

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ
ANABİLİM DALI

**FOKAL KALICI SEREBRAL İSKEMİDE
RİSPERİDON VE OLANZAPİNİN İN VİVO
NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

724455

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.Egemen İDİMAN

124455

UZMANLIK TEZİ
Dr.Burak Yuluğ

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANLASYON MERKEZİ

İzmir 2003

ÖNSÖZ

Nöroloji eğitimim boyunca eşsiz desteklerini gördüğüm sayın hocalarım Prof.Dr.Egemen İdiman, Prof.Dr.Fethi İdiman, Prof.Dr.Kürşad Kutluk, Prof.Dr. Ahmet Genç, Prof.Dr.Bariş Baklan, Prof.Dr.Raif Çakmur, Doç.Dr. Görsev G. Yener ve Doç.Dr Gülden Akdal'a içten teşekkür ederim. Ayrıca tezimin oluşmasındaki yardımlarından dolayı, Prof.Dr. Egemen İdiman ve Prof.Dr. Fethi İdiman'a, okunmasındaki yardımlarından dolayı da Doç.Dr.Vesile Öztürk'e ve Psikiyatri Bölümü öğretim üyelerinden Yrd.Doç.Dr Ayşegül Yıldız'a teşekkürü borç bilirim. Karşılaştığım tüm zorluklarda her zaman yanımda olan ve moleküler nörobiyoloji birikimini benimle severek paylaşan Dr.Ertuğrul Kılıç ve Dr.Ülkan Kılıç'a, dostça dayanışmalarını her zaman hissettiğim tüm asistan ve uzman arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim. Tez çalışmasının sürdüğü yoğun günlerin ağırlığını benimle paylaşan aileme sabrı için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR.....	i
II. KISALTMALAR	ii
II. ÖZET	iv
III. İNGİLİZCE ÖZET	v
IV. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER.....	2
1.1. İskemi ve Reperfüzyonda Doku Hasarı Mekanizmaları	2
1.1.1. Fokal Serebral İskeminin Fizyopatolojisi	2
1.1.2. Fokal Serebral İskeminin Fizyopatolojisinde Enerjinin (ATP) rolü	2
1.1.3 Enerji Metabolizmasının İyon Değişimiyle Olan İlişkisi	3
1.2 Reperfüzyon ve Radikal Hasarı	5
1.2.1 Serbest Radikaller	5
1.2.2 Reperfüzyon Toksisitesi	10
1.3 Eksitotoksisite	11
1.3.1 Glutamat Eksitotoksisitesi.....	11
1.3.2 Ca ⁺⁺ Sitotoksisitesi.....	14
1.3.3 Asidoz.....	14
1.3.4 Dopamin ve Serotonin Eksitotoksisitesi	16
2. MATERYAL VE METOT	21
2.1 Deney Hayvanları ve Grupları.....	21
2.2 Permanent Fokal Serebral İskemi Modeli.....	22
2.3 Serebral Kan Akımı Ölçümü	23
2.4 Enfarkt Alanının Gösterilmesi	23
2.5 Enfarkt Alanının Hesaplanması	23
2.6 Sistemik Kan Basıncı	24
2.7 Fizyolojik Kan Değerleri.....	24
2.8 İstatistik Metodlar	24
3. BULGULAR.....	25
3.1 Fizyolojik Parametreler	25
3.2 Enfarkt Hacmi	27
4. TARTIŞMA	29
7. KAYNAKLAR.....	35

KISALTMALAR

- AA : Araşidonik asit
AMPA : Amino -3-hidroksi -5- metil -4- isoazol propiyonik asit
APUD : Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
ARG : Arginin
ATP : Adenozin trifosfat
cAMP : Siklik adenozin monofosfat.
CAT : Katalaz
CCA : Kommon karotid arter
cGMP : Siklik guanozin monofosfat
DAG : Diaçilgliserid
DNES : Diffuse Neuroendocrine System
EAA : Eksitatör Amino Asit
EC : Enterokromafin
ECA : Eksternal karotid arter
G-6PD : Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
GPx : Glutatyon peroksidaz
GRd : Glutatyon redüktaz
GSH : İndirgenmiş glutatyon
GSS : Ganglion Servikale Süperior
GSSG : Okside glutatyon
H₂O₂ : Hidrojen peroksit
HIOMT : Hidroksiindol-O-Metiltransferaz
HRP : Horseradish peroxidase
HX : Hipoksantin
ICA : İnternal karotid arter
K : Kainat
LDF : Laser dopler akım ölçer
LOO· : Peroksil radikali
MÖBL : Mediyal Ön Beyin Lifleri
NANF5M: N-asetil-N-formil-5-metoksikinuramine

NAT	: N-Asetittransferaz
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
NO [·]	: Nitrik oksit radikali
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSC	: Nukleus suprakiazmatikus
¹ O ₂	: Singlet oksijen
O ₂ ^{·-}	: Süperoksit radikali
OCA	: Orta Serebral Arter
ONOO ⁻	: Peroksinitrit anyonu
OSR	: Oksijenden oluşan serbest radikaller
PCA	: Posterior serebral arter
PcomA	: Posterior kommunikant arter
PCr	: Fosfokreatin
Pg	: Prostaglandinler
PPA	: Pterygopalatin arter
rCBF	: Bölgesel beyin kan akışı
SOD	: Süperoksit dizmutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TRH	: Traktus Retinohipotalamik
TTC	: 2, 3, 5, trifenil tetrazolium klorid monohidrat
VA	: Vertebral arter
XD	: Ksantin dehidrogenaz
XO	: Ksantin oksidaz

ÖZET

İskemi esnasında salınan birçok nörotransmitter spesifik postsinaptik reseptörler üzerinden nöronal dejenerasyona yol açmaktadırlar. Bu nörotransmitterlerden özellikle glutamatın iskemik hücre ölümündeki eksitotoksik etkisi uzun yıllar araştırılmıştır. Fakat sonraki çalışmalar, glutamat dışında daha birçok nörotransmitterin de, sinaptik aralığa salındığına ve eksitotoksik hasarlanmada primer rol oynadığına işaret etmiştir.

Olanzapin ve risperidonun, serotonin ve dopamin reseptör blokörü etkileri yanısıra, histaminerjik, adrenerjik, ve muskarinik reseptörler üzerinede antagonist etkileri bilinmektedir. Özellikle son yıllarda şizofreninin negatif ve pozitif semptomlarının giderilmesinde sık olarak kullanılan bu atipik antipsikotik ajanların, uzun süre kullanımda daha iyi klinik sonuçlar vermesi, nöroprotektif etkilerini içeren birçok invivo ve invitro çalışmaların yapılmasına yol açmıştır.

Bu çalışmanın amacı, risperidon ve olanzapinin kalıcı serebral iskemik modelinde, özellikle reseptörler düzeyinde gösterdikleri nöroprotektif etkileri ile ,iskemi sonucu oluşan beyin hasarının önlenmesindeki etkisini araştırmaktır.

SUMMARY

Ischemia induced release of diverse neurotransmitters and the ensuing activation of specific postsynaptic receptors have been suggested to play a major role in the development of ischemic selective vulnerability. Interest in the role of neurotransmitters in ischemia followed studies establishing that the release of glutamate and its excitotoxic actions are involved in ischemic neuronal damage. Subsequent studies have demonstrated that the release of not only glutamate but also other neurotransmitters and the ensuing imbalance between excitation and inhibition is important for the development of ischemic neuronal damage. Among these neurotransmitters the monoamines have been implicated in the pathogenesis of neuronal injury during ischemia. It has been shown that there is a large increase in glutamate, dopamine, serotonin and other neurotransmitters during ischemia.

Olanzapine and risperidone are potent serotonin (5-hydroxytryptamine, 5HT)_{2a} and dopamine D₂ receptor antagonists that are widely used in the treatment of both positive and negative symptoms of schizophrenia. Besides their high affinity for dopamine and serotonin receptors they also show relatively weak affinity for muscarinic and histaminergic receptors. Clinical evidence has shown that early and prolonged intervention with these drugs will improve the long-term outcome of illness. It is still unclear, however, whether the atypical antipsychotic drugs have neuroprotective properties.

In this study, we attempted to clarify the neuroprotective role of olanzapine and risperidone in the mouse model of *invivo* focal permanent cerebral ischemia. Both agents were applied just before permanent ischaemia and the neuroprotection was evaluated by TTC staining.

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Beyin, canlıların mental ve motor fonksiyonlarının oluşmasında temel ve fonksiyonel önemi olan, aynı zamanda hasarlanmaya karşı çok duyarlı olan bir organdır. Özellikle yaşlanmayla birlikte, aterosklerotik süreçlerin hızlanması, tromboembolik olaylarda artışa sebep olmakta, bu durum serebral kan damarlarının tıkanması sonucu iskemi oluşum riskini artırmaktadır. Böylece, beyin fonksiyonlarının bir kısmının yok olması ya da bozulması sonucu meydana gelecek hemiparezi ve benzeri olaylar, yaşamı güç bir hale sokmaktadır. Bu sebeple stroke modelleri üzerinde, deneysel çalışmalar giderek artmaktadır.

Fokal serebral iskemi modelleri insanda oluşan iskemiye benzer tablolar ve tekrarlanır sonuçlar oluşturması sebebiyle son yıllarda en çok yeğlenen deneysel metodlardan biri haline gelmiştir. İp modeli ile oluşturulan fokal serebral iskemi modelinde, hem reperfüzyon hem de permanent iskemi kolaylıkla gerçekleştirilebilmekte ve bundan dolayı deneysel çalışmalarda tercih edilmektedir.

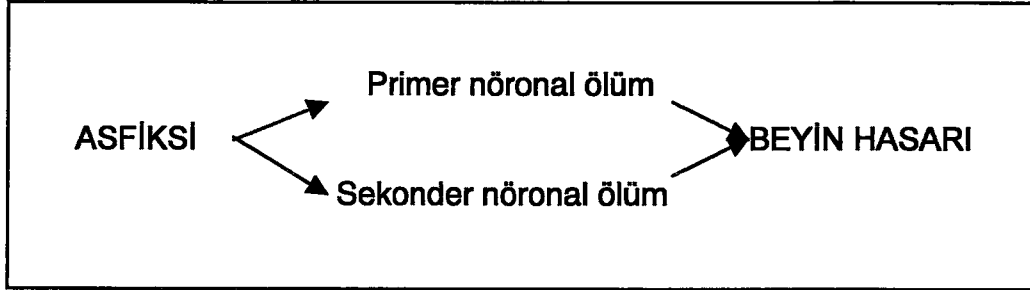
Atipik antipsikotikler gösterdikleri ilginç nöroprotektif özelliklerinden dolayı, son zamanlarda klinik psikiyatri kadar moleküler psikiyatri ve nörolojinin de ilgi alanına dahil edilmişlerdir. Atipik antipsikotikler, yüksek lipofilik özellikleri sebebiyle kolayca kan beyin bariyeri ve hücre membranını geçebilmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarla özellikle risperidon ve olanzapinin travmatik beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir. Bu iki ajanla yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar her iki ajanın da serotonin ve dopamin reseptörleri üzerinden olduğu kadar nöroendokrinolojik aksis üzerine de etkilerinin olduğunu dolayısıyla nöroproteksiyonda rol oynadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmanın amacı, risperidon ve olanzapinin kalıcı serebral iskemi modelinde, özellikle reseptörler düzeyinde gösterdikleri nöroprotektif etkileri ile ,iskemi sonucu oluşan beyin hasarının önlenmesindeki etkisini araştırmaktır.

1.GENEL BİLGİLER

1.1. İSKEMİ VE REPERFÜZYONDA DOKU HASARI MEKANİZMALARI:

On yıl öncesine kadar yalnızca oksijen eksikliğinin beyin hasarına sebep olduğuna inanılmaktaydı. Son on yıldır yapılan çalışmalar, reoksijenasyonun da hasara neden olduğunu göstermiştir. Günümüzde beyin hasarı iskemi sırasında primer ve reperfüzyon sırasında sekonder olmak üzere iki başlıkta incelenmektedir (1).



Şekil 1: Asfiksi sonrası serebral hasarın iki yolu

1.1.1. Fokal Serebral İskemi ve Reperfüzyonun Fizyopatolojisi:

1.1.2. Fokal Serebral İskeminin Fizyopatolojisinde Enerjinin (ATP) rolü:

Hücresel enerji bozukluğu, iskemi araştırmalarının temel noktasını oluşturur. Hücre nekrozu, sekonder olarak enerji metabolizması bozukluğu veya yokluğu anlamına gelmektedir (2). ATP veya diğer nükleosit trifosfatların (sistidin trifosfat ve üridin trifosfat gibi) sentezlerinin bozulması, üç şekil de hücrenin canlılığını tehlikeye sokmaktadır. Bunlardan ilki; enerji kaynaklarının yokluğunda aneorobik glikolizin uyarılması sonucunda intra ve ekstrasellüler asidoz oluşması ve iskemik dokunun canlılığının iyileşmesinin engellenmesidir. İkincisi; enerji yokluğu nedeniyle iyon homeostazisindeki düzensizliğin iskemik dokunun canlılığını tehlikeye sokmasıdır. İyon homeostazisindeki düzensizlik; ozmotik olarak Na^+ ve Cl^- un hücre içine girmesi, patolojik olarak büyük önemi olan su ve Ca^{++} girişine sebep olmaktadır. Üçüncü etki ise enerji yokluğunda yüksek enerjili fosfatların, spontan veya enzimler aracılığıyla yıkılmalarını izleyerek makromoleküllerin yeniden sentezlenmesinin engellenmesidir. ATP kaybı bu süreçlerin sürekliliğini engelleyerek, hücre yapısının bozulmasına neden olur. Örneğin, ATP eksikliği, (mikrofilament ve/veya mikrotubulinin hücre membranına yerleşmesi gibi) hücre iskeletinin proteolitik olarak

parçalanmasına neden olur (3). ATP eksikliğinin diğer etkisi, lisofosfolipidler, diaçilgliseridler (DAG) ve araşidonik asiti içeren (serbest yağ asitleri gibi) yıkım ürünlerinin birikmesi ile fosfolipidlerin parçalanmasıdır (2,4). Parçalanma enzimlerinin aktive edilmesi, ATP kaybı sonucu meydana gelen kalsiyum konsantrasyonundaki artıştan kaynaklanmaktadır (5,6,7,8,9).

1.1.3. Enerji metabolizmasının iyon değişimiyle olan ilişkisi

Enerji metabolizması ve iyon homeostazisi, polarize hücre membranından pasif veya enerji gerektiren iyon akışı nedeniyle yakın ilişki içerisinde. Fizyolojik olarak iyonların eşit olmayan dağılımı ve yaklaşık -60 mV'luk membran potansiyeli doğrudan veya dolaylı olarak ATP'ye bağımlı olan iyon transportuyla oluşturulur. Membran kanalları yoluyla oluşan pasif iyon değişimi aktif taşıma ile dengelenir.

İyon homeostazisinin bozulması, iyon pompalarının görevlerini yapamaması veya membrandaki sızıntıdan dolayı meydana gelir. Eğer membran depolarize olursa, elektriksel güç zayıflar ve akış yönü genellikle konsantrasyon gradiyentiyle belirlenir. Bu da Cl^- , Na^+ ve Ca^{++} 'un hücre içine girmesine ve K^+ 'un ayrılmasına sebep olur (6,7,10).

Şekil 2'de iskemi sırasında meydana gelen serebral enerji düzeyindeki değişiklik, iyon akışındaki bozukluk ve iki büyük fazda meydana gelen iyon değişimi gösterilmiştir (11). İlk faz sırasında ekstrasellüler K^+ seviyesi hafifçe artış gösterir. Aynı zamanda laktik asitin diffüzyonla hücreden ayrılması ve CO_2 'in birikmesi ekstrasellüler pH'da düşmeye sebep olur. Bununla birlikte, olasılıkla K^+ iletkenliği de aktive edilmektedir. Aynı zamanda ilk faz sırasında ekstrasellüler Ca^{++} düzeyinin azalması görülmektedir.

