stroke. 2001;32:1732-1738.
10. Rothwell PM, Coull AJ, Giles MF, Howard SC. Change in stroke incidence, mortality, case-fatality, severity, and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004 (Oxford Vascular Study). The Lancet. 2004;363:1925-1932.
11. Wolfe CDA, Rudd AG, Howard R, Coshall C, Stewart J. Incidence and case fatality rates of stroke subtypes in a multiethnic population: the South London Stroke Register. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2002;72:211-16.
12. Sudlow CLM, Warlow CP. Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types. Stroke. 1997;28:491-499.

13. Rosamond WD ve ark. Stroke incidence and survival among middle-aged adults: 9 year follow-up of the atherosclerosis risk communities (ARIC) cohort. *Stroke*. 1999;30:736-743.
14. Appelros P, Stegmary B, Terent A. Sex differences in stroke epidemiology. *Stroke*. 2009;40:1082-1090.
15. Wolf PA, D'Agostino RB, O'Neal MA, Sytlowski P, Kase CS, Belanger AJ, Kannel WB. Secular trends in stroke incidence and mortality; the Framingham Study. *Stroke*. 1992;23:1551-1555.
16. Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1992;339:342-344
17. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability the contribution of risk factors: Global burden of the disease study. *Lancet* 1997;349:1436-42.
18. Thorvaldsen P, Asplund K, Kuulasma K. Stroke incidence, case fatality and mortality in the WHO Monica Project. *Stroke*. 1995;26:361-67.
19. Sudlow CLM, Warlow CP. Comparing stroke incidence worldwide: What makes studies comparable? *Stroke*. 1996;27:550-558.
20. Nencini ve ark. İncidence of stroke in young adults in Florence, Italy. *Stroke*. 1988;19(8):977-981.
21. Benatru I ve ark. Stable stroke incidence rates but improved case-fatality in Dijon, France, from 1985 to 2004. *Stroke*. 2006;37:1674-1679.
22. Gillum F Richard. Stroke mortality in blacks. *Stroke*. 1999;30:1711-15.
23. Kumral ve ark. The Ege stroke registry: A hospital-based study in the Aegean Region, Izmir, Turkey. *Cerebrovasc Dis*. 1998;8:278-288.
24. Utku U. İnme tanımı, etyolojisi, sınıflandırma ve risk faktörleri. *Türk Fiz Tıp Rehab Derg*. Turkey. 2007;53:1-3.
25. Hankey JG, FRCP, FRACP. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke*. 2006;37:2181-88.
26. Amarenco P ve ark. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27:493-501.
27. Gilman S. Advances in neurology (Second of two parts). *The New England Journal of Medicine*. 1992;326:1672-75.

28. Gijn J, Kerr SR, Rinkel G. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet*. 2007;369:306-18.
29. Vermeulen M. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis and treatment. *J Neurol*. 1996;243:496-501.
30. Bamford J ve ark. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *The Lancet*. 1991;337:1521-26.
31. Adams HP ve ark. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*. 1993;24:35-41.
32. Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM. *Stroke. Pathophysiology, diagnosis and management*. Sec. Ed. Churchill Livingstone. 1992;69-101.
33. Heros RC. SVOe: Early pathophysiology and treatment stroke. 1994;25(9):1877-1881.
34. Özdemir G. Serebrovasküler hastalıklar'dan strok'a yaklaşım. *T Klin J Neur*. 2004;2:1-14.
35. Carbonell T, Rama R. Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. *Current Medicinal Chemistry*. 2007;14:857-874.
36. Dugan LL, Choi WD. Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Ann Neurol*. 1994;35:17-21.
37. Nokhrin SM, Weil JA, Howarth DF. Magnetic resonance in systems with equivalent spin-1/2 nuclides. Part 1. *Journal of Magnetic Resonance*. 2005;174:209-218.
38. Nokhrin SM, Weil JA, Howarth DF. Magnetic resonance in systems with equivalent spin-1/2 nuclides. Part 2: Energy values and spin states. *Journal of Magnetic Resonance*. 2008;193:1-9.
39. Erden M. Serbest radikaller. *T Klin Tıp Bilimleri* 1992;12:201-207.
40. Kavas GÖ. Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye klinikleri*. 1989;9(1):1-8.
41. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Konya: mimoza yayınları, 1995:1-73.
42. Collen Smith, PhD at al. Oksijen toksitesi ve serbest radikal örsentisi. Marks' Temel Tıbbi Biyokimyası. Güneş tıp kitabevleri. 2. baskı:

43. Şimşek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. *T Klin J Pediatr.* 1999;8:42-47.
44. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengelyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11:336-341.
45. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 2007;28(4):41-55.
46. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke.* 1990;25:7-12.
47. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. *T Özal Tıp Merkezi Dergisi.* 1997;4(4):453-461.
48. Çekmen BM ve ark. Nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS)'in fizyolojik ve patolojik özellikleri. *T Klin Pediatri.* 2001;10:226-236.
49. Güray A, Samancı N, Ovalı F, Dağoğlu T. Nitrik oksit: fizyolojisi ve klinik önemi. *T Klin Tıp Bilimleri.* 1997;17:115-119.
50. Türk Farmakoloji derneği. Nitrik oksidin farmakolojisi. Farmakoloji eğitim sempozyumları programı. 2005, Mersin.
51. Marletta A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *The Journal of Biological Chemistry.* 1993;268(17):12231-12234.
52. Calabrese V, Bates ET, Stella AMG. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: The role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochemical Research.* 2000;25:1315-1341.
53. Jurcau A. Acute cerebral ischemia and oxidative stres. *Romanian journal of Neurology.* 2008;2(2):45-56.
54. Halliwell B. Reactive oxygen species and central nervous system. *Journal of Neurochemistry.* 1992;59:1609-1623.
55. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the oxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7:161-168.
56. Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2001;21:2-14.

57. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. 1995;41(12):1819-1828.
58. Adachi T. ve ark. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. Clinica Chimica Acta. 1994;229:123-131.
59. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. Hypertension. 2004;44:1-6.
60. Schulz B.J, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. Eur. J. Biochem. 2000;267:4904-4911.
61. Ullegaddi R ve ark. Antioxidant Supplementation With or Without B-Group Vitamins After Acute Ischemic Stroke: A Randomized Controlled Trial. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition. 2006;30(2):108-114.
62. Şener G, Yeğen Ç.B. İskemi Reperfüzyon Hasarı. Klinik Gelişim. 5-13.
63. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clinical Biochemistry. 2005;9:1-9.
64. Işık A, Selek Ş. Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. F. Ü. Sağ. Bil. Derg. 2007;21(2):67-73.
65. Işık A, Selek Ş. Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Behçet's Disease. F. Ü. Sağ. Bil. Derg. 2006;20(6):415-421.
66. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry. 2004;37:277-285.
67. Gür M ve ark. The effect of coronary angioplasty on oxidative and antioxidative status. Türk Kardiyol. Dern. Arş. 2007;35(1):21-27.
68. Banerjee K.A. ve ark. Oxidant, antioxidant and physical exercise. Molecular and Cellular Biochemistry. 2003;253:307-312.
69. Alexandrova L.M, Bochev P.G. Oxidative stress during the chronic phase after stroke. Free Radical Biology & Medicine. 2005;39:297-316.
70. Paravicini M.T, Drummond G.R, Sobey C.G. Reactive oxygen species in the cerebral circulation. Drugs. 2004;64(19):2143-2157.

71. Napoli C, Ignarro J.L. Nitric Oxide and Pathogenic Mechanisms Involved in the Development of Vascular diseases. *Arch Pharm Res.* 2009;32(8):1103-1108.
72. Moncado S, Palmer R.M.J, Higgs A. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews.* 1991;43(2):109-142.
73. Yagi K. Lipid peroxides in hepatic, gastrointestinal, and pancreatic diseases. *Adv. Exp.Med. Biol.* 1994;366:165-9.
74. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001 Feb;5:62-71.
75. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and non-protein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968 Oct 24;25(1):192-205.
76. Özkul A ve ark. Oxidative stres in acute ischemic stroke. *Journal of Clinical Neuroscience.* 2007;14:1062-66.
77. Yıldırım A, Kotan D, Yıldırım S, Aygül R, Akçay F. Increased Lipid Peroxidation and Decreased Antioxidant Response in Serum and Cerebrospinal Fluid in Acute Ischemic Stroke. *Turk J Med Sci.* 2007;37(2):75-81.
78. Kapan Ş. ve ark. Eritropietinin sıçan aortik iskemi-reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi. *Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi.* 2009;17:110-6.
79. Romero F ve ark. Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. *Environmental Health Perspectives.* 1998;106:1229-1234.
80. Demirkaya S, Topcuoglu M.A, Aydın A, Ulas U. Malondialdehyde, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in peripheral blood erythrocytes of patients with acute cerebral ischemia. *European J of Neur.* 2001;8:43-51.
81. Polidori ve ark. Plasma Carotenoid and Malondialdehyde Levels in Ischemic Stroke Patients. Relationship to Early Outcome. *Free Radical Research.* 2002;36(3):265-268.
82. Sharpe P.C, Mulholland C, Trinick T. Ascorbate and Malondialdehyde in Stroke Patients. *I.J.M.S.* 1994;488-490.
83. Gariballa S.E, Hutchin T.P, Sinclair A.J. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *Q J Med.* 2002;95:685-690.

