

Multiple Sklerozlu Hastalarda NOS3 Geninin mRNA Seviyesinde İfadesi

Ali BAYRAM^{a1}, Mehri İĞCİ¹, Remzi YİĞİTER², Mehmet Ali ELÇİ², Beyhan CENGİZ³,
Serdar ÖZTUZCU¹, Yusuf Ziya İĞCİ¹, Mustafa ULAŞLI¹, Recep BAYRAKTAR¹, İbrahim BOZGEYİK¹,
Ecir Ali ÇAKMAK¹, Ahmet ARSLAN¹

¹Fırat Üniversitesi, Elazığ Sağlık Yüksek Okulu, Elazığ, Türkiye

²Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Ana Bilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

³Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Ana Bilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

ÖZET

Amaç: Merkezi sinir sisteminde demiyelinizasyon ve akson hasarı ile oluşan multiple sklerozun (MS) gelişiminde genetik etmenlerin de rol alabileceği düşünülmektedir. Nitrik Oksit Sentazın (NOS) nöron koruyucu etkinliği olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar yapılmıştır. NOS ailesinden NOS3'ün (eNOS) NOS1 ve 2'nin aksine artan gen ifadesinin nörotoksik etki göstermediği, koruyucu özelliği olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu çalışmada NOS3 geninin ifade düzeyinin MS hastalığı ile ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Nöroloji Polikliniği'nde takip edilen 17-65 yaşları arası 93 MS hastası çalışma kapsamına alındı. Kontrol grubunu 93 sağlıklı gönüllü oluşturdu. MS'li hasta grubunda yaş ortalaması 35.60 (en küçük:17, en büyük:65); kontrol grubunda ise 33.80 (en küçük:20, en büyük:73) olarak bulundu. Real Time PCR yöntemi ile çalışma yapıldı.

Bulgular: NOS3 genindeki NOS3*2, NOS3*3 ve NOS3*4 allellerinde gen ifadesinin hasta/kontrol gruplarında anlamlı olarak düştüğü gözlemlenmiş ve gruplar arasındaki farklar Mann-Whitney yöntemi ile %95 güven aralığında (p<0.05) analiz edilmiştir.

Sonuç: Nitrik oksit (NO) azalan gen ifadesi neticesinde nöron hücrelerini koruyucu etkinliğinin yetersiz kalıyor olabileceği düşünülebilir. NO ve NOS3 geninin tanı ve yeni tedavi stratejileri geliştirmede umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülebilir. Ancak, NOS3 geninin ifade düzeyleri hasta ve kontroller arasında istatistik olarak farklı görünse de, her bir grup içerisinde çok değişkenlik gösterdiği için MS oluşumu ile ilişkili olduğunu iddia edebilmek için daha geniş hasta gruplarında yapılan çalışmalara ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışma bu amaçla tasarlanmış ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Multipl Skleroz, Real Time PCR, Nörodejenerasyon, NOS3 (eNOS).

ABSTRACT

mRNA Expressions of NOS3 Gene among Patients with Multiple Sclerosis

Objective: It is considered that genetic factors may play a role in the development of MS, which is caused by demyelination and axonal damage in central nervous system. Several studies, showing that NOS has a neuroprotective activism, have been conducted. It is known that, contrary to NOS1 ve 2, gene expression of NOS3 from NOS family does not show neurotoxic effect, but has a protective activism. Therefore, this study aimed to investigate the relationship of NOS3 gene expression levels with MS disease.

Material and Method: 93 MS patients between the ages of 17-65 were examined in the study at Gaziantep University school of medicine, Sahinbey Research and Application Hospital Neurology Department. The control group consisted of 93 healthy volunteers. It was found that the mean age of patients with MS was 35.60 and in the control group was 33.80. The study was conducted with RT-PCR method.

Results: The gene expression in alleles of NOS3*2, NOS3*3, and NOS3*4 in NOS3 patient/control groups were observed to decrease significantly, and the differences between groups with the Mann-Whitney method within 95% confidence interval (p <0.05) were analyzed.

Conclusion: A result of the reduced gene expression of NO, it might be considered that its protective effects on neuronal cells may be inadequate. NO and NOS3 genes might be expected to be a promising approach at diagnosis and the development of new treatment strategies. However; gene expression level of NOS3 gene may seem statistically different between patients and controls, since it shows a lot of variability in each group, in order to be able to claim that it is associated with the formation of MS, studies with larger patient groups are needed. This is the first study designed for that purpose.