İkinci faz sırasında, Na^+ , Cl^- ve Ca^{++} absorbe olurken, K^+ hızlı bir şekilde hücreden ayrılır. Bu değişiklikler DC elektrik potansiyeli değişiklikleri ve pH kayıtlarındaki değişikliklerle eş zamanlı olarak meydana gelmektedir. Bunun yanında HCO_3^- , HCO_3^- 'a iletken olduğu bilinen aktif Cl^- kanalları yoluyla ters yönde hareket eder (12).

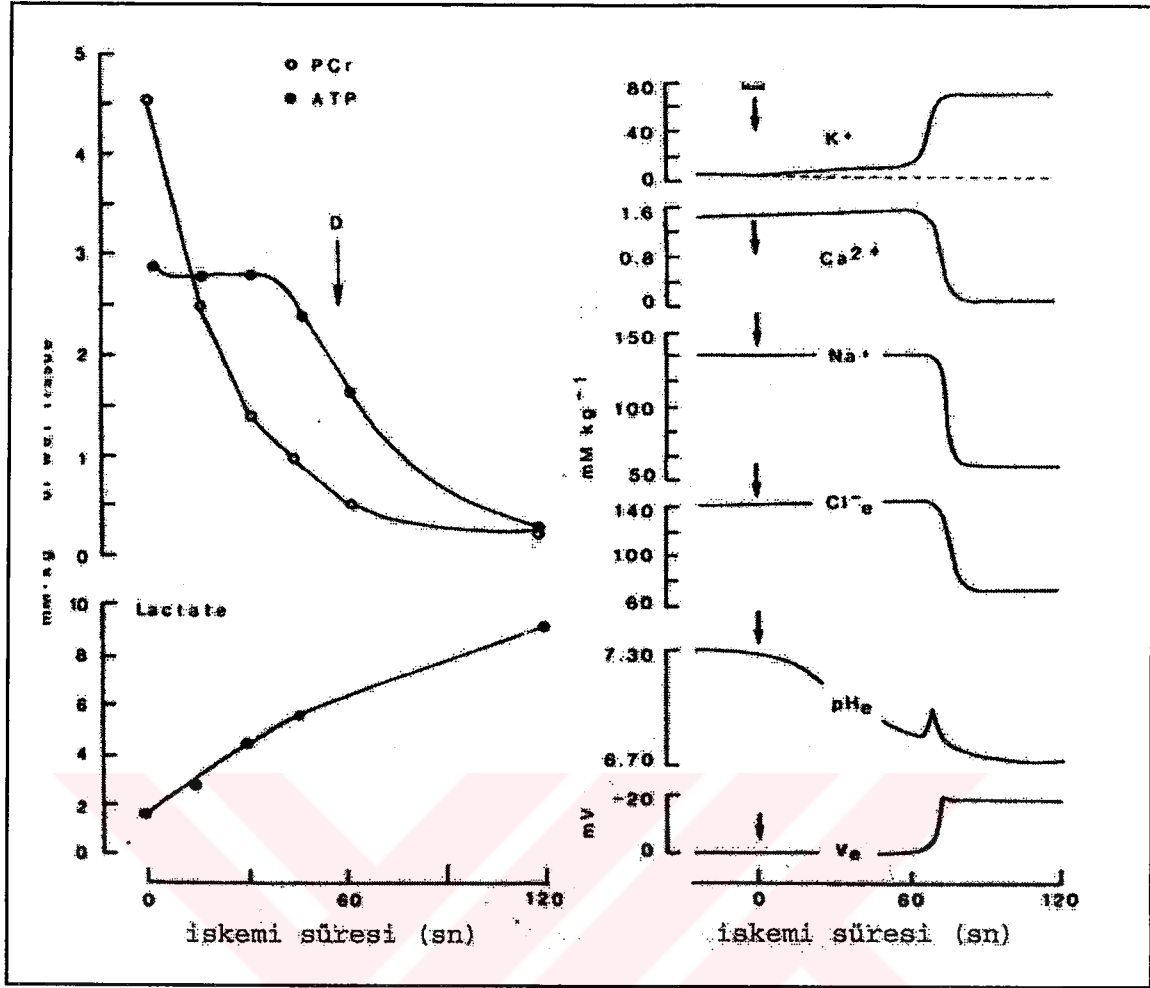
Fosfokreatin (PCr) ve ATP düzeyindeki değişikliklere gelince; anoksi sırasında ATP üretimi durmaktadır, fakat ATP kullanımı devam etmektedir. Bu $ATP + H_2O \rightarrow ADP + \text{intrasellüler fosforlar} + H^+$ reaksiyonu yoluyla ATP'nin hidroliziyle yoluladır. Bununla birlikte, ATP, ADP konsantrasyonundaki artıştan dolayı PCr depoları tükeninceye kadar ATP kreatin kinaz reaksiyonu (PCr +

ADP +H → kreatin +ATP) sabit tutulur, daha sonra ATP konsantrasyonu düşmeye başlar. Hücre laktat üretimiyle veya aneorobik glikoliz ile bir miktar ATP sağlamaktadır, fakat bu, hızlı enerji kaybını karşılamaya yetmeyecek kadar azdır (8,10).

İyon akışı hücre hasarının iki mekanizmasını gösterdiğinden dolayı fizyopatolojik olarak önemlidir. İlki, Na⁺ ve Cl⁻'un girişi ozmotik olarak suyun girmesine neden olarak hücrenin parçalanmasına neden olur (ozmotik hasar). İkincisi ise intrasellüler Ca⁺⁺ artışıdır (Ca⁺⁺ ile indüklenen hasar) (Şekil 2) (13).

İskeminin başlamasından hemen sonra Ca⁺⁺ depolarından kalsiyumun serbest bırakılması sebebiyle, ekstrasellüler Ca⁺⁺ düzeyi değişmemesine rağmen intrasellüler Ca⁺⁺ artmaktadır. Bu artış, yüzeysel floresans yöntemi ile gösterilmiştir. İntrasellüler kalsiyum artışından dolayı membran geçirgenliği K⁺, Cl⁻ ve diğer iyonlara karşı artar (14).

İyonlara karşı artan membran geçirgenliği iyon homeostazisindeki bozukluğun önemli sebeplerinden biridir. K⁺ kaybindan sonra pompa bozukluğu ve artan sızıntı iskemik hasarı kuvvetlendirici olaylar olup, Ca⁺⁺ ve Na⁺ un hücre içine alınımı kadar ATP tüketimini de uyarmaktadır. Bunun yanında, iyonlara karşı membran geçirgenliği arttığından, mevcut olan ATP, iyonların hücreye yarar sağlamayan siklusları sırasında kullanılır. Fakat ATP depolarının tükenmesi bile iyon homeostazisi kaybını engelleyememektedir. Şekil 2'de gösterilen iyon akışı normal dokularda da meydana gelmektedir. Bu elektrik stimulusuyla, lokal K⁺, glutamat uygulaması veya sivri bir aletle yaralama ile oluşturulan "spreading depresyonda" da gözlenmektedir (15,16,11). İskemi (veya hipoglisemi) ve "spreading depresyon" arasındaki farklılık iskemide iyon akışının spontan olarak geri dönüşümlü olmamasıdır.



Şekil 2: İskemi sırasında iyon akışı ve enerji bozukluğu arasındaki ilişki

Sol: Tam iskeminin ilk 120 saniyesi sırasında, dokuda fosfokreatin (PCr), adenozin trifosfat (ATP) ve laktat konsantrasyonu. D= depolarizasyon.

Sağ: Ekstrasellüler K^+ , Ca^{++} , Na^+ , Cl^- (Cl_e^-), pH (pH_e) konsantrasyonundaki değişiklikler ve DC potansiyeli (V_e). ATP konsantrasyonu kontrol seviyesinin % 90'ından büyükse K^+ artmamaktadır. ATP konsantrasyonu kontrol seviyesinin % 50'sinin altına düştüğünde iyon homeostazisi de bozulmaktadır (8).

1.2 REPERFÜZYON VE DOKU HASARI

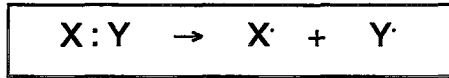
1.2.1. Serbest radikaller

Bir atom yada molekülün yapısında yer alan elektronlar daima nükleus etrafında, her bir yörüngede çift sayıda dizilim gösterme eğilimindedirler. En dış yörüngesinde bir veya daha fazla sayıda ortaklanmamış elektron içeren atom moleküllere serbest radikal adı verilir (17,18). Serbest radikallerdeki eksik olan

elektron nokta ile gösterilir (17,19). Serbest radikal reaksiyonları normal biyolojik olaylarda geniş bir spektrum içerisinde yer alır ve birçok hücrel enzim ve elektron transport sistemi, katalitik fonksiyon doğrultusunda ara ürün olarak sınırlı miktarda serbest radikal oluşturur. Normal fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller, biyolojik korunma mekanizmaları ile ortamdan uzaklaştırılır. Ancak dejeneratif hastalıklar gibi bazı patolojik süreçlerde reaksiyonların ara kademelerinde serbest radikallerin aşırı miktarda üretilmesi ve/veya biyolojik koruyucu sistemlerin çalışmaması gibi durumlarda istenmeyen etkilere yol açarlar.

Serbest radikaller 3 farklı biçimde oluşurlar:

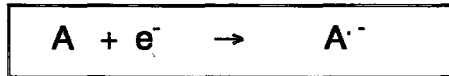
1- Kovalent bağlı normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi.



2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün elektronları eşit olarak paylaşmaksızın bölünmesi. Bunda kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalırlar. Bu şekilde serbest radikaller yerine iyonlar meydana gelir.



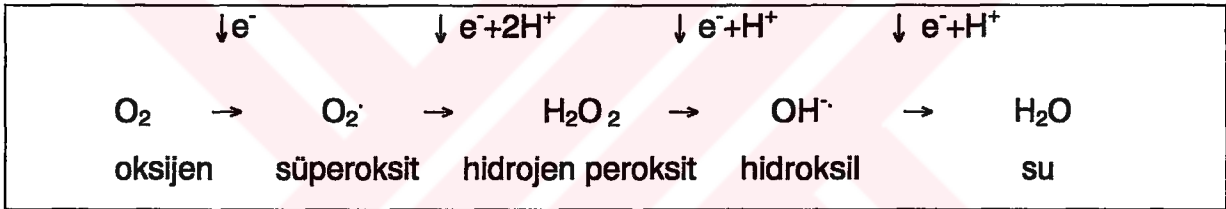
3- Normal moleküle bir elektron eklenmesi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller, en fazla elektron transferi sonucu meydana gelir. Serbest radikaller, pozitif veya negatif yüklü olabileceği gibi elektriksel olarak nötr de olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklindedir . Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de, ortaklanmamış elektronları olduğu halde, serbest radikal kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar, reaksiyonları katalize ettikleri için serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (17).

Serbest radikaller molekülün yapısına göre; oksijen merkezli (örn: süperoksit radikali, peroksit radikali, hidroksil radikali), karbon merkezli (örn: karbon tetraklorür, triklorometil, aromatik hidrokarbonlar) veya sülfür merkezli (örn: glutatyon radikali) olarak gruplandırılabilir. Oluşan serbest radikaller hücre membranı ve hücre içi organelleri etkilerken ekstrasellüler komponente de geçer ve uzak etkiler oluştururlar. Burada serbest radikalın çözünürlüğü ve diffüzyon hızı önem

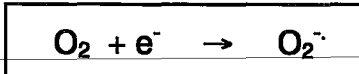
kazanmaktadır. Oksijen merkezli serbest radikaller incelendiğinde hidroksil radikali oldukça potent olmasına rağmen, diffüzyon hızı yavaştır. Bu yüzden ancak oluştuğu yerde ya da yakınında etki gösterir. Buna karşın H_2O_2 çok az potent olmasına rağmen plazma membranını, mitokondrial ve peroksizomal membranları rahatlıkla geçerek uzak etki gösterebilirler (20,18). Günümüzde serbest oksijen radikalleri terimi yerine, daha kapsamlı olan ve hem süperoksit, $RO\cdot$, $RO_2\cdot$, hidroksil gibi oksijen içeren radikalleri, hemde aslında radikal olmadıkları halde reaksiyonları ile oksijen içeren radikallerin oluşumuna neden olabilen (peroksit, singlet oksijen, O_3 , hipoklorik asit gibi) molekülleri içine alan "Reaktif oksijen ürünleri (ROS)" terimi daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Reaktif oksijen ürünleri termodinamik stabilitelelerini kazanmak için yakında bulunan diğer moleküllerden elektron yada H^+ atomlarını serbestleştirmeye çalışır ve bu molekülleri aktif radikal haline getirir. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu aşağıdaki formülasyonla gösterilebilir (21,22,23).



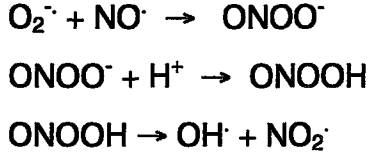
Canlılardaki en önemli serbest radikaller, serbest oksijen radikalleridir. Serbest oksijen radikallerinde anahtar rolü oynayan maddeler oksijen, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metal iyonları ve hidroksil radikalidir. İlk dördünün çeşitli reaksiyonları sonucu hidroksil radikali şekillenir (17,24,25,26).

Oksijenin elektronlarının iki tanesinin eşleşmemiş bir şekilde dağılımından dolayı, oksijen bazen diradikal olarak da değerlendirilir. Bu özelliği, onun diğer serbest radikallerle kolayca ilişkiye girmesini sağlar. Radikal olmayan maddelerle ise daha yavaş reaksiyona girerler (17).

Süperoksit radikali en çabuk ve en kolay oluşan radikaldir. Aktivitesi kısmen düşük olduğu halde, diğer radikalleri oluşturduğu ve geçiş metal iyonlarını indirgediği için önemlidir. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle oluşur.

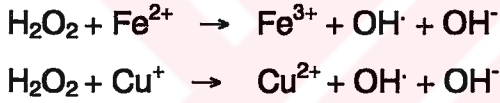


Süperoksit radikali ile NO[•] radikali reaksiyona girerek reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit (ONOO⁻) oluşturur. Fizyolojik pH'da peroksinitrit hızla hidroksil ve nitrojen dioksit radikaline çevrilir.

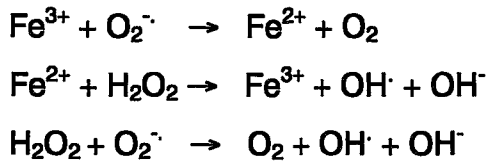


Peroksinitrit güçlü bir prooksidan madde olup süperoksit dismutaz ile reaksiyona girerek sellüler proteinlerin tirozinlerini nitrozile eder. Böylece hücrel fonksiyon bozukluklarına neden olur (27,28,24).

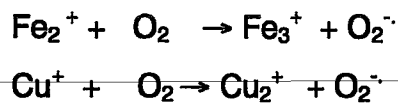
Hidroksil radikali bu grupta en potent serbest radikaldır ve oluşması için ortamda demir veya bakır gibi transizyonel metallerin varlığı gereklidir. Transizyonel bir metal tarafından katalizlenen bu reaksiyonlar, Fenton reaksiyonları olarak bilinir (23,26,29).



Bir transizyonel metalin varlığında, süperoksit radikali hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek, hidroksil radikalini oluşturur. Bu reaksiyona Haber-Weiss denir (24).



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit meydana getirebilir (24,25).



Hidroksil radikali hücre içinde bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. Diğer serbest radikaller gibi DNA'yı, lipidleri, karbonhidratları ve proteinleri zedeleyebilir (25,30).

Singlet oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur.(24)

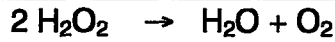
Aerobik metabolizma sırasında hücreler, mitokondrial enzim sitokrom c oksidaz ile moleküler oksijeni suya indirgeyerek enerji elde ederler. Bu reaksiyon sırasında, dört elektron oksijene direkt aktarılır. Çok az miktarda süperoksit, hidrojenperoksit ve hidroksil radikali oluşabilir (31).

Hücrelerin oldukça zararlı olan serbest radikallere karşı savunma mekanizmaları vardır. Süperoksit dismutaz enzimi bunlardan biridir ve süperoksiti hidrojen peroksite indirger (22,23).

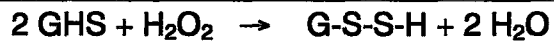


Hidrojen peroksit peroksizomlarda katalaz, mitokondri ve sitoplazmada ise glutatyon peroksidaz ile su ve oksijene indirgenir. Okside olan glutatyon ise glutatyon redüktaz ile glutatyona çevrilir (22,23,24,32).

