

ARAŞTIRMA

Demirin neden olduğu purkinje hücre kaybı üzerine nitrik oksit sentaz inhibisyonunun koruyucu etkisi

Fatih Sefil¹, Ramazan Kozan², M. Ömer Bostancı³, Faruk Bağırıcı¹

¹Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilimdalı, Samsun

²Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilimdalı, Hatay

³Hitit Üniversitesi, Sağlık Yüksekokulu, Çorum

Özet

Amaç: Demir, nöronal hiperaktivite ve oksidatif stresi indüklemek için sıklıkla kullanılan bir metaldir. Nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenen nitrik oksit ile hücre ölümü arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bulgular da mevcuttur. Bu çalışmada, intraserebroventriküler olarak injekte edilen demirin sıçan serebellar Purkinje hücrelerinde oluşturduğu nörotoksisteye karşı bir indüklenbilir NOS inhibitörü olan aminoguanidin ve non-selektif NOS inhibitörü olan N-nitro-L-arginin metil ester'in (L-NAME) etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Sıçanlar; kontrol, demir, demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME grupları olmak üzere dört gruba ayrıldı. Demir, demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME gruplarındaki sıçanlara intraserebroventriküler olarak demir verildi. Operasyonu takiben on gün süreyle, demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME gruplarındaki sıçanlara sırasıyla 30 mg/kg aminoguanidin ve 60 mg/kg L-NAME intraperitoneal olarak verildi. Onuncu günün sonunda, bütün gruplardaki hayvanlar üreter anestezi altında intrakardiyak yolla perfüze edildi. Toplam Purkinje hücre sayımları için tarafsız sayım metodu olan stereolojik yöntem kullanıldı.

Bulgular: Demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME grupları demir grubu ile karşılaştırıldığında, aminoguanidin ve L-NAME demirin indüklediği Purkinje hücre kaybını %24.9'dan sırasıyla %12.3 ve %11.3'e geriletmişti bulundu ($p<0.05$).

Sonuç: Bu çalışmanın sonuçları, aminoguanidin ve L-NAME'nin demirin indüklediği Purkinje hücre kaybını anlamlı olarak azalttığını ve NOS inhibisyonunun demirin zararlı etkilerini önleyebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Serebellum, Purkinje hücresi, nitrik oksit sentaz, demir, stereoloji

Protective effect of inhibition of nitric oxide synthase on iron-induced purkinje cell loss

Objective: Iron is commonly used as a metal to induce neuronal hyperactivity and oxidative stress. A body of evidence also indicates a link between nitric oxide synthase (NOS) and neuronal death. In this study, we investigated the effects of aminoguanidine, an inducible NOS inhibitor and N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a nonselective NOS inhibitor, against intracerebroventricular-injected iron induced neurotoxicity on the cerebellar Purkinje cells in rats.

Methods: Rats were divided into four groups: control, iron, iron+aminoguanidine and iron+L-NAME. Animals in iron, iron+aminoguanidine and

Yazışma Adresi:

Yrd. Doç. Dr. Ramazan Kozan
Mustafa Kemal Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilimdalı,
31100 Hatay
E-mail: drkozan@hotmail.com

iron+L-NAME groups received intracerebroventricular iron injection. All animals were kept alive for ten days following the operation and animals in iron+aminoguanidine and iron+L-NAME groups received intraperitoneally 30 mg/kg aminoguanidine and 60 mg/kg L-NAME, respectively. At the end of the tenth day, rats were perfused intracardially under urethane anesthesia. Unbiased stereological technique was used to estimate the total number of Purkinje cells.

Results: It was found that aminoguanidine and L-NAME decreased iron induced Purkinje cell loss from 24.9% to 12.3% and 11.3%, respectively ($p<0.05$), when iron+aminoguanidine and iron+L-NAME groups compared with iron group.

Conclusion: Results of the present study showed that aminoguanidine and L-NAME significantly attenuate iron-induced Purkinje cell loss and inhibition of NOS can prevent the deleterious effects of iron.