Key Words: Multiple Sclerosis, Real Time PCR, Neurodegeneration, NOS3 (eNOS).

Klinik ve patolojik tanımlaması ilk kez 1868 yılında Charcot tarafından yapılan Multiple Skleroz (MS) hastalığı ile ilgili 140 yılı aşkın zamandan bu yana birçok ça-

lışma yapılmasına karşın hala oluşum mekanizması çözülememiştir (1). Ancak bağışıklık yanıtında nedeni bilinmeyen düzensizlikler sonucu, miyelin kaybıyla

^a Yazışma Adresi: Dr. Ali BAYRAM, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı, Gaziantep, Türkiye
Tel: 0 507 2567088
Geliş Tarihi/Received: 10.05.2013

e-mail: ak.ali@hotmail.com
Kabul Tarihi/Accepted: 05.08.2013

sonuçlanan bir süreç yaşandığı bilinmektedir (2). Dolayısıyla MS'le ilgili yapılacak genetik çalışmalarda, bağışıklık yanıtı etkileyen genler iyi irdelenmelidir.

Aile çalışmalarında, hastaların akrabalarında MS riskinin arttığı saptanmıştır (3). İkiz çalışmalarında monozygotik çiftlerde % 26'lık uyuşum (konkordans) saptanırken, dizigotik çiftlerde bu oran % 2,4 dür (4).

Kromozom 6'nın kısa kolundaki MHC (Yüksek Düzeyde Majör Doku Uyuşum Kompleksi-Major Histocompatibility Complex) bölgesinin MS için genetik belirleyici olduğunu gösteren çalışmalar vardır (5). Üzerinde çok çalışılan TNF genlerinin MHC içinde, kromozom 6'nın kısa kolunda kodlanıyor olması ise MS'in genetik yönüne dikkat çekmektedir (5).

NOS3 çoğunlukla endotel hücrelerden sentezlenir. Ancak izozimi ayrıca kalp miyositlerinde, plateletlerde, beyin bazı nöronlarında, plasentada ve böbrek tübül epitel hücrelerinde de tespit edilmiştir (6). Endotelial NO sentaz tarafından üretilen NO damar işlevi ve homeostatsite önemli rol sahibidir. NO'nun vasodilatör, anti-inflamatuar, antitrombotik ve antiproliferatif özellikleri vardır. Beyin iskemisi sırasında, NO üretiminin artışı ile serebral kan akışı da artar ki bu sayede nöronların korunması sağlanmaktadır (7).

1988 yılında beyinde Nitrik Oksit (NO) benzeri bir maddenin bulunmasıyla yeni bir nöronal aracı olarak NO'yu gündeme getirmiştir (6). İnsan ve hayvan beyinin tüm bölgelerinde değişen miktarlarda nitrik oksit sentaz saptanmıştır (6). Hayvan deneylerinde NO sentezinin in vivo şartlarda engellenmesi öğrenme yeteneğini azalttığı için hafızanın oluşumunda NO'yu rol oynadığı düşünülmektedir (9). NO aynı zamanda görme, koklama, ağrı ve açlık duygusunu algılamada rol oynuyor olabilir (7). Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda, serebral iske mi ve eksitotoksik lezyonlarda NADPH diaforaz adlı enzimi içeren nöronların korunduğu saptanmıştır (8). Bu enzim serebral kortekste nöronların % 2'sinde yer almakta olup gerek merkezi sinir sistemi (MSS) gerek periferik sinir sisteminde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile aynı bölgelerde saptanmıştır (8). Hatta NOS ile NADPH diaforazın aslında aynı enzimler olduğu düşünülmektedir (9). Bu veriler NOS aktivitesinin nöron koruyucu özelliği olduğunu gösterir. Aslında bu durum nitrik oksit düzeyine göre değişir (9). Örneğin NO, düşük düzeylerde beyinde faydalı, arttırıcı, düzenleyici ve nöronal etkinliği koruyucu etkiler gösterirken yüksek düzeylerde beyin hücrelerinin tümünde

öldürücü bir etki gösterir (8). NOS3 (eNOS, Endotelial NOS) tarafından üretilen NO'nun koruyucu etkileri varken, NOS1 (nNOS) ve NOS2 (iNOS) tarafından üretilen NO'nun yüksek miktarlarının nörotoksik etkisi olduğu bilinmektedir (12).