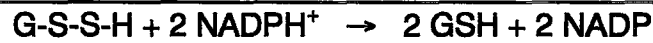
Katalaz



Glutatyon peroksidaz



Glutatyon redüktaz



İkincil savunma mekanizması, hücrelerin transizyonel metalleri taşıyıcı ya da depolamada kullanılan proteinlere sıkıca bağlanmasıdır. Üçüncü yol ise dengeli serbest radikal oluşturmaktır. Bu da α -tokoferol (vitamin E) gibi maddeler sayesinde gerçekleştirilir (22,23,24,32,33).

İskemide oksijen yeterli seviyede değildir. İç mitokondrial membranın elektron transfer zinciri, oksijen eksikliği nedeni ile aşırı indirgenmiş hale gelir. Ayrıca artan enerji ihtiyacı yüzünden, mitokondride solunum ihtiyacı artar ve hızla serbest radikaller oluşur. İskemi sırasında artan Ca^{++} mitokondride hidroksil radikali oluşumuna neden olur (31).

Eksitotoksisite de mitokondriden serbest radikal oluşumunu artırır. İlk olarak depolarizasyon, ATP ihtiyacını artırır ve oksijenin sınırlı olduğu ortamda, mitokondrial solunum hızlanır. İkinci olarak hücre içi Ca^{++} artışına neden olarak, mitokondri üzerinde yükü artırırlar. Böylece artan reaktif oksijen türleri mitokondri DNA'sı, lipidleri ve proteinlerini zedeleyebilirler (34).

Serbest radikaller, protein, nükleik asit, lipid ve ekstrasellüler matris glikozaminoglikanları gibi moleküllerin üzerine etkiyerek, parçalanmalarına sebep olur. Bu moleküller özellikle merkezi sinir sisteminde bulunmaktadır. Sülfür taşıyan amino asitler ve çok doymuş yağ asitleri özellikle hasara yatkındırlar. Yağ asitlerinin, karbon-karbon çift bağlarına bitişik olan alfa metilen karbonları, serbest radikallere oldukça duyarlıdır. Her bir molekülünde bir çok çift bağa sahip olan çok doymuş yağ asitleri, serbest radikal hasarına özellikle duyarlıdırlar (26).

1.2.2.Reperfüzyon

Trombolitik tedavinin inmeli hastalarda kullanılmaya başlaması ile reperfüzyon hasarı ve sonuçları gündeme gelmiştir. Serebral iskeminin patofizyolojisinde kan beyin bariyerinin bütünlüğünün bozulması önemli rol oynamaktadır. Bir yandan enfarkt alanı reperfüzyon ile küçülürken diğer yandan ödem oluşumunu arttırabilir. Yapılan çalışmalar sonunda, reperfüzyonu takip eden dönemde, kan beyin bariyerinin kalıcı oklüzyona göre belirgin bozulduğu saptanmıştır (35). Reperfüzyon ile birlikte yeniden oksijen sağlanması, serbest radikal oluşumunda artışa neden olur. Bu ortamda fazla miktarda oluşan süperoksit ve NO radikali reaksiyona girerek peroksinitrit oluşmasına ve endotelial hücre hasarı ile kan beyin bariyerinin bozulmasına yol açabilir (24,27,36).

Reperfüzyon ile iskemi sırasında depolanan araşidonik asit, lipoksijenaz ve siklooksijenaz yolları ile prostaglandin, tromboksan ve süperoksit oluşumuna neden olur (Şekil 4) (9). İskemi sırasında beyinde, adenin nükleotitlerin, nükleositler ve pürin bazlarına dönüştüğü bilinmektedir. Adenozin ve hipoksantin seviyeleri hızla yükselir. Resirkülasyon ile ksantin oksidaz enzimi, hipoksantini ksantine, sonra da

üreye çevirir. Bu enzimin hızının reperfüzyonda arttığı bilinmektedir. Ksantin oksidaz enzimi, hipoksantini ksantine dönüştürürken, moleküler oksijen kullanır ve süperoksit ortaya çıkmasına neden olur (şekil 4) (23). Artmış hücre içi Ca^{++} bir proteaz olan kalpaini aktive eder. Bu enzim, ksantin dehidrogenazdan bir peptit yapının ayrılması ile vasküler endotelde ksantin oksidaza dönüşmesini sağlar. Böylece serbest radikal yapımı artar (8,9).

Reperfüzyon sırasında süperoksit radikalinin etkisi ile beyinde ferritin ve transferrin halinde bulunan demir serbestleşmekte ve katalitik etkisi ile hidroksil radikali oluşmaktadır. Bu radikaller de hücre hasarına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucu iskemi ve reperfüzyon ile beyaz kürelerin iskemik dokuya geçtiği gözlenmiştir. Endotel hücrelerinin, serbest radikal hasarından en çok etkilenen bölge olduğu düşünülmektedir (35).

Yapılan iskemi-reperfüzyon modellerinde, kan akımının geri dönme süresine göre hücrelerin kurtarılıp, kurtarılamayacağı görülmek istenmiştir. Sonuç olarak 15 dk'lık iskemi ile, nörolojik ve histolojik bulgu görülmezken iskemi süresi 30 dakikaya çıkarıldığında subkortikal lezyon tespit edilebilmektedir (35-38).

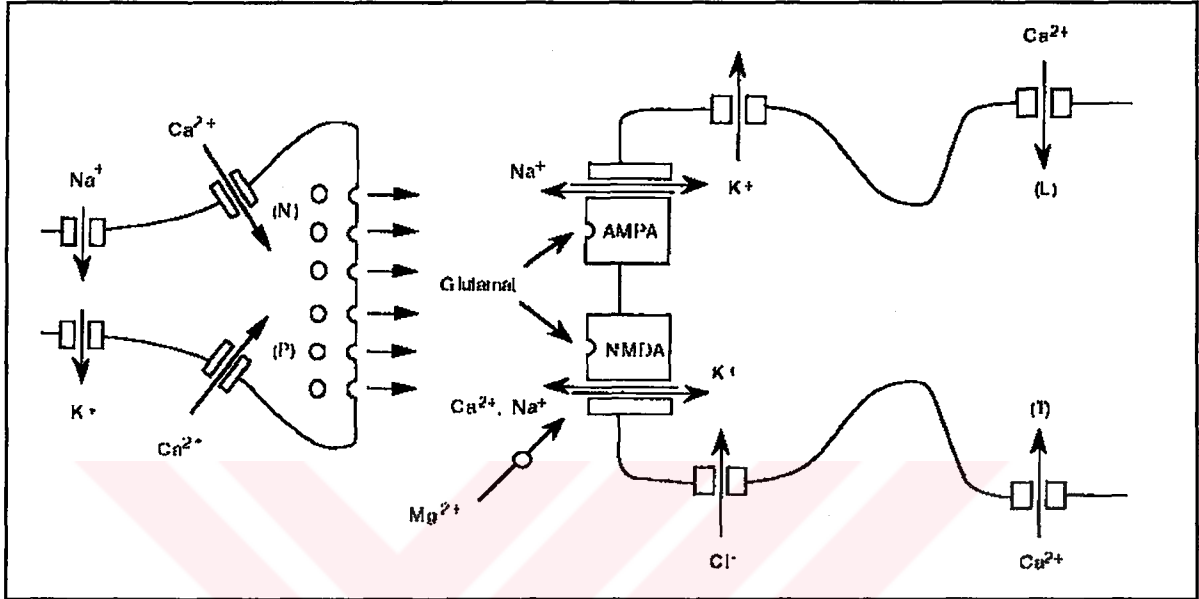
Hayvan deneylerinde kedi ve maymunlarda 4-8 saatlik iskemi sonrası tam oklüzyona bağlı enfarkt elde edilirken, sıçanlar için bu sürenin 3 saat kadar olduğu gözlenmiştir (37,38).

1.3 EKŞİTOKSİSİTE

1.3.1 Glutamat ekşitotoksisitesi

İlk olarak 1969 yılında Olney ve Sharp, ekşitör bir amino asit olan glutamatın, nöronlar üzerinde toksik etki oluşturabileceğini öne sürerek ekşitotoksisite kavramını tanımlamışlardır(39). İn-vivo ve in-vitro yapılan deneyler sonucu, fazla miktarlarda ekşitör amino asit ve analoglarının nörodejenerasyona neden olduğu bilinmektedir(6,10,40,41). Serebral iskemi sırasında glutamat ve aspartatın, ekstrasellüler seviyelerinin yüksek bulunması, iskemi sırasında ekşitotoksisitenin önemli olacağını düşündürmüştür(42). Bunu takip eden çalışmalarda ise N-metil-D-aspartat (NMDA) ve non-NMDA tipi glutamat reseptör antagonistlerinin, enfarkt hacmini azalttıkları saptanmıştır (6,43,44,45). Böylece, ekşitotoksisitenin serebral iskemide rolü olabileceği saptanmıştır .

Na^+ iletkenliğinin aktivasyonundan dolayı oluşan presinaptik depolarizasyon, sinir terminallerine ulaştığında, voltaja duyarlı Ca^{++} kanallarından (VSCC) Ca^{++} girişi, EAA'lerin salınmasına sebep olmaktadır. Postsinaptik membranların dendrit ve somalarında başlıca, T ve L tipi kanallar bulunurken, VSCC muhtemelen N tipi kanalları içermektedir (Şekil 3) (6,7,46).



Şekil 3: Pre- ve postsinaptik iyon kanallarının şematik olarak gösterilmesi.

Bununla birlikte, EAA'ler, Na^+ gradient ve membran potansiyeliyle yönlendirilen, elektrojenik $2\text{Na}^+ / \text{Glutamat}^-$ kotransportuyla Ca^{++} girişinden bağımsız olarak da salınabilmektedir. Eğer iskemide olduğu gibi, Na^+ gradienti bozular ve membran depolarize olursa, EAA'lerin salınımı katalizlenir (6).

Glutamat reseptörleriyle, iyon kanallarının uyarılmasını izleyerek, postsinaptik membrandan Na^+ girişi meydana gelir. EAA'ler, agonistlerine bağlı olarak 5 kategoride sınıflandırılır. Bunlar; yüksek ve düşük affiniteli kainat, amino -3-hidroksi -5- metil -4- isoazol propiyonik asit (AMPA), N-metil-D-aspartat (NMDA) ve kiskalat reseptörleridir. Bunlardan ilk 4'ü iyon kanalları aracılığıyla etki ettiklerinden iyonotropiktir (6,7).

Glutamat, presinaptik sinir uçlarından salındığında AMPA ve NMDA reseptörlerinin her ikisini de uyarır. AMPA reseptörü Na^+ , K^+ ve olasılıkla da H^+ katyon kanallarına bağlanarak etkisini gösterir. Na^+ 'un hücre içine girmesi depolarizasyona neden olur. Glutamat reseptör kapılarının alt tipi olan

NMDA, monovalan katyon ve kalsiyumun her ikisine de geçirgendir. Kanal normalde Mg^{++} ile kapatılmıştır, fakat membranın depolarizasyonu bu blokajdan kurtulur (47,48,49). AMPA reseptör bağımlı kanallar yoluyla Na^+ girişi depolarizasyona sebep olur, böylece NMDA kanalları yoluyla kalsiyum girişini sağlar. Na^+ girişiyle meydana gelen depolarizasyon, L ve T tipi VSCC'ler arasından Ca^{++} girişini sağlar. Buna ilave giriş yolu $3Na^+/Ca^{++}$ değiştiricisidir. Böylece Na^+ gradienti ve/veya depolarizasyonun azalması Ca^{++} girişini kapatan değiştiriciyi tersine çevirebilir. $3Na^+/Ca^{++}$ değişimini tersine çevirmek için gereksinim duyulan Na^+ gradientindeki azalma intrasellüler asidoz ile uyarılan Na^+/H^+ değişiminin sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Kısacası, glutamat reseptörlerinin aktivasyonu multiple kalsiyum iletimi üzerinden etkisini gösterir. EAA'lerin salınımı ve iyonotropik glutamat reseptörlerinin aktifleşmesi bir çok iyonla karşı membran geçirgenliğinin artışına sebep olur (6,7,50).

Reseptörlerin glutamat ile aktivasyonunu içeren eksitator olayları, Ca^{++} girişi izler. Eksitator olayların sonlandırılması ve EAA'lerin geri alınması, inhibitör mekanizmalarla sağlanır. Hiperpolarize membrana dikkat edildiğinde, inhibisyon başlıca iyon akışı ile sağlanır. Genelde K^+ veya Cl^- iletiminin aktivasyonunu inhibisyon izler. Bu Cl^- iletimindeki artış, membran potansiyelinin normal değerlere kadar kapanmasına sebep olurken, K^+ çıkışı da membranları hiperpolarize yapmaktadır. Inhibitör kontrolün K^+ iletiminin aktivasyonu ile olduğu görülmektedir. Önce K^+ kanalları açılır ve pozitif iyon yükü hücreyi terk eder ve membran hiperpolarize olur (51).

Eksitator amino asitler ve bunların analogları, NMDA ve non-NMDA reseptörlerini aktive ederek hücre içine sodyum, klorür iyonları ve su girmesi ile hızlı şişmeye neden olmaktadır(8,20). Gecikmiş hücre ölümü ise NMDA reseptörlerinin aşırı uyarılması ve buna bağlı ortaya çıkan Ca^{++} akışı ile olmaktadır(52). Glutamata kısa fakat yoğun maruz kalınması, NMDA reseptörlerine bağlı mekanizmalar ile gecikmiş hücre ölümüne neden olur (53). Fosfolipaz A_2 ve kalpain gibi Ca^{++} 'a bağlı enzimlerin aktivasyonu ve serbest radikal üretimi de bu süreçte rol alır (9,31,54,55). Intrasellüler Ca^{++} 'un genel artışı, her zaman hücre ölümüne neden olmadığı için, NMDA reseptörleri çevresinde lokalize artışların, nitrik oksit sentatazın aşırı uyarılmasına neden olduğu ve böylece ölümcül olayların tetiklendiği düşünülmektedir (55). NMDA'ya bağlı nöronal toksisitenin, kısmen NOS inhibitörleri ile bloke edilmesi ve nöronal NOS ekspresyonu olmayan nöronların NMDA toksisitesine daha dayanıklı olmaları ise bu görüşü desteklemektedir (56,57).