Key Words: Cerebellum, Purkinje cell, nitric oxide synthase, iron, stereology

Demir, insan yaşamı için oldukça önemli olup sitokrom-a,b,c, sitokrom oksidaz gibi pek çok enzimlerin ve oksijen taşıyıcı proteinlerin aktif merkezlerinde bulunmaktadır. Ayrıca, demir insan beyninde en fazla bulunan geçiş metali olup (1), normal beyin fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir. Ancak, beyinde aşırı miktarda demir birikmesi, lipid peroksidasyonunun hızlanması, DNA zincirinin kırılması ve serbest oksijen radikallerinin katalizlenmesi gibi etkilerle oksidatif stresi indüklemektedir (2-5). Bu durum, nöronal dejenerasyona neden olarak santral sinir sisteminde pek çok hastalığın oluşmasında önemli bir rol oynar. Demir metabolizmasındaki bozuklukların, Parkinson, Alzheimer, Huntington, Hallervorden-Spatz ve Friedreich hastalığı gibi pek çok nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu gösterilmiştir (6,7). Ayrıca demirin posttravmatik epileptogenezis ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (8). Demir tuzlarının suda çözünmüş solüsyonlarının subpial injeksiyonunun sıçanlarda beyin ödemeine, kaviter nekroza ve tekrarlayan epileptiform deşarjlara neden olduğu ve serbest radikal oluşumunu indüklediği de bildirilmiştir (9).

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi tarafından L-arjinin'den sentezlenir. İnsanlarda endotelial (eNOS), nöronal (nNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere üç adet NOS izoformu bulunmuştur (10,11). NO'nun siklik guanilat siklaz (cGMP), akonitaz ve demir düzenleyici protein aracılığı ile nöronlar arası

iletimden sorumlu olabileceği düşünülmüştür (12). Bazı çalışmalar NO'nun nöroprotektif etkisinin olduğunu gösterse de (13,14) NO hücre ölümünde de rol oynayan maddelerden biridir (15,16). Serebral iskemisi sırasında, NO ve süperoksit anyonu (O_2^-) oksidatif stres ve nörodejenerasyonun oluşmasında önemli rol oynamaktadır (17) ve nöronlar için oldukça toksik olan peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşmektedir (18). Oksidatif stres altında NO'nun sitotoksitesi, apoptozisi ve DNA hasarını artırıcı etkisi vardır (19). NOS enziminin inhibisyonu NO'nun bu etkilerini durdurmakta veya azaltmaktadır. Aminoguanidin, bir iNOS inhibitörü olup beyin iskemisini koruyucu etkisi gösterilmiştir (20,16). Ayrıca, sıçan hipokampusunda çinko ve demirin indüklediği nörotoksitesi de azaltmaktadır (21,22). N-G-nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) selektif olmayan bir NOS inhibitörüdür ve bazı çalışmalarda nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (23,24).

Serebellumun yüksek düzeyde NOS aktivitesi içerdiği gösterilmiştir (25). Ayrıca, NO'nun nörotoksik etkisine aracılık eden NMDA reseptör sayısının da serebellumda oldukça fazla olduğu bulunmuştur (26). Serebellumun majör efferent nöronları olan Purkinje hücreleri serebellar cevabın oluşmasında ve motor fonksiyonların integrasyonunda merkezi bir rol oynar. Daha önce yapılan bir çalışmada, 7-nitroindazol tarafından oluşturulan nNOS inhibisyonunun Purkinje hücreleri üzerine koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiş (27) fakat diğer NOS aktivitelerinin etkisi bildirilmemiştir. Bundan dolayı, sunulan çalışmada intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak verilen demirin sıçan serebellar Purkinje hücrelerinde oluşturduğu nörotoksiteye karşı aminoguanidin ve L-NAME'in etkisi tarafsız stereolojik metod kullanılarak araştırıldı.

Gereç ve Yöntem

Bu çalışmada, ağırlıkları 230 ± 20 g olan, Albino, Wistar, erişkin, erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi'nden alındı. Çalışma sırasında hayvanlara yapılan bütün uygulamalar, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun protokollerine uygun olarak yapılmıştır. Sıçanların bakımları 20 ± 2 °C'de ısı, %50 nem, 12 saat aydınlık-karanlık (07.00-19.00) ortamda istedikleri kadar yem ve su alabilecekleri şekilde aynı laboratuvar ortamında yapıldı. Sıçanlar kontrol, demir, demir+aminoguanidin ve

Tablo 1. Serebellumdaki toplam Purkinje hücre sayıları. SEM; standart hata, CV; coefficient of variation (varyasyon katsayısı), CE; coefficient of error (hata katsayısı). [§]P<0.001, *P<0.05 kontrol grubuna göre, ‡ P<0.05 demir grubuna göre.