Bildiğimiz kadarıyla, bu araştırma MS ile NOS3 geni arasındaki muhtemel ilişkiyi ortaya koymayı amaçlayan ilk çalışmadır. Bu bağlamda MS hastalığının gelişimi, NOS3 geninin yolları ve MS hastalığında NOS3 geni işlevinin incelenmesi hedeflenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hastalık Tanısı ve Örneklerin Toplanması

Çalışma öncesi Gaziantep Üniversitesi etik kurulundan onay alınmış ve hasta ya da hasta ebeveynlerinden bilgilendirilmiş onay formu ile izin alınmıştır. Bu çalışmada, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji kliniğine başvuran, multiple skleroz (MS) tanısı almış hastalar çalışmaya alınmıştır. Bu çalışmaya, multiple skleroz tanısı almış 93 birey (yaş ortalaması; 35.60) ile nörodejeneratif herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı 93 birey (yaş ortalaması; 33.80) alınmıştır. MS tanısı için klinik bulgular yanında, MRG'de beyin lezyonlarının zamansal ve uzaysal dağılımı, beyin-omurilik sıvısı (BOS) incelemesi, uyarılmış potansiyeller gibi yardımcı tanısal incelemeler yapılmıştır.

MS'li hastalardan 18 yaş altı bir çocuk, 92 tanesi ise on sekiz yaş üstü yetişkin grubuydu. Çocuk grubu, relapsing remitting MS tanısı almış bir hastaydı. Yetişkin grubunda ise 1 tek epizot, 7 tek atakla olası MS, 10 seconder progresif, 6 primer progresif ve 69 relapsing remitting tanısı almış hasta vardı. Çalışılan gruplar ile ilgili bilgiler Tablo 1'de verilmiştir.

Çalışmada, hasta ve kontrol grubunun kan örneklerinden RNA elde edildi. RNA örneklerinden Ters Transkriptaz PCR yöntemi ile cDNA'sı yapıldı.

Araştırma Yöntemleri

Kan örneklerinden RNA eldesi High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak gerçekleştirildi. RNA örneklerden cDNA sentezi First Strand cDNA sentez (AMV) kiti (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak yapıldı. Hedef genlerin ifade tayini için Tablo 2'de verilen primer ve probler tasarlandı.

Tablo 1. Hasta ve kontrol gruplarına ait yaş ortalamaları.

	Hasta sayısı	Yaş ortalaması	Tek epizot	Tek atakla olası MS	Seconder progresif	Primer progresif	Relapsing remitting
Çocuk grubu	1	17	-	-	-	-	1
Yetişkin grubu	92	35,79	1	7	10	6	68
Kontrol grubu	93	32,98	-	-	-	-	-

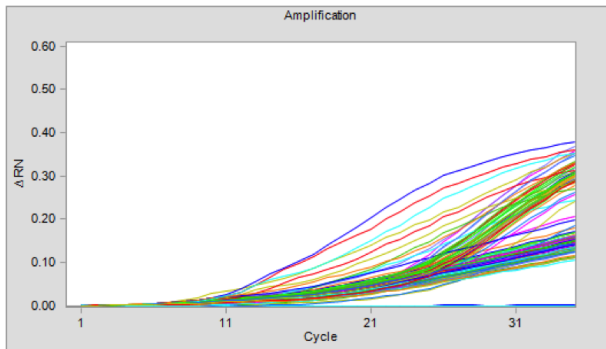
Tablo 2. Hamarat gen (housekeeping gen) Beta Aktin ve hedef genlerin primer dizileri ve probları.

Gen	Primer Dizisi	NCBI erişim numarası
ACTB	5I-ACCACACCTTCTACAATGAGC-3I 5I-CAGCCTGGATAGCAACGTAC-3I	NM_001101.3
NOS3*2	5I-GGTACATGAGCACTGAGATCG-3I 5I-TGCCTTGTCTTCCACAGG-3I	NM_001160109.1
NOS3*3	5I-ACTCCTGGGTCAAGCAATC-3I 5I-TGAAACGGACACTAAGGCAG-3I	NM_001160110.1
NOS3*4	5I-ACTCCTGGGTCAAGCAATC-3I 5I-TGAAACGGACACTAAGGCAG-3I	NM_001160111.1