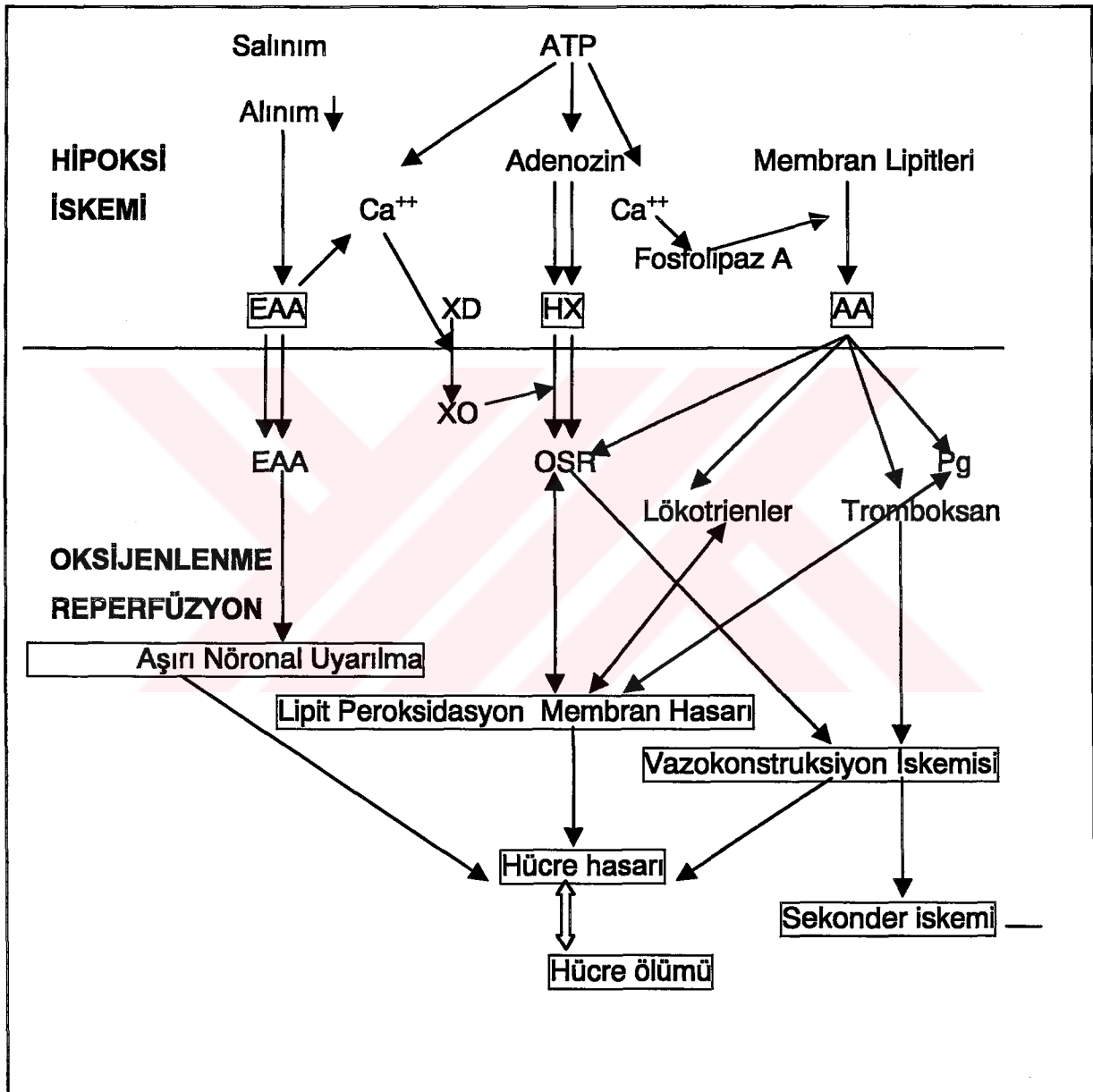
NMDA'ya bağlı hücre ölümünün tersine alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit (AMPA) / Kainat (non NMDA) reseptörlerinin nöron ölümüne neden olabilmesi için uzun süre uyarılması gerekmektedir (58). Bu süreçte AMPA / Kainate'a bağlı Ca^{++} kanalları aracılığı ile hücre içine giren Ca^{++} rol oynayabilir (10,60). İskemi sırasında artan asidite, NMDA reseptör aşırı uyarılmasını inhibe ederken, iskemi sonucu oluşan depolarizasyon NMDA reseptör aktivasyonunu artırır (59). In-vivo ve in-vitro iskemi sırasında NMDA akımlarının hızla kaybolduğu gösterilmiştir (61). Ancak NMDA reseptörlerinin inaktif hale geçmeden önce, artmış glutamata maruz kalmaları, enerji yoksunluğu olan bu ortamda, hücre ölümüne neden olan olayları başlatmaya yeterli olabilmektedir. Bununla birlikte penumbra bölgesinde NMDA reseptörlerinin uyarılma süresi daha uzundur (62,63). Hayvan modellerinde yapılan deneylerde, NMDA tip reseptör antagonistlerinin ve Ca^{++} kanal blokerlerinin, bu nedenle iskemik doku miktarını azalttığı düşünölmektedir. Ancak bu maddeler asiditenin fazla olduğu global iskemi modellerinde daha az etkili olmuşlardır (64,65). Tüm bunlar penumbra bölgesinde eksitotoksik hasarın önemini ortaya koymuştur. Son zamanlarda perienfarkt bölgelerde ortaya çıkan tekrarlayıcı "spreading depresyonun", dokuları sistemli eksitotoksik strese maruz bırakabileceği öne sürölmüştür (63). Çok kısa süreli glutamata maruz kalmanın, hücre ölümüne neden olan olayları başlatması nedeni ile reseptör antagonistleri yerine, reseptör bağlanmasını takiben ortaya çıkan olayları bloke eden ajanların daha etkili olabileceği düşünölebilir.

1.3.2. Ca^{++} Sitotoksitesisi

Hücre içine kalsiyum girişinin artışına karşın çıkışının azalması, sellöler Ca^{++} homeostazisinin bozulduğunu göstermektedir. İskemi sırasında hücredeki enerji tükendiğinden sitoplazmada ve mitokondride aşırı miktarda kalsiyum birikmektedir ve kalsiyumun toksik etkisini göstermesine sebep olmaktadır (9,64). İskemi sırasında intrasellöler Ca^{++} 100nM'dan 30 μ M'a kadar yükselir (66,67).

Fizyolojik koşullarda hücre içinde biriken fazla Ca^{++} dışarı atılarak ya da hücre içinde depolanarak tolere edilir. Ancak iskemi sırasında enerji eksikliği nedeniyle pompalar ve depolama mekanizmaları iflas eder ve artan Ca^{++} seviyesi fosfolipazları, proteazları, endonökleazları aktive ederek, serbest radikal ve serbest yağ asitlerinin oluşumunu artırır ve hücre ölümünü tetikler (10,23,31,54,64,68). Serbest radikal üretimi ise Ca^{++} depolamasını engelleyerek bir kısır döngüye neden

olur. Yine Ca^{++} 'un mitokondrial zardan artan giriş ve çıkışı enerji azlığında, sınırdan olan mitokondrial fonksiyonların daha çok bozulmasına ve serbest radikal üretiminde artışa neden olmaktadır (69). Vasküler döz kaslara Ca^{++} girişi vazokonstrüktör prostanoidlere ilave etki yaparak, reperfüzyon sırasında kan akımını dözürür (10). şekil 4' de, asfiksi sonrası beyin hasarında Ca^{++} iyon intoksikasyonunun ateşlediği çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir (5,10,70).



şekil 4: Sekonder nöronal ölümün etkileşim mekanizması. EAA: Eksitator Amino asit. HX: Hipoksantin. AA: Araşidonik asit. OSR: Oksijenden oluşan serbest radikaller. Pg= Prostaglandinler. XD ve XO: Ksantin dehidrogenaz ve oksidaz.

1.3.3 Asidoz

Glikoliz ve oksidatif fosforilasyon arasındaki dengesizlik, iskemi sırasında intrasellüler ve ekstrasellüler pH'daki azalmanın en büyük nedenidir. Aerobik şartlarda glikoz, enzimatik basamaklar serisiyle 2 M pirüvata yıkılır. Bu reaksiyonlar sırasında nikotinamid adenin dinükleotid'in okside şekli azalır. 2M ADP ve intrasellüler fosforlar 2M ATP oluştururlar. Oksijenin varlığında, pirüvat ilk olarak pürüvat dehidrogenaz ile metabolize olur ve daha sonra bir seri mitokondrial reaksiyon sonucu 36 Mol ATP ile CO₂ (ve H₂O) oluşturur. Bu, hücreye maksimum ATP kazandırır (9).

Hipoksi/ iskemi, pürüvatın oksidasyonunu engeller, geciktirir ve laktata redüksiyonuna neden olur. Glikoliz sırasında yapılan 2 ATP, ADP ve intrasellüler fosforlara hidrolize olduğunda, 1M glikozun aneorobik metabolizması sonucu laktat ve H⁺'nin her birinden ikişer molar oluşmasına neden olur. Aerobik-aneorobik glükolizin dezavantajı ATP üretiminin azalması ve hücrenin asidik bir hal almasıdır (71,72).

Asidozun şiddeti, iskemi öncesi plazma glikoz konsantrasyonuna bağlıdır (9). Tam veya tama yakın global veya ön beyin iskemisinde, intrasellüler pH 6.2-6.4 değerine kadar düşer (71,72,73) Bu düşme, hiperglisemik sıçanlarda daha fazladır(73). Orta serebral arter (OCA) oklüzyonundan dolayı oluşan iskemide, asidozun derecesinin daha az olduğu bildirilmiştir. Fakat kan akışının az olduğu lezyonun merkezinde, asidozun derecesi daha fazladır (74). Laktik asidozun şiddetinin belirlenmesi, iki faktörün kontrolü altındadır. Bunlar; ATP bozukluğunun derecesi ve ortamda karbonhidrat substratının bulunmasıdır. Kan akımının azaldığı iskemide, glikoz sağlanması laktik asit üretimi için sınırlıdır; eğer hiperglisemi ile glikoz sağlanması artarsa, asidoz da artmaktadır. Bununla birlikte, diğer önemli belirleyici hücrenin ATP konsantrasyonudur (9,75).

1.3.4 Dopamin ve serotonin eksitotoksitesisi

İskemi esnasında, glutamatın yanısıra birçok nörotransmitter daha sinaptik aralığa salınmakta ve temelde aynı yollar üzerinden zararlayıcı etki göstermektedirler (76,77,78).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, özellikle monoaminlerin bu süreçteki rolüne değinmiş ve iskemik hasarlanmada multiple eksitotoksisiteyi tekrar gündeme getirmiştir (78,79). Globus ve arkadaşları, iskemi esnasında glutamatın 7 kat, dopaminin ise 500 kat oranında sinaptik aralığa salındığını göstermişlerdir (80). Yine diğer yapılan mikrodializ çalışmaları da glutamatın ve dopaminin yanısıra, başta serotonin olmak üzere adenoze, gammaaminobutirik asit, dopamin, glisine, norepinephrine ve 5-hidroksitriptamine(5HTA) gibi birçok diğer nörotransmitterin belirgin oranda artıklarına işaret etmiştir (80,81-86). Serotonin reseptörlerinin birçok alt subtipi beyin parankiminde ve damarlarında yaygın bir dağılım göstermektedirler (87).

İskemi esnasında başta dorsal hipokampus ve dorsolateral striatum olmak üzere, anlamlı miktarlarda salınan serotonin gerek beyin parankimi üzerinden başta glutamatın postsinaptik eksitator etkilerini module etmek suretiyle, gerekse damarlar üzerindeki direkt konstriktör etkisi ile iskemik hasarlanmayı artırıcı etki göstermektedir (88-91,92,93).

Bir başka deneysel çalışmada, serotoninin motor nöronları eksite edici etkisini gösterilmiş ayrıca neokortekste diğer eksitator nörotransmitterlerin etkilerini arttırdığına ilişkin veri desteklenmiştir (94).

Diğer bir elektrofizyolojik çalışmada ise; 5HT 'in 5HT2\1c,5HT3 yada 5HT4 reseptörleri aracılığı ile nöronları depolarize edebildiğini, fakat 5HT1a reseptör aktivasyonunun nöronal hiperpolarizasyona yol açtığını göstermiştir (95). Serotoninin etkilerini bloke etmeye yönelik reseptör antagonistleri ile yapılan çalışmalar, bu konuya açıklık getirmiş ve serotoninin 5HT2 reseptörleri üzerinden gösterdiği vazomotor etkisinin bloke edilmesi, nöroproteksiyon sağladığı gibi, 5HT 1 reseptörleri üzerinden gösterilen presinaptik glutamaterjik inhibitör etkinin de, spesifik 5HT 1 antagonistleri ile blokajı nöroprotektif etkiyi ortadan kaldırmıştır (91,96-98). Yine yapılan çalışmalarda, elektrofizyolojik çalışmalarla uyumlu olarak, 5HT 3 reseptörlerinin stimüle edilmesinin iskemiye artırıcı edici etki göstermesi ve bu etkinin spesifik antagonistlerle engellenebilmesi, 5HT 3 antagonistlerinin direkt nöroprotektif etkisi olduğu görüşünü desteklemiştir (99).

İskemi esnasında bir diğer salınan önemli nörotransmitter de dopamindir (80,81,88,100,101). Özellikle serebral korteks striatum ve hipokampus gibi bölgelerde artan dopamin, iskemiye direkt artırıcı etkisi yanısıra, transient iskemik atağı irreversible nörolojik hasara kadar götürebilecek nörobiyolojik mekanizmaları

tetikleyebilmektedir (102,103). Yine yapılan çalışmalarda, iskemiden önce dopamin içeren nöronların destrüksiyonu sonucunda iskemik hasar belirgin olarak azaltılmıştır (89,91). İskemi esnasında aşırı miktarda salınan bu monoaminlerin metabolitlerinin, nörotoksik etki yanısıra, kendilerinin glutamaterjik sistem üzerinden olan etkileri ile nöronları apoptoz ve\veya nekroza götürdüğü öne sürülmüştür (103). Merkezi sinir sisteminde özellikle iskemiye hassas olan bölgelerde, yoğun dopaminerjik innervasyonun olması, bu bölgedeki reseptör subtiplerinin spesifik antagonistlerle blokajının, iskemi üzerine olan etkisini araştırmaya açmıştır (104). D1 reseptörlerinin stimülasyonu ile, iskemiye agreve edici etki, antagonistlerle ortadan kaldırılabılırken (105), D2-D3 reseptörlerinin stimülasyonu ise direkt protektif etki göstermiştir (106-109). Bu protektif etki, serotonin reseptörlerinde olduğu gibi presinaptik glutamaterjik inhibisyona bağlıdır ki, bu etki yine spesifik D2 –D3 reseptör antagonistleri ile ortadan kaldırılmıştır.

Atipik antipsikotik ajanlar son zamanlarda klinik psikiyatride gittikçe kullanım alanı artan ve özellikle değişik nörotransmitterler üzerinden gösterdikleri etkileri nedeniyle, şizofreni hastalığının negatif semptomlarının ve kognitif disfonksiyonunun giderilmesi için kullanılan ajanlardır (110). Özellikle diğer antipsikotiklere göre daha az motor yan etki profili, farklı dopamin ve serotonin reseptör alt tipleri üzerinden gösterdikleri etkileri nedeniyle diğer antipsikotiklerden ayrılırlar (111-114)(Tablo 1). Özellikle son zamanlarda olanzapin ve risperidonun, erken ve uzun süre kullanımının daha iyi klinik sonuçlarla korelasyon gösterdiği bilinmektedir (115,116,117).

Olanzapin, thienobenzodiazepine derivesi olan yeni bir antipsikotik ajandır. İnvitro ve invivo çalışmaları, olanzapinin özellikle serotonin (5-HT₂), dopamine (D₁/D₂/D₄), muskarinik (m₁–m₅), adrenerjik (α₁), ve histamine (H₁) reseptörleri üzerinden etki gösterdiğini desteklemiştir. Özellikle D₁,D₂ ve 5HT₂ reseptörleri üzerine güçlü antagonistik etki gösteren olanzapinin,histamin ve muskarinik reseptörler üzerine olan etkisi de oldukça güçlüdür (114). Yarılanma ömrü sağlıklı insanlarda ortalama 33 saat olmakla birlikte, fare ve maymunlarda 3 saattir (113,118).

	Olanzapin	Risperidon
Reseptör affinitesi		
D ₁	2+	2+
D ₂	2+	2+
5HT ₁	0	1+
5HT ₂	2+	3+
α ₁ adrenoceptor	2+	3+
α ₂ adrenoceptor	1+	3+
H ₁	3+	1+
M ₁	3+	0
Diğer karakteristikler	Belirgin D ₃ , D ₄ , 5HT ₃ , 5HT ₆	Yüksek dozlarda ekstrapiramidal sendrom
Yan etkiler	Ağız kuruluğu, bulantı, kilo alımı	Hipotansiyon, sedasyon, prolaktin artışı
Doz aralığı (mg/gün)	7.5-20	300-900

Tablo 1: Olanzapin ve Risperidonun farklı reseptör affiniteleri ve diğer karakteristik özellikleri ile başlıca yan etkileri

Risperidon ise benzisoxazol derivesi olan 2.kuşak yeni antipsikotik bir ajandır. Serotonin (5-hydroxytryptamine) 5-HT₂ ve dopamine D₂ reseptörleri üzerine gösterdikleri potent antagonist etki yanısıra, serotonin 5 HT 1c ,1d,1a ve dopamine D₁ reseptör subtipleri ile serotonin 5 HT 1b , 5 HT₃, β adrenerjik, muskarinik ve peptiderjik reseptörler üzerine de relatif düşük affiniteleri mevcuttur. Temel etkisini kendisi ve ana metaboliti olan 9 – OH Risperidon aracılığı ile göstermektedir. Plasma yarılanma ömrü insanlarda Risperidon için 3 saat olmakla birlikte, 9 OH risperidon için 23 ile 30 saat arasında değişmektedir. Bu değer farelerde ortalama 30 dakika ile 3 saat arasındadır (112).