Gruplar (n=7)	Toplam Purkinje Hücre Sayısı(ort.±SEM)	CV	CE
Kontrol	336 247±8705	0.051	0.062
Demir	252 771±6095 [§]	0.043	0.078
Demir+aminoguanidin	294 807±8524* ‡	0.076	0.077
Demir+L-NAME	297 989±5311*‡	0.081	0.074

demir+L-NAME olmak üzere dört gruba ayrıldı (n=7).

Operasyondan 12 saat önce aç bırakılan sıçanlar operasyonun hemen öncesinde tartılarak, ketamin (100 mg/kg) ve ksilasın 10 mg/kg intraperitoneal (i.p.) karışımı ile anestezi oluşturuldu. Sıçanlar steriotaksik cihaza sabitlendikten sonra kafa derileri orta hattın rostro-kaudal yönde 2 cm elektrikli koter (Ellman Surgitron) ile kesilerek açıldı. Kafa kemiği üzerinde bulunan tendon ve fasiyalar uzaklaştırıldıktan sonra, Bregma net olarak görüldü. Sol lateral ventriküle uygun olacak şekilde Bregmanın 2 mm lateralinde 0.6 mm posteriyöründe 1 mm çapında bir delik açıldı (28). Buradan Hamilton mikroenjeksiyonu ile girilerek 4.2 mm derinlikte, 0.5 µl/dk hızında 2.5 µl, 200 mM'lık FeCl₃6H₂O çözeltisi, demir, demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME grubundaki sıçanlara intraserebroventriküler (i.c.v.) olarak verildi (22). Kontrol grubundaki sıçanlara ise aynı hacimde serum fizyolojik, i.c.v. olarak verildi. Enjeksiyonu takiben insizyon yeri dikilerek %10 povidon iyot ile temizlendi ve hayvanlar kafeslerine yerleştirildi. Operasyondan sonra sıçanlar 10 gün süreyle yaşatıldı. Bu süre boyunca demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME gruplarındaki hayvanlara sırasıyla 30 mg/kg/gün aminoguanidin ve 60 mg/kg/gün L-NAME i.p. olarak verildi (29,30). Kontrol ve demir grubundaki sıçanlara ise aynı hacimde serum fizyolojik i.p. olarak verildi. On günlük sürenin sonunda, hayvanlar derin üreten anestezisi altında %10'luk formaldehid ve salin ile intrakardiyak yolla perfüze edildi. Perfüzyonu takiben beyin dokuları hızlıca çıkartılarak, beyin korteksi ve serebellum bir birinden ayrıldı. Serebellumlar standart histolojik doku takibi uygulandıktan sonra paraplast bloklara gömüldü. Mikrotom ile (Leica RM 2135) horizontal planda, bloklardan 40 µm'lik kesitler alınarak kresil violet ile boyandı.

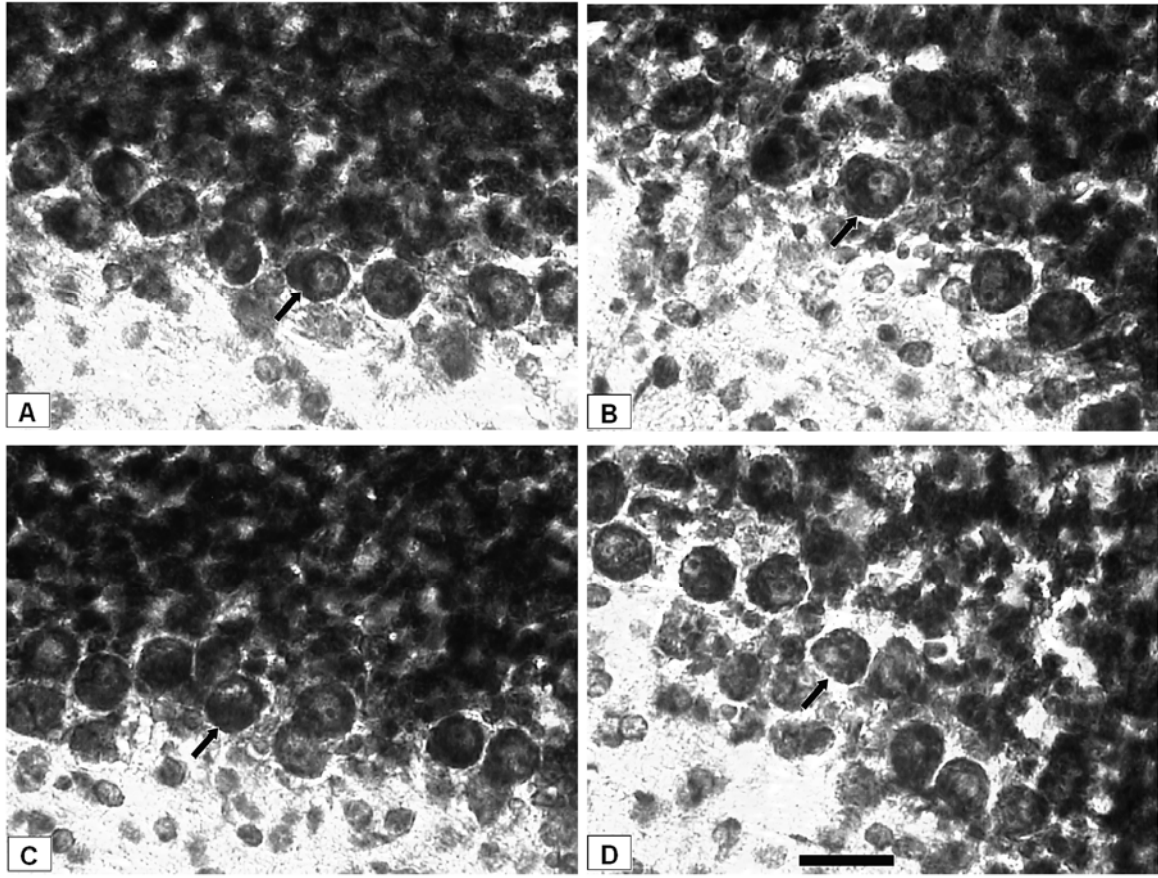
Sistematik olarak yapılan örneklemede (ssf:1/7) her yedi kesitten bir tanesi alındı ve bu şekilde