84. Adibhatla R.M, Hatcher J.F. Phospholipase A₂, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Stroke*. 2005;
85. Sinan L, Demir S, Rota S, Köseoğlu M. Increased serum malondialdehyde levels in chronic stage of ischemic stroke. *Tohoku J. Exp. Med.* 2006;208:33-39.
86. Samdani ve ark. Nitric Oxide Synthase of Focal Ischemia. *Stroke*. 28(6):1283-95.
87. Castillo J, Rama R, Davalos A. Nitric Oxide Related Brain Damage in Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2000;31:852-857.
88. Liu K, Li Q, Zhang L, Zheng X. The dynamic detection of NO during stroke and reperfusion in vivo. *Brain Injury*. 2009;23(5):450-458.
89. Tümer C. Fokal serebral iskemide nitrik oksitin rolü. *Dicle Tıp Dergisi*. 2002;29: 91-101.
90. Nanetti ve ark. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem*. 2007;303:19-25.
91. Taffi R. Ve Nanetti L. Plasma levels of nitric oxide and stroke outcome. *J Neurol*. 2008;255:94-98
92. Gümüştaş ve ark. The effects of Vitamin E on Lipid Peroxidation, NO Production and SOD Expression in Hyperglycemic rats with Cerebral Ischemia Reperfusion Injury. *Turkish Neurosurgery*. 2007;17:78-82.
93. Climaco ve ark. Increased serum malondialdehyde and decreased NO within 24 hours of thrombotic stroke onset. *American J of Therapeutics*. 2003;10:473-476.
94. Güldiken ve ark. Oxidative stress and total antioxidant capacity in diabetic and nondiabetic acute ischemic stroke patients. *Clin Appl Thromb Hemos*. 2008;1-6.
95. West M, Ramana K, Kaiserova K, Srivastava S, Bhatnagar A. L-Arginine prevents metabolic effects of high glucose in diabetic mice. *FEBS*. 2008;582:2609-2614.
96. Kocatürk P.A. NO'in diabet patogenezi ve komplikasyonlarındaki rolü. *A.T.F.Mecmuası*. 1996;49:237-242.
97. Bachmann S, Mundel P. Nitric Oxide in the kidney: Synthesis, Localization, and Function. *American J of Kidney Diseases*. 1994;24:112-129.
98. Ebinç H, Cemri M. NO ve Hipertansiyondaki yeri. *T Klin Kardiyoloji*. 2001;14:190-195.

99. Correa ve ark. Oxidative stres and AChE in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2008;62:317-324.
100. Rabus M ve ark. Plasma and tissue oxidative stres index in patients with rheumatic and degenerative hearth valve disease. *Türk Kard Dern Arş*. 2008;36:536-540.
101. Deniz B, Şermet A, Tümer C, Koçyiğit Y. Geçici serebral iskemide antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler. *Dicle Tıp Dergisi*. 2004;31:29-36.
102. El Kossi ve ark. Oxidative stres in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke*. 2000;31:1889-1892.
103. Sheikh ve ark. Relationship between estradiol and antioxidant enzymes activity of ischemic stroke. *J of Biomedicine and Biotechnology*. 2009
104. Srikrishna R, Suresh D.R. Biochemical study of antioxidant profile in acute ischemic stroke. *BJMP*. 2009;2(1):35-37.
105. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donneberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury.
106. Gruener N, Gross B, Gozlan O, Barak M. Increase in superoxide dismutase after cerebrovascular accident. *Life Science*. 1994;54(11):711-713.
107. Jung ve ark. Regulation of Mn-Superoxide Dismutase Activity and Neuroprotection by STAT3 in Mice after Cerebral Ischemia. *J of Neuroscience*. 2009;29(21):7003-7014.
108. Michowiz S, Melamed E, Pikarsky E, Rappaport H. Effect of ischemia induced by middle cerebral artery occlusion on SOD activity in rat brain. *Stroke*. 1990;21:1613-1617.
109. Sampei ve ark. Stroke outcome in double-mutant antioxidant transgenic mice. *Stroke*. 2000;31:2685-2691.
110. Yang C, Lin M. Oxidative stres in rats with heat stroke induced cerebral ischemia. *Stroke*. 2002;33:790-794.
111. Murakami ve ark. Mitochondrial susceptibility to oxidative stres exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese SOD deficiency. *The J of Neuroscience*. 1998;18:205-213.
112. Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke*. 1996;27:1124-29.

113. Collier A. free radical activity in type 2 diabetes
114. Zimmermann C, Winnefeld K, Streck S, Roskos M, Haberl R.L. Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk. *Eur Neurol.* 2004;51:157-161.
115. Leinonen ve ark. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke.* 2000;31:33-39.
116. Imai H, Graham D.I, Masayasu H, Macrae I.M. Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. *Free Rad Biology&Medicine.* 2003;34(1):56-63.