Her iki ajan da oldukça lipofilik olup oral veya intraperitoneal uygulanımı takiben 1-2 saat içerisinde plazma pik konsantrasyonlarına ulaşabilmektedirler (112,113).

Beyinde, özellikle striatum ve frontal korteks gibi bölgelerde dağılım gösteren (119) bu ajanların, beyindeki eliminasyon yarılanma ömürleri, plazma ömrünün yaklaşık 3 –5 katı arasında değişmektedir. Bu iki ajanın bir diğer ilginç özelliği, 5HT 1a reseptörlerine gösterdikleri selektif agonist etki nedeniyle kortikal dopamin ve serotonin düzeylerini anlamlı şekilde değiştirebilmeleridir ki zaten bu özellikleri psikozlara bağlı kognitif yıkımın tedavisinde temel etki basamaklarından birisini oluşturmaktadır (110).

Sonuç olarak her iki ajan da, reseptörler üzerine gösterdikleri farklı agonist-antagonist etki ve daha az yan etki profili sebebiyle psikiyatride tercih edilen ajanlardır. Özellikle son zamanlarda erken ve uzun süreli kullanımlarının daha iyi klinik sonuçlar vermesi üzerine bu iki ilacın, olası nöroprotektif etkileri gündeme gelmiştir.

İskemi patofizyolojisinde, yukarıda adı geçen birçok nörotransmitterin, survey üzerine anlamlı etkisi olması ve yine bu ajanların iskemi için oldukça hassas diyebileceğimiz reseptör subtipleri ile iskemik hasarın gelişimi açısından oldukça kritik bir zaman diliminde etkileşime girebilmeleri, bu konuda birçok moleküler çalışmanın yapılmasına temel teşkil etmiştir.

2.MATERYAL VE METOT

2.1. Deney Hayvanları ve Grupları

Bu çalışmada, Göttingen Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan araştırma ve Geliştirme Merkezinden temin edilen 21-25 gram ağırlığında toplam 39 adet C57BL/6j erkek fare kullanıldı. Fareler üzerindeki deneysel çalışmalar, Göttingen Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Max Planck Enstitüsünün Moleküler Nörobijoloji Laboratuvarında yapıldı. Fareler deney öncesinde 18- 21 °C oda sıcaklığı ve diüurnal ışık şartlarında (12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık) tutuldular. Fareler, deney yapılmadan bir gece önce, su içmelerine izin verilerek aç bırakıldılar. Farelere deneysel işlemin uygulanması, bakımları ve barındırılmaları enstitü kurallarına uygun bir şekilde yapıldı.

Çalışmada kullanılan fareler 5 gruba ayrıldı.

Tüm gruptaki farelere kalıcı fokal serebral iskemi uygulandı. Fareler %1 halothan (%30 O₂,%70 N₂O) ile anesteziye edildi ve 24 saat fokal serebral iskemi uygulandı.

1. Grup (A): (n=10, kontrol madde verilen grup): Bu gruptaki fokal kalıcı serebral iskemi uygulanan farelere kontrol madde intraperitoneal yolla verildi.

2. Grup (B): (n=9, Olanzapine 0,1 mg/kg): Bu gruptaki farelere, iskeminin 1.dakikasında 0,1 mg/ kg dozunda olanzapin intraperitoneal yolla verildi.

3. Grup (C): (n=8, Risperidon 0,1 mg/kg): Bu gruptaki farelere, iskeminin 1.dakikasında 0,1 mg/ kg dozunda risperidon intraperitoneal yolla verildi.

4. Grup (D): (n=6, Olanzapin 10 mg/kg): Bu gruptaki farelere, iskeminin 1.dakikasında 10 mg /kg dozunda olanzapin intraperitoneal yolla verildi.

5. Grup (E): (n=6, Risperidon10mg/ kg): Bu gruptaki farelere, iskeminin 1.dakikasında 10 mg /kg dozunda risperidon intraperitoneal verildi.

Risperidon ve olanzapin (Johnson & Johnson ve Lilly Pharmaceutical Research & Development) 0,1 mg/ml olacak şekilde, saf çözülerek stok solüsyon haline getirildi. Az miktarlarda hazırlanan stoklar deneylerin yapıldığı süre boyunca ışık almayacak şekilde 4 °C'de saklandı. Çözeltiler, uygulama öncesi, %0.9 NaCl ile sulandırılarak hazırlandı. Gruplara aynı hacim ve aynı konsantrasyonda eritici olarak kullanılan minimal miktarda laktik asid verildi (51).

2.2. Kalıcı Fokal Serebral İskemi Modeli

Anestezik olarak bütün deneyler sırasında %1 halothan (%30 O₂,%70 N₂O) kullanıldı. Deneyler sırasında fareler spontan solunumlarına devam ettiler. Rektal sıcaklık homeotermik battaniye kontrol ünitesi (Harvard Apparatus) vasıtasıyla 36.5-37.5 °C arasında edilerek sabit tutuldu.

Sağ OCA'in proksimal oklüzyonu, intraluminal filaman yöntemiyle önceden belirlendiği gibi gerçekleştirildi. Deney hayvanları sırt üstü pozisyonda yatırılarak, boynun ortasından açılan insizyondan girilerek, paratrakeal kasların disseksiyonu ile sağ arteria karotis kommunis, karotid bifurkasyon ve internal karotid arter (ICA) ortaya çıkarıldı. Eksternal karotid arter (ECA) 1 mm distalden ve arteria karotis kommunis (CCA) 3 mm proksimalden 5-0 ipek suture ile bağlandı ve OCA'in tıkanması amacıyla ilerletilecek ipin yanlış yöne gitmesini önlemek için 6-0'lık ipekle pterigopalatin arter bağlandı ve bifurkasyonun 1 mm proksimaline 5-0'lık ipek suture lumeni kapatmayacak şekilde gevşek olarak yerleştirildi. ICA'e konulan bir mikrovasküler klipten (Zen temporarı klip, Ohwa Tsusho Co., Ltd.) sonra, bifurkasyonun 2 mm proksimaline mikro makas ile küçük bir insizyon yapıldı. 20 mm uzunluğundaki 4-0'lık prolenin ucu ateşte kütleştirilip, 5 mm'lik uç kısmı cyanoacrylate yapıştırıcısı ile, (PateX) çapı 0.40 mm olacak şekilde kalınlaştırılarak hazırlandı. Naylon filamen, açılan insizyondan damar içinde mikrovasküler klibe kadar ilerletildi. Bu arada kanamayı önlemek için gevşek olarak konulan ipek suture sıkıştırıldı. Daha sonra ICA'deki mikrovasküler klip kaldırılıp, filaman orta serebral arter (OCA) orjinini geçip anterior serebral arterde hafifçe bir rezistans hissedilinceye kadar bifurkasyondan itibaren ortalama 17 mm ilerletildi. Böylece internal karotid ve anterior serebral arterden gelen kan akımı önlenerek OCA sahasında enfarkt meydana getirildi (Şekil 5 ve 6). 24 saat iskemi sonrasında fareler dekapite edilerek beyinleri zaman kaybedilmeden çıkarıldı.

2.3. Serebral Kan Akımı Ölçümü

Fareler sterotaksik cihaza yerleştirildikten sonra, bregmanın 2 mm posterior ve 6 mm laterale dışı turu ile bir hol açıldıktan sonra laser-doppler akım ölçerin (PF-318 of PeriFlux PF 2B, Perimed, Jarfalla, Sweden) probu dura materin üzerinde avasküler bir bölgeye yerleştirildi. İskemi uygulamasının 10 dakika öncesinden başlanılarak, 30.dakikasına kadar bölgesel beyin kan akımı değişiklikleri kaydedildi.(Tablo 2, Şekil 5)

2.4. Enfarkt Alanının Gösterilmesi

İskemi oluşturulduktan 24 saat sonra sıçanlar, dekapite edilip beyinleri hızla çıkartılarak buzlu serum fizyolojik içinde 5 dakika bekletildi. Frontal kutuptan başlayarak, 2 mm kalınlığında 7 kesit elde edildi. Serum fizyolojik ile 2, 3, 5, trifenil tetrazolium klorid monohidrat (TTC) %2'lik solüsyon haline getirildi. Beyin kesitleri oda sıcaklığında, 30 dakika %2'lik TTC solüsyonu içinde inkube edildi. TTC boyaması canlı mitokondriler tarafından alınıp indirgenme esasına dayandığı için (mitokondrial solunum zincirinde dehidrogenazlar tarafından indirgenir) hızla çıkarılan beyin kesitlerinde enfarktli doku, normal dokudan ayırt edilebilmektedir. Normal beyin dokusunun koyu kırmızı renge boyanması ile enfarkt alanının sınırları tespit edildi. Kesitler daha sonra %10'luk formaldehit içinde görüntüleri alınıncaya kadar saklandı.

2.5. Enfarkt Alanının Hesaplanması

TTC ile boyanmış beyin kesitlerinin video kamera (Sony) ile görüntüleri alınarak, görüntü analiz sistemine (NIH image Analyzer) aktarıldı. Bilgisayar ortamında image analyzerın alan hesaplama işlemcisi ile infarkt ve sağlam doku sınırları dikkatli bir şekilde çizildikten sonra yine bu işlemci ile toplam hemisfer alanları hesaplandı. Enfarkt alanı ise direkt sınırlar içine alınıp ölçülmek yerine, kontrolateral hemisferin toplam alanından, ipsilateral normal boyanan alan çıkarılarak hesaplandı. Böylece enfarkt alanı hesabında, ödemin etkisi en aza indirilmiş oldu. Daha sonra alanların herbiri kesit kalınlığı olan 2 mm ile çarpılıp, toplanarak hacim hesabı yapıldı

(37,38).

2.6. Sistemik Kan Basıncı

Nörolojik muayene sonuçlarını daha az etkilemesi nedeniyle, kan basıncı kayıtlarında, kuyruk arterinin kateterizasyonu yolunu seçildi. Fareler ventral tarafları üste gelecek şekilde yatırılıp sabitleştirildikten sonra, operasyon mikroskobu altında kuyruğun vücutla birleşme yerinin 0.5 cm uzaklığında kalacak şekilde, ventral orta hatta 1cm'lik bir insizyon yapıldı. Deri altındaki ventral orta hatta bulunan kuyruk arterine ulaşıncaya kadar, kaslar çok dikkatli bir şekilde ayrıldı. Kuyruk arteri etrafındaki dokulardan ayrıldıktan sonra, proksimaline bir mikro klips, distal tarafına 5-0 ipekle bir ligatür kondu. Kuyruk arteri etrafına 5-0'lık bir ipek ligatür gevşek olarak yerleştirildi. Distale konan ligatür ile yaklaşık 0.75 cm uzağındaki klips arasına, mikrocerrahi makasıyla bir kesit yapıldı ve PE 10 kateter bu ensizyondan klipse kadar ilerletildi. Daha önceden arterin altından geçirilmiş olan ipek, kateter ve arter duvarını birlikte alacak şekilde bağlandı ve iskeminin 10 dakika öncesinden başlanarak postiskeminin 20. dakikasına kadar kan basıncı kayıtları yapıldı.

2.7. Fizyolojik Kan Değerleri

Farelerden, kan gazları (PaO₂, PaCO₂) ve pH tayinleri için, iskeminin 1. saatinde, heparinli hemotokrit tüpü ile kuyruk arterinden kan örnekleri alındı ve hemen laboratuvarında değerlendirildi.

Hematokrit oranlarının belirlenmesi amacıyla, heparinize kapiller tüplere iskeminin 1. saatinde alınan numuneler, mikro santrifüj cihazında 10000 devirde 5 dakika santrifüj edilerek, hematokrit skalasında birim değerler direkt olarak okundu.

2.8. İstatistik Metodlar

Bölgesel kan akımı (rCBF) ve enfarkt hacmi analizi (ANOVA, Statview 4.5) ve post- hoc analizi Fisher'in Protected Least- Significant Difference test (PLSD)'inin kullanılmasıyla yapıldı.

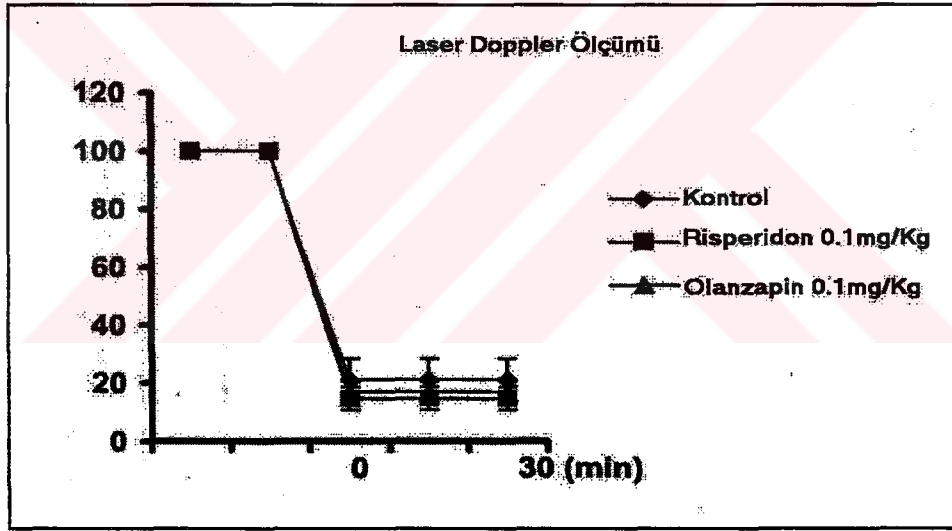
P<0.05 değerleri anlamlı olarak değerlendirildi. Ortalama değerler standart deviasyonlarıyla verildi.

3. BULGULAR

3.1.Fizyolojik Parametreler

Tüm gruplarda, iskeminin 10 dakika öncesinden başlanarak postiskeminin 20. dakikasına kadar sistemik kan basınçları ve orta serebral arter bölgesindeki beyin kan akışı (rCBF) değerleri monitorize edildi (Şekil 5, Tablo 2).

Ortalama arteriyel kan basıncı (OAKB) değerlerinin elde edilmesinde, $OAKB = (2 \times \text{Diastolik basınç} + \text{Sistolik basınç}) / 3$ formülü kullanıldı. Kontrol madde verilen farelerin arteriyel kan basınçları, çalışma gruplardakinden istirahat ve iskemi aşamalarını içeren deney sırasında hafifçe düşük olmasına rağmen, deney grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmadı. Arteriyel kan gazları, pH ve hematokrit değerlerinde, deney grupları arasında önemli bir farklılık bulunmadı.