her hayvandan ortalama 15-17 serebellum kesiti elde edildi. Daha önceki yapılan çalışmalar da kullanılarak Purkinje hücrelerinin yapı ve özellikleri belirlendi (27,31). Serebellumdaki toplam Purkinje hücre sayıları ve analizleri bilgisayar destekli stereolojik görüntü analiz cihazında optik parçalama metodu kullanılarak hesaplandı (32). Hücre sayım alanlarının belirlenmesi ve sınırlarının çizilmesi CAST Grid stereolojik analiz yazılımı (Olympus, Denmark) kullanılarak yapıldı. Her bir kesitteki hücre sayıları, yaklaşık 500 hücre sayılacak şekilde örnekleme yapılarak elde edildi. Randomize olarak seçilen serebellum kesitinde x-y basamaklarında 200x200 µm adımlarla örnekleme yapıldı ve bu seçilen alanlar 100x'lük objektifde optik disektör probu da kullanılarak analiz edildi. Optik disektör sayımında tarafsız olarak ayarlanmış olan %20'lik sayım çerçevesi kullanıldı. Böylece, örnekleme yapılan alanın fraksiyonu (asf) 587/40.000 µm² olarak hesaplandı (27).

Optik parçalama metodunun son basamağında ise örnekleme yapılan alanın kesit kalınlığı belirlenmektedir. Kesitin üst kısmında 5 µm üst güvenlik zonu bırakıldıktan sonra 10 µm'lik disektör yüksekliği ayarlanan bölgede sayım yapıldı. Bu ölçümler stereoloji sistemine uyumu sağlanmış dijital bir mikrokator (Heidenhain, Germany) ile yapıldı. Bundan dolayı, en son örnekleme basamağı genellikle kalınlık örnekleme fraksiyonu (tsf) olarak adlandırılır ve [disektör yüksekliği]/[ortalama kesit kalınlığı] ile hesaplanır. Kesitlerin ortalama kalınlığı 26.85±3.15µm olarak hesaplandı. Bütün kesitlerdeki örnekleme tamamlandıktan sonra örneklenen Purkinje hücreleri disektör partikülleri (Q-) olarak hesaplandı. Toplam Purkinje hücre sayısı "N" olarak kabul edilerek aşağıdaki formül ile hesaplandı;

$$N = [1/ssf] \times [1/asf] \times [1/tsf] \times \Sigma Q-$$

Elde edilen veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) v10.1 yazılımı



Şekil 1. Sıçan serebellumundaki Purkinje hücrelerinin mikrofotografaları: (A) Kontrol, (B) demir, (C) demir+aminoguanidin ve (D) demir+L-NAME grubu. Fotoğrafların üzerindeki ok işaretleri Purkinje hücrelerini göstermektedir. Bar 40 μ m.

kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirildi. Toplam ortalama Purkinje hücre sayısının analizi için post hoc Tukey testi kullanıldı. Grafik ve metin içerisinde kullanılan deney gruplarına ait değerler ortalama \pm standart hata (SEM) olarak ifade edildi. Testlerden elde edilen sonuçlara göre p değeri 0.05'in altında olan farklılıklar anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Kontrol, demir, demir+aminoguanidin ve demir+L-NAME gruplarına ait serebellar Purkinje hücre sayılarındaki değişimin mikrofotografı Şekil 1'de gösterilmiştir. Stereolojik yöntemle hesaplanan ortalama toplam Purkinje hücre sayıları da Tablo 1'de verilmiştir. Grupların Purkinje hücre sayılarındaki yüzde değişimler karşılaştırıldığında (Şekil 2), kontrol grubuna göre Purkinje hücre sayılarının demir grubunda $\%24.9 \pm 2$ (83476 ± 10339) ($p < 0.001$), demir+aminoguanidin grubunda $\%12.3 \pm 1$ (41440 ± 4276) ($p < 0.05$) ve demir+L-NAME

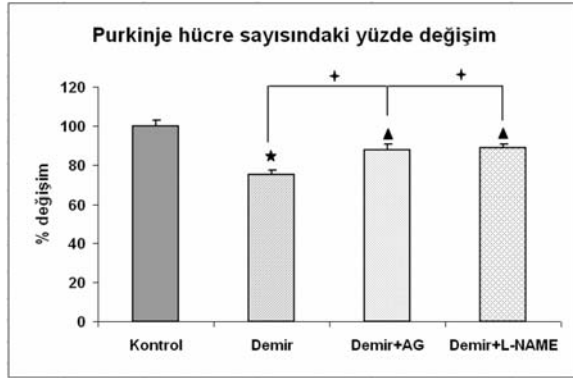
grubunda $\%11.3 \pm 2$ (38258 ± 5944) ($p < 0.05$) oranında azaldığı bulundu (Tablo 1, Şekil 2).

Demir+aminoguanidin grubunun ortalama Purkinje hücre sayısı, demir grubununki ile karşılaştırıldığında, aminoguanidin demirin indüklediği hücre kaybını $\%12.6 \pm 3$ oranında iyileştirdiği bulundu ($p < 0.05$), (Şekil 2). Demir+L-NAME grubu, demir grubu ile karşılaştırıldığında ise L-NAME'nin demirin neden olduğu hücre kaybını $\%24.9 \pm 2$ 'den $\%11.3 \pm 2$ 'ye geriletmediği ($p < 0.05$), (Şekil 2) ve tespit edildi. Demir+aminoguanidin grubu ile demir+L-NAME grubundaki Purkinje hücre sayıları karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0.05$).

Tartışma

Sunulan çalışmada, aminoguanidin ve L-NAME'nin demirin neden olduğu serebellar Purkinje hücre kaybına etkisi araştırıldı. Bu çalışmada hücre sayım yöntemlerinden en tarafsız ve literatürde en çok kabul edilen yöntem olan stereolojik sayım metodu kullanıldı (32).

Aminoguanidin ve L-NAME demirin neden olduğu Purkinje hücre kaybını anlamlı bir şekilde azalttı. Hücre kaybını L-NAME yaklaşık %25'den %11'e, aminoguanidin ise %12'ye gerilettili. Çalışmamızın sonuçları, NOS'un demirin indüklediği nörotoksositeyle ilişkili olduğunu gösterdi.



Şekil 2. Serebellar Purkinje hücre sayısındaki yüzde değişim. Kontrol grubuna göre, * $p < 0.001$ ve ▲ $p < 0.05$; demir grubuna göre $p < 0.05$. Bütün sonuçlarda ortalama±SEM değerleri kullanıldı, (n=7). AG: Aminoguanidin.

Demir insan beyinde en fazla bulunan geçiş metali olup, normal beyin fonksiyonlarının sürdürülmesinde önemli bir role sahiptir (33).