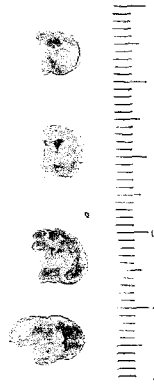
Şekil 5: Laser doppler akım ölçer ile iskeminin kor bölgesi olan parietotemporal korteksten ölçülen kan akımını permanent iskemi sırasındaki % olarak şeması

Kullanılan ilac	Preiskemi LDF degeri	Postiskemi LDF degeri
Kontrol 1	120	8
Kontrol 2	100	16
Kontrol 3	180	18
Kontrol 4	176	20
Kontrol 5	167	17
Kontrol 6	134	13
Kontrol 7	122	12
Kontrol 8	100	20
Kontrol 9	30	2
Kontrol 10	123	10
Risperidon 0,1 mg/kg-1	90	10
Risperidon 0,1 mg/kg-2	50	3
Risperidon 0,1 mg/kg-3	34	7
Risperidon 0,1 mg/kg-4	135	20
Risperidon 0,1 mg/kg-5	55	8
Risperidon 0,1 mg/kg-6	61	11
Risperidon 0,1 mg/kg-7	80	8
Risperidon 0,1 mg/kg-8	140	17
Olanzapine 0,1mg/kg-1	62	8
Olanzapine 0,1mg/kg-2	140	10
Olanzapine 0,1mg/kg-3	45	5
Olanzapine 0,1mg/kg-4	56	3
Olanzapine 0,1mg/kg-5	126	10
Olanzapine 0,1mg/kg-6	132	13
Olanzapine 0,1mg/kg-7	120	10
Olanzapine 0,1mg/kg-8	73	5
Olanzapine 0,1mg/kg-9	43	2
Risperidon 10 mg/kg-1	40	7
Risperidon 10 mg/kg-2	31	5
Risperidon 10 mg/kg-3	40	8
Risperidon 10 mg/kg-4	56	3 EKS
Risperidon 10 mg/kg-5	100	16 EKS
Risperidon 10 mg/kg-6	145	12 EKS
Risperidon 10 mg/kg-7	67	1 EKS

Tablo 2: Protaktif grup ile kontrol grubunun preiskemik(10. dakika) ve postiskemik (30.dakika) LDF verileri (LDF:Laser Doppler akımı)

3.2. Enfarkt Hacmi

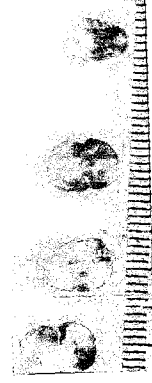
0.1 mg/kg olanzapin ve risperidon, farelere uygulanan permanent serebral iskemi sonrasında, enfarkt hacminde önemli bir azalışa sebep oldu. 24 saat OCA oklüzyonu yapılan kontrol farelerde enfarkt hacmi $81,86 \pm 16 \text{ mm}^3$ iken, olanzapin 0,1 mg/kg yapılan farelerde $47,06 \text{ mm}^3 \pm 13$, risperidon 0,1 mg/kg verilen farelerde ise $43,56 \pm 12 \text{ mm}^3$ olarak ölçüldü. İskemi yapılmasının hemen öncesinde, farelere 0,1mg/kg dozunda olanzapin veya risperidon uygulaması, kontrol grubu farelerle karşılaştırılabilir derecede enfarkt hacminde azalmaya sebep oldu ($p=0,023$). Enfarkt hacimleri, iskemi yapılmasının hemen sonrasında risperidon 10 mg/kg uygulandığında $40,8 \pm 66$ iken, 10 mg/kg olanzapin uygulandığında $81,75 \pm 58 \text{ mm}^3$ olarak hesaplandı. Risperidon 10 mg/kg verdiğimiz farelerin %50 si iskemi sonrası 12 saat içerisinde risperidonun muhtemel yüksek doz kardiovasküler kollaps yan etkisinden dolayı öldüler. Olanzapine 10 mg/kg dozunda ise herhangi bir yan etki gözlenmedi. Bununla birlikte, risperidon ve olanzapinin 0,1 mg /kg'lık değerleri kontrol gruplu farelerin ($81,86 \pm 16 \text{ mm}^3$) ortalama enfarkt hacimlerinden istatistiksel olarak anlamlı olacak bir şekilde küçük olduğu halde ($p < 0.05$), olanzapinin 10 mg/kg değerleri ($81,75 \pm 58 \text{ mm}^3$) kontrollerden istatistiksel olarak farklı değildi. ($p=0,092$) Bunun yanısıra risperidon ve olanzapinin protektif dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 7).



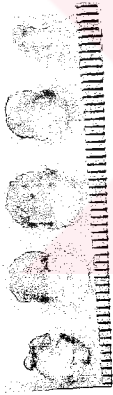
kontrol



*risperidone 0,1 mg /kg



*olanzapine 0,1mg/kg



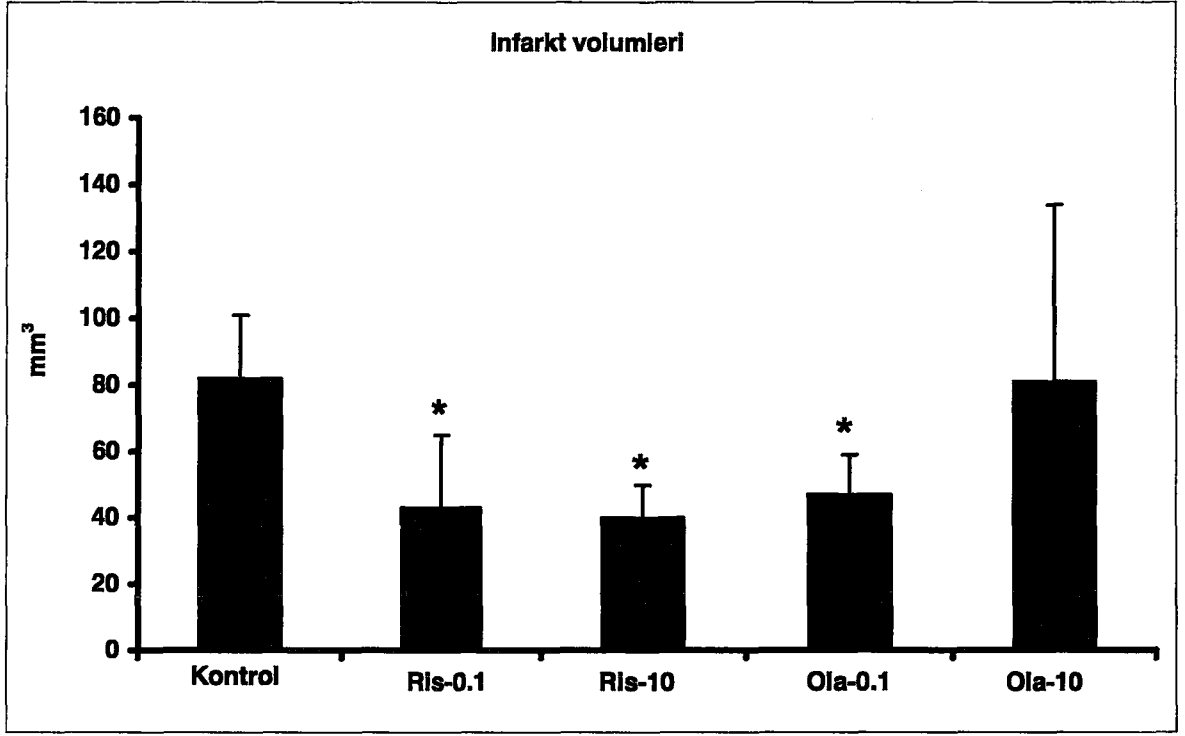
olanzapine 10mg/kg



*risperidon 10 mg/kg

Şekil 6: Tüm gruplarda frontal uçtan itibaren 2 mm kalınlığında alınan kesitler görülmektedir. Enfarkt alanları TTC ile boyanmayan beyaz alanlardır.

*anlamli nöroproteksiyon($p<0.05$)



Şekil 7: Kontrol grubu ve Risperidon ve olanzapin uygulanmış farelerin 24 saat iskemi uygulanması sonrasındaki enfarkt hacimleri. x aksisinde görüldüğü gibi risperidon ve olanzapin 0,1 veya 10 mg/kg dozunda uygulandı. Farelerin kontrol grubuyla karşılaştırılması (ilk dolu sütun).

*: $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada fokal serebral iskemi, orta serebral arterin intraluminal filaman yöntemiyle tıkanması ile oluşturuldu. Yöntem, uygulanmasının kolay olması, tekrar edilebilir sonuçlar oluşturması ve reperfüzyon çalışmalarına diğer yöntemlere göre daha uygun olması nedeni ile tercih edildi. Daha önceleri orta serebral arterin (OCA) proksimal veya distalinin mikrovasküler klip ile tıkanması ile fokal serebral iskemi oluşturulması sıkça kullanılmıştır. Fakat OCA'den ayrılan damarların yerlerinin gösterdiği varyasyonlardan dolayı ve cerrahi yöntemin zor olması nedeni ile, intraluminal filaman metodu, pek çok laboratuvar tarafından tercih edilmektedir.

Bu çalışmada anestezi olarak halothan, % 1 konsantrasyonunda kullanılmıştır.

Beyinde hiperkapniye cevap olarak, kan akımında artış gözlenmektedir. Beyine gelen kan miktarının artması ise, kafa içi basıncın artması gibi etki ederek iskeminin şiddetini artırır. Kan pH'sındaki düşme, hayvanlarda kalp aritmisine neden olmakta ve bunun sonucunda da kalp atım hacminin bozulması, beyin iskemisinin yol açtığı hasarı daha da ağırlaştırmaktadır. Bu çalışmada, iskeminin 1. saatinde yapılan kan gazları ve kan pH'sı ölçümlerinde gruplar arasında bir farklılığın olmaması, bu parametrelerin enfarkt hacmini etkilemediğini göstermektedir.

Geçici beyin iskemisi sırasında ve hemen sonrasında beyin sıcaklığındaki küçük farklılıkların nörolojik ve nöropatolojik bulguları etkilediği gösterilmiştir (120). Busto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalara göre, beyin sıcaklığı iskemi sırasında 33 °C olduğunda, hipokampusun CA1 bölgesinde ve striatumda hafif derecede patolojik değişiklikler gözlenirken, sıcaklık 36 °C de sabit tutulduğunda , nöronlarda ciddi hasar görülmüştür. Hipotermi doku oksijen tüketiminin azalmasına, arteriyel oksijen içeriğinin artmasına ve metabolik asidozun azalmasına neden olmaktadır (120,121). Kontrol sıcaklığından 2 °C'lik artış, yüksek enerjili fosfatlarda fonksiyon bozukluğuna ve asidozun artmasına neden olmaktadır (122). Sıcaklığın değişmesi; iyon homeostazisinin sağlanması, kan beyin bariyerinin geçirgenliği, nöronal yapılara kalsiyumun girmesi, beyin kan akımındaki değişiklikler, trombositlerin agregasyonunu, nörotransmitterlerin salınımını ve membran lipitlerinin parçalanması gibi sıcaklıkla ilişkili olan fizyolojik parametreleri etkilemektedir (120,123). Beyin sıcaklığının düşmesi çeşitli nörotransmitterlerin sentezini, salınımını ve geri alınımını (reuptake) inhibe etmektedir. Bu nedenle, hipotermi nörotransmitterlerin veya reseptörlerin fonksiyonunu değiştirerek iskeminin sonuçları üzerine etkili olmaktadır

(120). Globus ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçlarına göre ise, beyin sıcaklığının 36 °C'den 33 °C'ye düşürülmesi ile normalde iskemi sırasında hücre dışına geçişi 7 kat artan glutamatın salınımı neredeyse tamamen ortadan kalkmakta; ayrıca dopaminin hücre dışına salınımı %60 oranında azalmaktadır (124). Yapılan otoradyografik çalışmalar, dereceli hipotermide iskemi sonrası erken dönemde glikoz kullanımının ve kan akımının arttığını göstermiştir (125). Bu sonuçlar hiperterminin morbidite ve mortaliteyi artırdığını hipotermimin ise azalttığını ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bu çalışmada fareler anestezide alındıktan sonra rektal sıcaklık monitorize edilerek homeotermik battaniye kontrol ünitesi ile 36.5- 37.5 °C'de sabit tutulmuştur.

Olanzapin ve risperidone klinik psikiyatride oldukça sık kullanılan ajanlar olup son zamanlarda nöroprotektif etkinliği üzerinde yapılan çalışmalar hızla artmaktadır (126,127,135,136). Bu çalışmamızda , insanlarda kullanılan dozlarda kullanılan olanzapin ve risperidonun akut kullanımda nöroprotektif etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle iskeminin doğasındaki dopaminerjik ve serotonerjik transmitterlerin yeri bu çalışmanın temel dayanağını oluşturmaktadır.

Dopamin ve serotonin reseptörleri özellikle kortikal ve striatal bölgelerde lokalize olup, iskemi esnasında aktivasyonları, nörokimyasal yollar üzerinden nöronları destrüksiyona uğratmaktadırlar. Bu ajanların sinaptik aralıktaki dopamin ve serotonin miktarını azaltabilme özellikleri ile çalışmamızda gösterdikleri nöroproteksiyon bu nörotransmitterlerin glutamatın yanında iskeminin gelişimi ve prognozu açısından önemli olduğunu desteklemiştir.

Globus ve arkadaşları yaptıkları çalışmada dopamin ve serotoninin etkilerini, bu reseptörlerin farklı subtiplerinin aktivasyonu ile ilişkilendirmiş, ancak gösterilen iskemiye artırıcı bu etki, yapılan diğer çalışmalarla da tam anlamıyla ne parankime ne de vasküler yataktaki reseptörlerin aktivasyonuna bağlanabilmiştir (77-81). Daha sonra yapılan çalışmalar dopamin ve serotoninin iskemi esnasında en az glutamat kadar önemli olduğunu fakat gerek salınan miktar gerekse etkilerini gösterdikleri moleküler kaskadlar açısından birtakım farklılıklar arz ettiklerini göstermiştir (84-88,102-105).

Bilindiği üzere glutamat, temel olarak 2 ana reseptör üzerinden eksitotoksik etki gösterir. Dopamin ve serotonin farklı reseptör subtipleri üzerinden gösterdikleri eksitotoksik etki dışında, glutamatın postsinaptik etkilerini de modüle edebilme özelliklerine sahiptirler. Dopamin ve serotonin her ikisinde tek başına iskemiye artırıcı etkiye sahiptir. Bu nedenle sinaptik aralıkta sadece glutamat seviyelerini azaltan

ilaçlara kıyasla hem dopamin hem serotonin seviyelerini azaltabilme şansına sahip ilaçlar ayrı bir önem göstermektedirler.

Son zamanlarda psikiyatride kullanılan yeni kuşak antipsikotiklerin etki mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik yapılan çalışmalar, bu ilaçların reseptör düzeyindeki karmaşık etkilerine ilaveten, nöroprotektif olduklarını desteklemektedir.

Wei ve arkadaşları yanısıra (126) , Li. ve arkadaşları (127) , olanzapin ve diğer yeni kuşak antipsikotiklerle yaptıkları çalışmada, bu ajanların invitro ortamda 48 saat üzerindeki kullanımlarında nöroprotektif etkili bulmuş ve bu etkilerini p75 nörotrofin reseptörleri ve SOD 1' in mRNA düzeyinde yaptıkları değişikliklere bağlı olduğunu saptamışlardır.

p75NTR' leri 75 kDa büyüklüğünde bir transmembran olup, dejeneratif süreç esnasında nöronların apoptozise gitmesini sağlayan, TNF/Fas ölüm ligandı olarak görev yaparlar (128,129).Şizofreni dahil birçok hastalıkta, bu reseptörlerin rolü son yıllarda önem kazanırken, beyin travmasını takiben matür SSS hücrelerinde bu reseptörlerin genetik düzeyde up regüle oldukları ve apoptosis ile doğrudan ilişki içerisinde oldukları saptanmıştır (130-132).

Rabizadeh ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, invitro ortamda PC12 hücrelerinde serum yoksunluğunu takiben, bu reseptörlerin spesifik antikorlar ile blokajının nöroprotektif olduğunu göstermişlerdir (133,134). İlginç olarak aynı invitro modelde, yine PC 12 hücrelerle yapılan çalışmada Bai ve arkadaşları, serum yoksunluğuna uğrattıkları PC 12 hücre kültürlerini, apoptosise karşı risperidon ve olanzapinin 48 saatlik kullanımlarında koruduklarını saptamışlar ve bu ilaçların nöroprotektif etkisinin, p75nörotrofin reseptörleri ve SOD 1 in mRNA düzeyinde yaptıkları değişikliklere bağlı olduğunu göstermişlerdir (135). Yapılan benzer bir çalışmada, risperidon ve olanzapinin subakut kullanımlarında invitro ortamda antiapoptotik etkisini gösterilmiş ve bu etkinin direkt p75 nörotrofin reseptörlerinin düzeyinde, mRNA düzeyinde yaptıkları azalma yanısıra, SOD 1 mRNA'sının artmasına bağlı olduğunu saptamışlardır (136). İskemi esnasında meydana gelen reperfüzyon hasarı dışında, iskemik travmayı takiben Fas ligandlarının ekspresyonlarındaki artış da göz önüne alınırsa, bu ajanların iskemide de protektif etki gösterebilecekleri düşünülebilir.

Yaptığımız bu çalışmada, kalıcı iskemi modelini seçtik. Bu modelde, reperfüzyon hasarı, transiyent iskemideki kadar fazla olmasa da, yapılan birçok çalışma, toksik oksijen radikalleri oluşumunun permanent iskemi fazında da devam ettiğini ve temel olarak transiyent iskemi esnasındaki reperfüzyon fazından toksik O²

ettiğini ve temel olarak transiyent iskemi esnasındaki reperfüzyon fazından toksik O² radikallerinin üretiminde patlama aktivitesinin olmaması ile ayrıldığını desteklemiştir (138-140). Yapılan diğer çalışmalar, bu fizyopatolojik ayrımı desteklemiş ve transiyent iskeminin reperfüzyonu esnasında uygulanan radikal temizleyicileri, infarkt volumlerini permanent iskemiye göre daha anlamlı bir şekilde azaltmıştır (137-140). Bu yapılan çalışmalar burst aktivitesinin, transiyent iskemideki önemini birkez daha desteklemiş ve bu aktivitenin sitokrom c salınımı ve periyodisitesi üzerinden nörotoksik olabileceğini akla getirmiştir (8,9,10,139).

Yapılan invitro çalışmalarda bu antipsikotikler SOD 1 ve p 75 NTR mRNA düzeylerini 72 saatte up regüle etmişlerdir. Çalışmamızda ise risperidon ve olanzapin antipsikotiklerin tek dozlarda akut kullanılmışlardır. Ayrıca kullandığımız permanent iskemi modelinde toksik oksijen radikal hasarı transiyent iskemideki kadar ön planda değildir. Tüm bu nedenlerden dolayı çalışmamızdaki protektiviteyi antioksidan etkiye bağlamadık.

Son zamanlarda, özellikle nörosteroidlerin nöroprotektif etkileri araştırılmıştır. Bu nörosteroidlerden allopregnanolon, son zamanlarda üstünde durulan nörosteroidlerin başında gelmektedir. Yapılan çalışmalar, allopregnanolon seviyeleri ile, nöron destrüksiyonunu azaltıcı etkinin direkt bir korelasyon içerisinde olduğunu göstermiş ve bu konuda yapılan invitro iskemi çalışmaları da bu nörosteroidin protektif etkinliğini desteklemiştir (141). Marx ve arkadaşları yaptıkları invivo sıçan çalışmasında, olanzapinin (0,1 –1 –10 mg/kg) akut dozlarda, doz ile orantılı bir şekilde kortikal allopregnanolon seviyelerini artırdığını ve 10 mg/kg dozunda bu artışın istatistiksel olarak anlam kazandığını göstermişlerdir (142). Özellikle allopregnanolon seviyelerindeki bu yükselmeleri sağlayan olanzapin dozları ile, bizim kullandığımız akut olanzapin dozlarının uyum içerisinde olması çalışmamızı ilginç kılan yönlerden birisiydi.

Çalışmamızda da 0.1 mg/kg dozunda akut i.p olanzapin , infarkt volumlerini anlamlı bir şekilde azaltmış, fakat 10 mg /kg dozunda herhangi bir nöroprotektif etki göstermemiştir. İnfarkt volumlerindeki olanzapinin 10 mg/kg dozunda beklenen proteksiyonun görülmemesi, bizim yaptığımız çalışmada kullanılan hayvan türlerindeki(C57BL/6fare) genotip ve buna bağlı metabolizma farklılıklarından ileri gelebilir. Bunun yanısıra farelerde akut olanzapin uygulanması ile allopregnanolon seviyeleri korelasyonunu içeren bir çalışma da mevcut değildir.

Bilindiği üzere, son zamanlarda birtakım antidepresanların uzun süre kullanımının mitokondriyal antiapoptotik proteinleri artırmalarına ek olarak, nörogenezisi de stimule ettikleri gösterilmiştir (143-145). Öte yandan

antidepresanların son zamanlarda gündemde olan bu nöroprotektif etkinliği açısından olaya baktığımızda, bu iki ajanın , iskemi gibi multipl eksitotoksik sürecin rol oynadığı bir olayda, invivo ortamda akut dozda dahi etkin bir şekilde nöroprotektif etki göstermesi oldukça ilginçtir.

Yeni kuşak antipsikotik ajanların erken ve uzun süre kullanımlarının, iyi klinik prognoz ile beraber olması da bu ve benzeri nöroproteksiyon çalışmaları tarafından desteklenen bir yöndür.

Çalışmamızda allopregnanolon seviyeleri ile toksik O₂ radikallerini ölçmedik. Fakat gelecekte özellikle toksik O₂ radikalleri üretiminin daha ön planda olduğu transiyent iskemi modellerinde, antipsikotik kullanımını içeren yeni çalışmalar planlanabilir. Bu çalışmalarda özellikle antipsikotiklerin SOD 1 mRNA düzeylerini artıracak kadar yeterli sürede kullanımları ve izleyen zaman dilimi içerisinde toksik O₂ radikallerinin ölçümleri düşünülebilir. Ayrıca bu çalışmalarda yeni gündemde olan nörosteroid seviyelerinin sağladığı proteksiyonun patofizyolojik temelini aydınlatmaya yönelik olarak apoptotik veya nekrotik hücrelerin nörohistolojik olarak gösterilmesi farklı bir açılım gibi görünmektedir.

Bu çalışma, atipik antipsikotiklerin serebral iskemide ve özellikle akut tek dozluk kullanımda nöroprotektif olduklarını gösteren ilk çalışmadır. Biz bu nöroprotektif etkiyi kullandığımız model ve doz itibari ile antioksidan etkiye veya p 75 reseptörlerinin azalmasına bağlamadık. Yaptığımız çalışmadaki gösterdiğimiz nöroprotektif etki, antipsikotiklerin akut kullanımlarda dopamin ve serotonin miktarlarını azaltabilmelerine ek olarak, protektif nörosteroid seviyelerindeki olası akut yükselmeye yol açmalarına bağlanabilir.

Bu sebeple, olanzapin ve risperidonun akut ve kronik dozlarda uygulandığı permanent ve transiyent fokal serebral iskemi modellerinde, nörosteroid ve toksik oksijen radikallerinin kantitatif ve kalitatif olarak ölçüldüğü tek tür hayvan çalışmaları, gelecek için umut verici çalışmalar olacaktır.

Yaptığımız çalışmada, akut dozlarda etkin bir şekilde nöroprotektif bulduğumuz bu iki ajan, sadece serebral iskeminin karmaşık eksitotoksik mekanizmalarının aydınlatılması açısından değil aynı zamanda moleküler psikiyatri açısından da oldukça anlamlıdır.

KAYNAKLAR

1. Kjellmer I. Mechanisms of Perinatal Brain Damage. *Annals of Medicine* 1991;23: 675-679
2. Siesjö B.K. Cerebral Circulation and Metabolism. *J Neurosurg* 1984;60: 883-908
3. Lemasters J.J, DiGuseppi J, Nieminen A.L. et al. Blebbing Free Ca⁺⁺ and Mitochondrial Membrane Potential Preceding Cell Death in Hepatocytes. *Nature* 1987;78-81
4. Siesjö B.K. Cell Damage in the Brain: A Speculative Synthesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981;1:155-158
5. Cheung J.Y, Bonventre J.V, Malis C.D. Leaf. A. Calcium and Ischemic Injury. *the New England Journal of Medicine* 1986;314:1670- 1676
6. Hossmann K-A. Glutamate-Mediated Injury in Focal Cerebral Ischemia: The Excitotoxin Hypothesis Revised. *Brain Pathology* 1994;4: 23-26
7. Morley P, Hogan M.J, Hakim A.M. Calcium-Mediated Mechanisms of Ischemic Injury and Protection. *Brain Pathology* 1994;4: 37-47
8. Siesjö B.O.K. Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 1992;77:169- 184
9. Siesjö B.O.K. Pathophysiology and Treatment of Focal Cerebral Ischemia. Part II: Mechanisms of Damage and Treatment. *J Neurosurg* 1992;77:337-354
10. Pulsinelli W. Pathophysiology of Acute Ischemic Stroke. *The Lancet* 1992; 339: 533-537
11. Vyskocil F, Kriz N, Bures J. Potassium Selective Microelectrodes Used for Measuring the Extracellular Brain 1972; 39:255-259
12. Kaila K, Voipio J. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-Activated Bicarbonate Conductance. *Nature* 1987;330 163-165
13. Ross H.M, Romrell L.J, Koye G.I. A Text and Atlas of Histology, Baltimore. 1995; pp 83-86

14. Uematsu D, Greenberg J.H, Reivich M. et Al. In Vivo Fluorometric Measurement of Changes in Cytosolic Free Calcium from the Cat Cortex During Anoxia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:367-374
15. Marrannes R, Willems R, De Prins E. et al. Evidence for a Role of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor in Cortical Spreading Depression in the Rat. *Brain Res.*1988;457:226-240
16. Mutch W.A, Hansen A.J. Extrasellüler pH Changes During Spreading Depression and Cerebral Ischemia: Mechanisms of Brain pH Regulation. *J Cereb Blood Flow Metab.*1984;4:17-27
17. Akkuş İ. Serbest Radikaller Ve Fizyopatolojik Etkileri.Mimoza yayınları,Konya.1995
18. Freeman B.A, Crapo J.D, Biology of Disease: Free Radicals and Tissue injury. *Laboratory Investigation* 1982;47:49-58
19. Pieri C, Marra M, Moroni F. Melatonin: A Peroxyl Radical Scavenger More Effective Than Vitamin E. *Life Sciences* 1994;55: 271-276
20. Dutka A.J, Kochanec P.M, Hallenbeck J.M. Influence of Granulocytopenia in Canine Cerebral Ischemia induced by Air Embolism. *Stroke* 1989; 20:390-395
21. Champe P.C, Harvey R.A. Hexose Monophosphate Pathway. *Lippincott's Illustrated reviews: Biochemistry*, Philadelphia J.B. Lippincott Company.1994; pp:111-118
22. Reiter R.J. Oxidative Processes and Antioxidative Defense Mechanisms in the Aging Brain. *FASEB. J* 1995;9:526-533
23. Reiter R.J. Melchiorri D. Seweynek E et al. Review of the Evidence Supporting Melatonin's Role as an Antioxidant. *J Pin Res.*1995; 18:1-11.
24. Chan P.H. Role of Antioxidants in Ischemic Brain Damage. *Stroke* 1996; 27:1124-1129
25. Panetta J.A, Clemens J.A. Novel antioxidant therapy for cerebral ischemia-reperfusion injury. *An. N. Y. Aca. Sci* 1994;723:239-245

26. Schmidley J.W. Free Radicals in Central Nervous System Ischemia. *Stroke* 1990;21:1086-1090
27. Beckman J.S, Chen J, Conger C. The Importance of Superoxide in Nitric Oxide Dependent Cerebral Ischemic injury In: Moskowitz, M.A. Caplan, L.R. (eds). *Cerebrovascular diseases*. Newton, M.A: Butterwoth- Heinemann.1995;pp 25-37.
28. Chan P.H. Oxygen Radicals in Focal Cerebral Ischemia. *Brain Path.* 1994;4:59-65.
29. Biemond P, Eijik H G, Sweak et al. Iron Metabolization from Ferritin by Superoxide Derived from Stimulated Polymorphonuclear Leucocytes. *J Clin invest* 1984;73:1576-1579
30. Phillis J.W. A Radical View of Cerebral Ischemic injury. *Prog Neurobiol* 1994;42:441-448
31. Traystman R.J, Kirsch J.R, Koehler R.C. Oxygen Radical Mechanisms of Brain injury Following Ischemia and Reperfusion. *J App Physiol* 1991;71:1185-1195
32. Jaeschke H. Mechanism of Oxidant Stress induced Acute Tissue injury. *PSEBM* 1995;209:104-111
33. Strosznajder J, Chamonruc M. Biphasic Enhancement of Nitric Oxide Synthase Activity and cGMP Level Following Brain Ischemia in Gerbils. *Acta Neurobiol Exp* 1996;56 :71-81
34. Simonian N.A, Coyle J.T. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:83-106
35. Yang Y.G, Betz L. Reperfusion Induced Injury to the Blood Brain Barrier After Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Stroke*1994;25: 1658-1665
36. Kumura E, Yoshimine T, Iwatsuki K. et al. Generation of Nitric Oxide and Superoxide During Reperfusion after Focal Cerebral Ischemia in Rats. *Am J Physiol* 1996;270:C 748-752
37. Aronowski J, Ostrow P, Samways E. et al. Graded Bioassay for Demonstration of Brain Rescue from Experimental Acute Ischemia in Rats. *Stroke* 1994;25:2235- 2240

38. Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK. Ischemic Penumbra in a Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Experimental Brain Res* 1992;89:67-78
39. Olney J.W, Sharpe L.G. Brain Lesions in infant Rhesus Monkey Treated with Monosodium Glutamate. *Science* 1969 ;166:386-388
40. Dugan L.L, Choi D.W. Excitotoxicity, Free Radicals and Cell Membrane Changes. *Ann Neurol* 1994;35:17-21
41. Schulz J.B, Matthews R.T, Jenkins B.G. et al. Blockage of Neuronal Nitric Oxide Synthase Protects Against Excitotoxicity in Vivo. *J Neurosci* 1985;15:8419-8429
42. Benveniste H, Drejer J, Schousboe et al. Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by intracerebral Microdialysis. *J Neurochem* 1984;43:1369-1374
43. Fisher M. An Overview of Cytoprotective therapy for Acute Ischemia Stroke, In: Moskowitz MA, Caplan LR (eds). *Cerebrovascular diseases*. Newton, MA: Butterworth-Heinemann.1995;pp 391-402.
44. Koroshetz W.J, Moskowitz, M.A. Stroke in Humans. *Trends Pharm Sci*. 1996 ;17:227-233.
45. Memezawa H, Smith M.L, Siesjö B.K. Penumbra Tissues Salvaged by Reperfusion Following Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *Stroke* 1992;23:552-559
46. Miller R.J. Multiple Calcium Channels and Neuronal Function. *Science* 1987;235:46-52
47. Choi D.W. Possible Mechanisms Limited N-methyl-D-aspartate Receptor Overactivation and the therapeutic Efficacy of N-methyl-D-aspartate Antagonists. *Stroke* 1990;21(suppl III):20-22
48. Mayer M.L, Westbrook G.L, Guthrie P.B. Voltage Dependent Block by Mg of NMDA Responses in Spinal Cord Neurons. *Nature* 1984; 309:261-263

49. Nowak L, Bregestowski P, Ascher P. et al. Magnesium Gates Glutamate Activated Channels in Mouse Central Neurones. *Nature* 1984; 307:462-465
50. Siesjö B.K, Bengtsson F. Ca^{++} Fluxes, Calcium Antagonists, and Calcium Related Pathology in Brain Ischemia Hypoglycemia, and Spreading Depression: A Unifying Hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:127-140
51. Choi D. Methods for Antagonizing Glutamate Neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rew* 1990;2:105-147
52. Roda J.M. Carceller P. Diez-Teledor et al . Reduction of infarkt Size by intracararterial Nimodipine Administered at Reperfusion in A Rat Model of Partially Reversible Brain Focal Ischemia. *Stroke* 1995; 26:1888-1892
53. Harley D.M, Kurth M, Bjerkness L, Weiss J.H et al. Glutamate Receptor-induced $^{15}Ca^{23}$ Accumulation in Cortical Cell Culturel Correlates with Subsequent Neuronal Degeneration. *J Neurosci* 1993;13:1993-2000
54. Clemens J.A, Saunders R.D, Ho P.P, Phebus L.A, Panetta J.A. The Antioxidant LY231617 Reduces Global Ischemic Neuronal injury in Rats. *Stroke* 1993;24:716-723
55. Traystman R.J, Kirsch J.R, Koehler R.C. Oxygen Radical Mechanisms of Brain injury Following Ischemia and Reperfusion. *J App Physiol* 1991;71:1185-1195
56. Tymianski M, Charlton M.P, Carlen P.L et al. .Secondary Ca^{++} Overload indicates Early Neuronal injury which Precedes Staining with Viability indicators. *Brain Res* 1993;607:319-323
57. Dawson V.L, Izushi V.M, Huang P.L et al. Resistance to Neurotoxicity in Cortical Cell Cultures from Neuronal Nitric Oxide Synthase-Deficient Mice. *J Neurosci* 1996;16:2479-2487
58. Koh J, Golberg M.P, Hartley D.M et al. Non-NMDA Receptor-Mediated Neurotoxicity in Cortical Culture. *J Neurosci* 1990;10:693-705
59. Weiss J.H, Turetsky D, Wilke G et al. AMPA/ Kainate Receptor-Mediated Damage to NADPH-Diaphorase-Containing Neurons is Ca^{++} Dependent. *Neurosci Lett* 1994;67:93-96