Beyinde serbest demir miktarının artışı, Fenton ve Haber-Weis reaksiyonlarıyla hidroksil radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır (34,35). Artmış bu hidroksil radikalleri bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkilidir. Alzheimer'li hastaların beyinlerinin birçok bölgesinde demir ve çinko düzeylerinin anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (36). Ayrıca, Parkinson'lu hastaların da substantia nigralarında demir düzeylerinin arttığı bulunmuştur (37). Meyerhoff ve ark. (38) demir-klorürü i.c.v yöntemle 10 µl hacim içinde 600 mM dozunda epilepsi oluşturmak için vermişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 2.5 µl hacim içerisinde 200 mM'dır, bu doz çalışmadaki hayvanlarda herhangi bir epileptik davranış oluşturmadı. Bu çalışmada demir düzeyi oksidatif stres oluşturmak için yapay olarak artırıldı. Daha önceki çalışmalarda, i.c.v olarak verilen demirin bütün beyine homojen olarak dağıldığı ve serebellumda Purkinje hücre kaybına neden olduğu gösterildi (22,27). Demirin toksik etkilerini göstermesi bakımından bu çalışmanın sonuçları önceki araştırmalar tarafından desteklenmektedir.

L-arjinin aminoasitinden NOS enziminin aracılığı ile sentezlenen NO, santral sinir

sisteminde kısa ömürlü bir nöronal transmitter olarak görev yapar. Yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun nörotoksik veya nöroprotektif etkisi henüz tam olarak açıklanamamıştır. Bundan dolayı, nörodejenerasyon ve merkezi sinir sisteminin tamirinde NO'nun etki mekanizmalarının araştırılması önemli konular arasındadır. Serebellum, striatum, hipokampus, serebral korteks ve hipotalamus gibi beyin bölgelerinde NOS aktivitesinin yüksek olduğu gösterilmiştir (39,40). Yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun oksijene benzer şekilde hücre içine girerek hücre içindeki proteinlerin yapısında bulunan demir gibi geçiş metallerine bağlandığı ve ortama serbest demir salınmasına neden olduğu gösterilmiştir (41). Bu serbest demir, hücre membranında lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (42). Diğer taraftan, sıçanlarda yapılan deneysel iskemi modelinde, demirin hem süperoksit hem de NO üretimini artırarak iskemik hasarı ilerlettiği bulunmuştur (43). Daha önce yaptığımız çalışmalar, 7-nitroindazol ve aminoguanidin ile NOS inhibisyonu yapıldığında hipokampusta demirin indüklediği pramidial hücre kaybının azaldığını gösterdi (44,45). Ayrıca, NO'nun, NMDA tarafından oluşturulan sitotoksositeye aracılık ettiği kortikal nöron kültüründe (46), serebellar granüler hücre kültüründe (47) ve hipokampal hücrelerde gösterilmiştir (48). NO oksidatif stres altında süperoksit (O_2^-) ile reaksiyona girer ve hidroksil radikallerine dönüşen peroksinitrit ($ONOO^-$) üretilmesine neden olur (49). Güçlü bir oksidan olan peroksinitrit, hücre membran lipidlerinin, DNA ve çok sayıda enzim proteininin oksidasyonuna neden olur (50,51).

Nörotoksitenin çeşitli modellerinde NO sentezinin prekürsör ve inhibitör maddeleri çalışılmıştır. Bir NO öncüsü olan L-arjinin kortikal nöron kültüründe yaşayan hücrelerin sayısını azaltmıştır (52), demirin neden olduğu serebellar Purkinje kaybını artırmıştır (27). Bu çalışmada bir eNOS inhibitörü olan aminoguanidin, demirin indüklediği nöron kaybını %25'den %12'ye, non-spesifik NOS inhibitörü L-NAME ise %11'e gerilettili. Aminoguanidin, optik atrofide nöroprotektif etki göstermiş (53) ve çinkonun neden olduğu nörotoksositeyi de azaltmıştır (21). Ayrıca, karotid arterlerin bilateral bağlanmasıyla oluşturulan hipokampus hücre kaybını belirgin bir şekilde önlemiştir (54). Buna karşın bazen NOS inhibitörlerinin ters etkiler gösterebileceği bildirilmiştir. Kamii ve ark. (55) L-NAME'nin fokal serebral iskemide infarkt volümünü artırdığını göstermiştir. Ancak başka çalışmalarda