60. Choi D. Methods for Antagonizing Glutamate Neurotoxicity. *Cerebrovasc Brain Metab Rew* 1990;2:105-147
61. Dalkara T, Ayata C, Demirci M, Erdemli G, Onur R. Effects of Cerebral Ischemia on NMDA and Dihydropyridine-Sensitive Calcium Current. *Stroke* 1996;27:127-133
62. Graf R, Heiss W.D, Wiendhard K. et al. Excitotoxicity: interaction of Neuroactive Substances During Prolonged Focal Ischemia in Cats. In: Kriegstein J. Oberpichler- Scwenk, H (Eds). *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart, Medpharm. 1994;pp 239-251
63. Hossmann K.A. Mechanisms of Ischemic injury: is Glutamate involved? In: Kriegstein, J. Oberpichler- Scwenk, H (eds). *Pharmacology of Cerebral Ischemia*. Stuttgart, Medpharm.1994 pp 239-251
64. Cheung J.Y, Bonventre J.V, Malis C.D. Leaf. A.Calcium and Ischemic Injury. *the New England Journal of Medicine* 1986;314:1670- 1676
65. Olney J.W, Sharpe L.G. Brain Lesions in infant Rhesus Monkey Treated with Monosodium Glutamate. *Science* 1969;166:386-388
66. Silver I.A, Erecinska M. Intracellular and Extracellular (Ca^{++}) in Hypoxia and Ischemia in Rat Brain in Vivo. *J Gen Physiol* 1990;95:837-866
67. Silver I.A, Erecinska M. Ion Homeostasis in Rat Brain in Vivo: Intracellular and Extracellular Ca^{++} and H^{+} in the Hippocampus During Recovery from Short term, Transient Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:759-772
68. Siejo B. Calcium Mediated Processes in Neuronal Degeneration. *Ann N Y Acad Sci* 1995;747:140-161
69. Harman A.W, Maxwell M.J. An Evaluation of the Role of Calcium in Cell injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995;35:129-144
70. Kjellmer I. Mechanisms of Perinatal Brain Damage. *Annals of Medicine* 1991;23:675-679
71. Hochachka P.W, Mommsen T.P. Protons and Anaerobiosis. *Science* 1983;219:1391-1397

72. Pulsinelli W.A, Duffy T.E. Regional Energy Balance in Rat Brain After Transient forebrain Ischemia. J of Neurochemistry 1983 ;40:1500-1503
73. Bolas N, Rajagopalan B, Mitsumori F. et al. Metabolic Changes During Experimental Cerebral Ischemia in Hyperglycemic Rats, Observed by ³¹P and ¹H Magnetic Resonance Spectroscopy. Stroke 1988;19:608-614
74. Anderson R.E, Sundt T.M. Brain pH in Focal Cerebral Ischemia and Protective Effects of Barbiturate Anesthesia. J Cereb Blood Flow Metab 1983;3:493-497
75. Gardiner M, Smith M.L, Kangström, E. et al. Influence of Blood Glucose Concentration on Brain Lactate Accumulation During Severe Hypoxia and Subsequent Recovery of Brain Energy Metabolism. J Cereb Blood Flow Metab 1982;2:429-438
76. Mattson MP, Mark RJ. Excitotoxicity and excitoprotection in vitro. Adv Neurol 1996;71:1-37
77. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke. An integrated view. Trends Neurosci 1999;22:391-397
78. Wieloch T. Neurochemical correlates to selective neuronal vulnerability. Prog Brain Res 1985;63:69-85
79. Meldrum B. Excitotoxicity in ischemia. An overview ,in Gingsberg MD, Dietrich WD(eds).Cerebrovascular Diseases.Sixteenth Research (Princeton) Conference. New York,Raven Press,Publishers,1989;pp 47-60
80. Globus M.Y.T.,Busto R, Dietrich WD, Martinez E.,Valdes I, Gingsberg M.D. Effect of ischemia on in vivo release of striatal dopamine glutamate and gamma aminobutyric acid studies by intracerebral microdialysis. J.Neurochem 1988;51:1455-1464
81. Damsma G, Boisvert,D.P, Mudrick,L.A.. et al. Effects of transient forebrain ischemia and pargyline on extracellular concentrations of dopamine,serotonin,and

their metabolites in the rat striatum as determined by *in vivo* microdialysis. *J.Neurochem* 1990;54:801-808

82.Globus MY-T, Busto R, Martinez E. et al. Direct evidence for acute and massive norepinephrine release in the hippocampus during transient ischemia. *J.Cereb. Blood Flow Metab* 1989;9:892-896

83.Hagdeberg H, Andersson P, Lacarewicz J. et al. Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and yantine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient forebrain ischemia. *J.Neurochem* 1987;49: 227-231

84.Phebus L.A and Clemens J.A. Effects of transient, global cerebral ischemia on striatal extracellular dopamine, serotonin and their metabolites. *Life Sci* 1989;44:1335-1342

85.Richards D.A, Obrenovich T.P and Curzon, G.. Extracellular dopamine and serotonin in the rat striatum transient ischemia of different severities: a microdialysis study. *J. Neurochem* 1993;60 :128-136

86.Sarna G.S, Obrenovich T.P, Matsumoto T et al. Evidence of a differential sensitivity of monoamines neurotransmission to ischaemia; an intracerebral dialysis study. *J.Neurochem* 1990;55:937-940

87.Peroutka S.J. 5-Hydroxytryptamine receptors. *J.Neurochem* 1993; 60: 408-416

88.Brannan T, Weinberger J, Knott, P. et al. Direct evidence of acute, massive striatal dopamine release in gerbils with unilateral strokes. *Stroke* 1987;18:108-110

89.Nedegard S, Engberg I, Flatman J.A. The modulation of excitatory amino acid responses by serotonin in the cat neocortex *in vitro*. *Cel Mol Neurobiol* 1987;7:367-379

90.Rasmussen K, Aghajanian GK. Serotonin excitation of facial motoneurons.Receptor subtype characterization. Synapse 1990;5:181-191

91.Wiernsperger N. Serotonin 5HT2 receptors and brain circulation. J Cardiovasc Pharmacol 1990;16(suppl):S20-S24

92.M.J. Piera, M Beaughard, M.T Michelin, R.Massingham. Effects of the 5-hydroxytryptamine 1A receptor agonists ,8-OH-DPAT,buspirone and flesinoxan, upon brain damage induced by transient global cerebral ischemia in gerbils. Arch. Int. Pharmacodyn Ther 1995;329:347-359

93.J.H.Prehn, C.Backhauss, C.Karkoutly, J.et al. Neuroprotective properties of 5-HT1A receptor agonists in rodent models of focal and global cerebral ischemia. Eur. J. Pharmacol 1991;203:213-222

94.White FR, Neuman RS. Pharmacological antagonism of facilitatory but not inhibitory effects of serotonin and norepinephrine on excitability of spinal motor neurons. Neuropharmacology 1983;22:489-494

95.Bobker DH, And Williams JT. Ion conductances affected by 5-HAT receptor subtypes in mammalian neurons. Trends Neurosci 1990;13:169-173

96.Bode-Greuel KM, Klisch J Glaser T, Traber J. Serotonin 5-HT1a receptor agonists as neuroprotective agents in cerebral ischemia,in KrieglsteinJ,OberpichlerH(eds): Pharmacology of Cerebral Ischemia. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellsch.1990; pp 485-491

97.Fujikura H, Kato H, Nakano S et al. Serotonin S2 antagonist, naftidrofuryl, exhibited a protective effect on ischemic neuronal damage in the gerbil. Brain Res 1989;494:387-390

98.Nakayama H, Gingsberg MD, Dietrich WD. (S)-Emopamil,a novel calcium channel blocker and serotonin S2 antagonists ,markedly reduces infarct size following middle cerebral artery occlusion in the rat. Neurology 1988; 38:1667-1673

99. Kagami Y, Shibata S, Watanabe S. Neuroprotective effect of 5 HT3 receptor antagonist on ischemia –induced decrease in CA1 field potential in rat hippocampal slices. *European Journal of Pharmacology* 1992;224:51-56

100. Bentue-Fenner D, Decombe R, Saiag B. et al. L-type voltage-dependent calcium channels do not modulate aminergic neurotransmitter release induced by transient global cerebral ischemia: an *in vivo* microdialysis study. *Exp. Brain Res* 1993; 93:288-292

101. Bentue-Fenner D, Bellissant E, Decombe R et al. Temporal profile of aminergic neurotransmitter release in striatal dialysates in rats with post-ischemic seizures. *Exp. Brain Res* 1994; 97:437-443

102. Khan FH, Saha M, Chakrabarti S. Dopamine induced protein damage in mitochondrial –synaptosomal fraction of the brain. *Brain Res* 2001;895:245-249

103. Saulle E, Centonze D, Martin BA et al. Endogenous Dopamine Amplifies Ischemic Long Term Potentiation via D1 Receptors. *Stroke* 2002;33:2978-2984

104. Vallone D, Picetti P, Borelli E. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000;24:125-132

105. Yamamoto Y, Tanaka T, Shibata S et al. Involvement of D1 dopamine receptor mechanism in ischemia-induced impairment of CA1 presynaptic fiber spikes in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1994;665:151-154

106. Liu X.-H, Kato H, Chen T. et al. Bromocriptine protects against delayed neuronal death of hippocampal neurons following cerebral ischemia in gerbil. *J. Neurol.Sci* 1995; 129:9-14

107. Hall E.D, Andrus P K, Oostveen J.A et al. .Neuroprotective effects of the dopamine D2\3 agonist pramipexole against postischemic or metamphetamine-induced degeneration of nigrostriatal neurons. *Brain Res* 1996;742:80-88

108. Yamamoto Y, Tanaka T, Shibata S, Watanabe S. Involvement of D1 dopamine receptor mechanism in ischemia-induced impairment of CA1 presynaptic fiber spikes in rat hippocampal slices. *Brain Res* 1994;665:151-154

109. O'Neill JM., Hicks AC, Ward AM et al. Dopamine D2 receptor agonists protect against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in global cerebral ischaemia. *Europ. Jour of Pharm* 1998;352:37-46

110. Ichikawa J, Bonaccorso S, Fowler W et al. 5-HT_{2a} and D2 receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1a} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *Journal of Neurochemistry* 2001;76:1521-1531

111. Moore NA, Calligaro DO, Wong DT. et al. The pharmacology of olanzapine and other new antipsychotic agents. *Curr Opin Inves Drugs* 1993;2:281-93

112. Grant S, Fitton A. Risperidone. A review of its Pharmacology and Therapeutic Potential in the treatment of Schizophrenia. *Drugs* 1994 ; 48:253-73

113. Callaghan JT, Bergstrom RF, Ptak RL. Beasley MC. Olanzapine; pharmacodynamic and pharmacodynamic profile: *Clinical Pharmacokinetics* 1999; 37:177-193

114. Reus VI. Olanzapine :a novel atypical neuroleptic agent. *Lancet* 1997 ;349:1264-65

115. Wyatt RJ. Early intervention with neuroleptics may decrease the long term morbidity of schizophrenia. *Schiz Res* 1991; 5:201-202

116. Falloon IRH. Early intervention for first episodes of schizophrenia :a preliminary exploration. *Psychiatry* 1992;55:4-15

117. Wyatt RJ, Henter ID. The effects of early and sustained intervention on the long-term morbidity of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1998;32:169-177
118. Tran PV, Hamilton SH, Kuntz AJ et al. Double blind comparison of olanzapine vs risperidone in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. *J Clin Psychopharmacol* 1997;17:407-418
119. Hertel P, Nomikos G.G, Iurlo M et al. Risperidone regional effects in vivo on release and metabolism of dopamine and serotonin in the rat brain. *Psychopharmacology* 1996;124:74-86
120. Busto R, Dietrich W.D, Globus M.Y-T et al. Small Differences in intras ischemic Brain Temperature Critically Determine the Extent of Ischemic Neuronal injury. *J Cereb Blood Flow and Metab* 1987; 7(6):729-38
121. Chopp M, Knight R, Tidwell C.D. et al. The Metabolic Effect of Mild Hypothermia on Global Cerebral Ischemia and Recirculation in the Cat: Comparison to Normothermia and Hyperthermia. *J Cereb Blood Flow and Metab* 1989;9:141-148
122. Chopp M, Welch K.M.A, Tidwell C.D. et al. The Effect of Mild Hyperthermia on Recovery of Metabolic Function after Global Cerebral Ischemia. *Stroke* 1988;19:1521-1525
123. Busto R, Globus M.Y-T, Dietrich W.D. et al. Effect of Neurotransmitters and Free Fatty Acids in Rat Brain. *Stroke* 1989; 20:904-910
124. Globus M.Y-T, Busto R, Dietrich W.D. et al. Intraischemic extracellular release of dopamine and Glutamate is Associated with Strial Vulnerability to Ischemia. *Neurosci. Lett* 1988; 91: 36-40
125. Ginsberg M.D, Busto R, Castella Y. et al. The Protective Effect of the Moderate intra-Ischemic Brain Hypothermia Is Associated with Improved Postischemic Glucose Utilization and Blood Flow: *J Cereb Blood Flow and Metab* 1989; 9: S380

126.Li XM, Chlan-Fourney J, Juorio AV et al. Differential effects of olanzapine on the gene expression of superoxide dismutase and the low affinity nerve growth factor receptor. *J Neurosc Res* 1999;56:72-75

127.Wei ZL, Li Xinmin. Neuroprotective effects of some atypical antipsychotics. *Fifth Alz Park Dis Abstr* 2001:104

128.Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET et al. NMR structure and mutagenesis of the Fas(APO-1/CD95)death domain. *Nature* 1996;384:638-641

129.Liepinsch E, Ilag LL, Otting G. NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 1997;16:4999-5005

130.Casaccia-Bonnet P, Carter B, Dobrowsky et al. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 1996;383:716-719

131.Roux PP, Colicos MA, Barker PA. et al. P75 Neurotrophin receptor expression is induced in apoptosis neurons after seizure.*J Neurosci* 1999;19:6887-6896

132.Oh JD, Chartisathian K, Chase TN et al. Overexpression of neurotrophin receptor p 75 contributes to the excitotoxin –induced cholinergic neuronal death in rat basal forebrain. *Brain Res* 2000;853:174-185

133.Rabizadeh S, Bredesen DE. Is p75 involved in developmental neural cell death ? *Dev Neuroscience* 1994; 207-211

134.Rabizadeh S, OH J, Zhong L, Yang J et al.Induction of apoptosis by the low-affinity NGF receptor. *Science* 1993; 261:345-348

135. Bai O, Wei Z, Lu W et al. Protective effects of atypical antipsychotic drugs on PC 12 cells after serum withdrawal. *Journal of neuroscience research* 2002 ;69:278-283

136.Li XM, Bai O, Qing H et al. Neuroprotective effects of quetiapine and other atypical antipsychotics. Soc Neurosci Abstr 2001;27:664

137.Clark WM, Rinker LG, Lessov NS et al. Efficacy of antioxidant therapies in transient focal ischemia in mice. Stroke 2001 ;32:1000-1004.

138.Takasago T, Peters EE, Graham DI et al. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. Br J Pharmacol 1997;122:1251-1256

139.Chan PH. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia. Brain Pathol 1994; 4:59-65

140 . Xue D, Slivka A, Buchan AM. Tirilazad reduces cortical infarction after transient but not permanent focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1992 ;23:894-899

141.Marx EC, Duncan EG, Gilmore JH et al. Olanzapine increases allopregnanolone in the rat cerebral cortex. The Journ. of Biol Psych 2000;47:1000-1004

142.Frank C, Sagratella S. Neuroprotective effects of allopregnaolone on hippocampal irreversible neurotoxicity in vitro. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2000;24:1117-1126

143.Santarelli L, Saxe M, Gross C et al. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science 2003;301:805-809

144.Duman RS, Nakagawa S, Malberg J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. Neuropsychopharmacology 2001;25:836-844

145.Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ et al. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. J Neurosci 2000;20:9104-9110