ise L-NAME quinolinatın (23), glutamatın (52) ve kurşunun (24) indüklediği nörotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızdaki L-NAME'nin koruyucu etkisi daha önceki çalışmalar tarafından desteklenmektedir. Bu çalışma ile ilk defa demir toksisitesinde Purkinje hücrelerine L-NAME ve aminoguanidinin etkileri gösterildi. Diğer taraftan, faralarda MPTP'nin indüklediği nörotoksisiteye karşı L-NAME'nin herhangi bir etkisi bulunmamıştır (56). Bu sonuçlar arasındaki farklılıklar, değişik nörotoksik maddelerin kullanılmasından, beynin farklı bölgelerinin incelenmiş olmasından, kullanılan doz veya deneysel metotlardan kaynaklanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ilk defa aminoguanidin ve L-NAME'in demirin neden olduğu toksisiteyi azalttığı gösterildi. Buna bağlı olarak nitrik oksit sentazın demirin indüklediği hücre kaybında önemli bir fonksiyonunun olabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Beard JL, Connor JR, Jones BC. Iron in the brain. *Nutr Rev* 1993;51:157-70.
2. Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB* 1990; 4: 2587-97.
3. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 1992; 59: 1609-23.
4. Hall ED, Braughler JM. Free radicals in CNS injury. *Res Pub Assoc Res Nerv Ment Dis* 1993; 71: 81-105.
5. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 220-25.
6. Shoham S, Youdim MB. Iron involvement in neural damage and microgliosis in models of neurodegenerative diseases. *Cell Mol Biol* 2000; 46: 743-60.
7. De Freitas JM, Meneghini R. Iron and its sensitive balance in the cell. *Mutat Res* 2001; 475: 153-9.
8. Willmore LJ, Triggs WJ. Iron-induced lipid peroxidation and brain injury responses. *Int J Dev Neurosci* 1991; 9: 175-80.
9. Willmore LJ, Hiramatsu M, Kochi H, Mori A. Formation of superoxide radicals after FeCl₃ injection into rat isocortex. *Brain Res* 1983; 277: 393-6.
10. Iadecola C, Zhang F, Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following focal cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1995; 268: 286-92.
11. Nathan C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? *J Clin Invest* 1997; 100: 2417-23.
12. Garthwaite J, Boulton CL. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 683-706.
13. Verrecchia C, Boulu RG, Plotkine M. Neuroprotective and deleterious effects of nitric oxide on focal cerebral ischemia-induced neuron death. *Adv Neuroimmunol* 1995; 5: 359-78.
14. Lin AMY. Recovery by NO of the iron-attenuated dopamine dynamics in nigrostriatal system of rat brain. *Neurosci Res* 1999; 34: 133-39.
15. Rauhala P, Sziraki I, Chiueh CC. Peroxidation of brain lipids in vitro: nitric oxide versus hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med* 1996; 21: 391-4.
16. Danielisova V, Nemethova M, Burda J. The protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage in the rat brain. *Physiol Res* 2004; 53: 533-40.
17. Cazevielle C, Muller A, Meynier F, Bonne C. Superoxide and nitric oxide cooperation in hypoxia/reoxygenation-induced neuron injury. *Free Radic Biol Med* 1993; 14: 389-95.
18. Fukuyama N, Takizawa S, Ishida H, Hoshiai K, Shinohara Y. Peroxynitrite formation in focal cerebral ischemia-reperfusion in rats occurs predominantly in the peri-infarct region. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 123.
19. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 737-69.
20. Cash D, Beech JS, Rayne RC, Bath PMW, Meldrum BS, Williams SCR. Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischemia in the rat brain. *Brain Res* 2001; 905: 91-103.
21. Gokce FM, Bagirci F, Kaplan S, Demir S, Ayyildiz M, Marangoz C. A NOS inhibitor aminoguanidine reduces zinc-induced neuron loss in rat hippocampus. *Neurosci Res Commun* 2003; 33: 53-62.
22. Bostanci MO, Bagirci F. Nitric oxide synthesis inhibition attenuates iron-induced neurotoxicity: A stereological study. *NeuroToxicology* 2008; 29: 130-5.
23. Perez-Severiano F, Escalante B, Rios C. Nitric oxide synthase inhibition prevents acute quinolinate-induced striatal neurotoxicity. *Neurochem Res* 1998; 23: 1297-302.
24. Sharifi AM, Mousavi SH, Bakhshayesh M, Tehrani FK, Mahmoudiana M, Oryan S. Study of correlation between lead-induced cytotoxicity and nitric oxide production in PC12 cells. *Toxicol Lett* 2005; 160: 43-48.

25. Bredt DS and Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 682-85.
26. Bonfoco E, Leist M, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P. Cytoskeletal breakdown and apoptosis elicited by NO donors in cerebellar granule cells require NMDA receptor activation. *J Neurochem* 1996; 67: 2484-93.
27. Gültürk S, Kozan R, Bostancı MO, Sefil F, Bağırıcı F. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase prevents iron-induced cerebellar Purkinje cell loss in rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008; 68: 26-31.
28. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th Ed. Academic Press. Inc. CA, USA. 1998.
29. Dudhgaonkar SP, Tandan SK, Kumar D, Arunadevi R, Prakash VR. Synergistic interaction between meloxicam and aminoguanidine in formalin-induced nociception in mice. *Eur J Pain* 2008; 12: 321-8.
30. Kozan R, Ayyildiz M, Bas O, Kaplan S, Agar E. Short-term ethanol administration does not change the total pyramidal neuron number of the rat hippocampus: a stereologic study. *Adv Ther* 2007; 24: 231-8.
31. Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimator and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson *J Microsc* 1986; 143: 3-45.
32. Schmitz C, Hof PR. Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience* 2005; 130: 813-31.
33. Moos T. Brain iron homeostasis. *Dan Med Bull* 2002; 49: 279-301.
34. Aust SD, Morehouse LA, Thomas CE. Role of metals in oxygen radicals reactions. *J Free Rad Biol Med* 1985; 1: 3-25.
35. Braugher JM, Duncan LA, Chase RL. The involvement of iron in lipid peroxidation. *J Biol Chem* 1986; 261: 10282-9.
36. Cornett CR, Markesbery WR and Ehmann WD. Imbalances of trace elements related to oxidative damage in Alzheimer's disease brain. *Neurotoxicology* 1998; 19: 339-46.
37. Hirsch EC, Faucheux BA. Iron metabolism and Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 13: 39-45.
38. Meyerhoff JL, Lee JK, Rittase BW, Tsang AY, Yourick DL. Lipoic acid pretreatment attenuates ferric chloride-induced seizures in the rat. *Brain Res* 2004; 1016: 139-44.
39. Förstermann U, Gorksy LD, Pollock JS, Schmidth HH, Heler M, Murad F. Regional distribution of EDRF/NO-synthesizing enzyme(s): In rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 168: 727-32.
40. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.
41. Lai YK, Lee WC, Hu CH, Hammond GL. The mitochondria are recognition organelles of cell stress. *J Surg Res* 1996; 62: 90-4.
42. Smith A, Sayre L, Perry G. Is Alzheimer's a disease of oxidative stress? *Alzheimers Dis Rev* 1996; 1: 63-67.
43. Gámez A, Carbonell T, Rama R. Does nitric oxide contribute to iron-dependent brain injury after experimental cerebral ischaemia? *J Physiol Biochem.* 2003; 59: 249-54.
44. Bostancı MO, Bağırıcı F. Neuroprotection by 7-nitroindazole against iron-induced hippocampal neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol.* 2007; 27: 933-41.
45. Bostancı MO, Bağırıcı F. Neuroprotective effect of aminoguanidine on iron-induced neurotoxicity. *Brain Res Bull* 2008; 76: 57-62.
46. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 6368-71.
47. Lafon-Cazal M, Culcasi M, Gaven F, Pietri S, Bockaert J. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: putative mediators of NMDA-induced cell death in cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1993; 32: 1259-66.
48. Skaper SD, Ancona B, Facci L, Franceschini D, Giusti P. Melatonin prevents the delayed death of hippocampal neurons induced by enhanced excitatory neurotransmission and the nitridergic pathway. *FASEB J* 1998; 12: 725-731.
49. Naoi M, Maruyama W, Yagi K, Youdim M. Anti-apoptotic function of L-deprenyl (L-Deprenile) and related compounds. *Neurobiology (Bp)* 2000; 8: 69-80.
50. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-50.
51. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: 1424-37.
52. Yamauchi M, Omote K, Ninomiya T. Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate induced neuronal death in cultured cortical neurons. *Brain Res* 1998; 780 :253-9.
53. Inoue M, Ohgiya N, Yamamoto M. Effect of aminoguanidine on optic nerve involvement in experimental diabetic rats. *Brain Res* 1998; 800 :319-22.

-
54. O'Neill MJ, Hicks C, Ward M, Panetta JA. Neuroprotective effects of the antioxidant LY231617 and NO synthase inhibitors in global cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; 760: 170-178.
 55. Kamii H, Mikawa S, Murakami K, Kinouchi H, Yoshimoto T, Reola L, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on brain infarction in SOD-1- transgenic mice following transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16 :1153-7.
 56. Muramatsu Y, Kurosaki R, Mikami T, Michimata M, Matsubara M, Imai Y, et al. Therapeutic effect of neuronal nitric oxide synthase inhibitor (7-nitroindazole) against MPTP neurotoxicity in mice. *Metab Brain Dis* 2002; 17: 169-82.
-