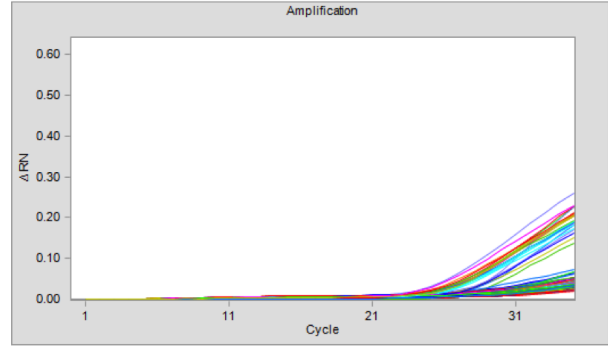
Primer ve probların tasarımı için www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl web sayfası kullanıldı. Buradan elde edilen diziler Pubmed NCBI nükleotid dizileri ile karşılaştırılarak doğrulukları tespit edildi. Primerler IDT (Integrated DNA Technologies, Belçika) firmasına sentezletirildi. Çalışmada Universal Probe Library (UPL) probları kullanıldı (Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya). UPL probları 8-9 nükleotidlik kısa dizileri olarak, kilitli nükleotid (Locked Nucleic Acid; LNA) teknolojisi kullanılmıştır. Real time PCR tepkimesi için 14 µl ditile su, 0,2 µl UPL probe (10 µM), 0,4 µl forward primer (10 µM), 0,4 µl reverse primer (10 µM), 4 µl Lightcyler Taqmanmaster (fast start Taq DNA polimeraz, tampon, MgCl₂, dNTP karışımı), 1 µl örnek cDNA karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışım kapiller tüplere aktarıldı. Kapiller tüpler LightCycler® 2.0 real time PCR cihazına yerleştirildi. 95 °C'de 10 dakika denatürasyon yapıldı. Daha sonra 45 döngü amplifikasyon için 95 °C 10 s denatürasyon, 60 °C 30 s bağlanma, 72 °C 60 s uzama yapıldı. Son aşamada bir döngü 40 °C 30 s tutulup PCR sonlandırıldı.

BULGULAR

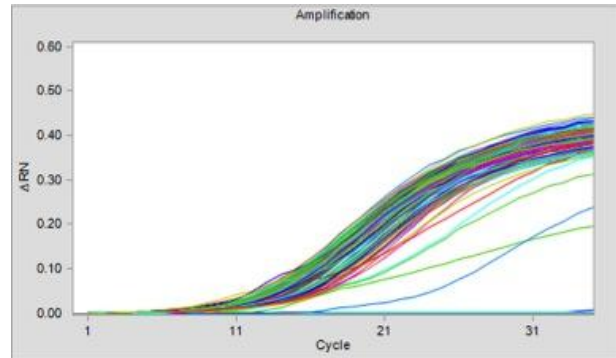
Oluşan reaksiyon eğrileri ile her örneğin çoğalma döngüleri hesaplandı (Şekil 1).



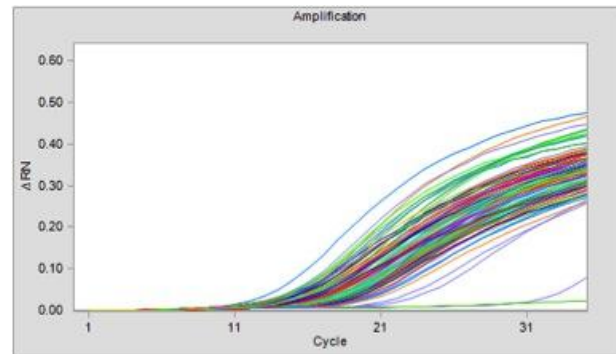
Şekil 1a. Kontrol grubu NOS3*2 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.



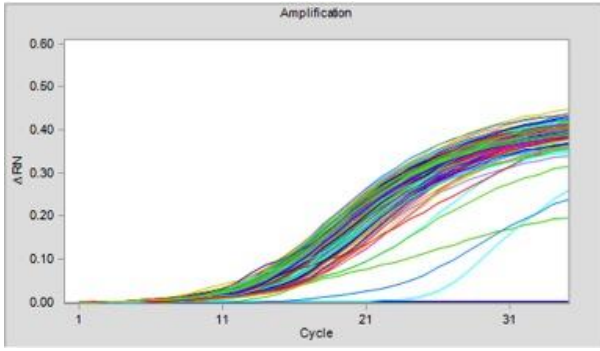
Şekil 1b. Hasta grubu NOS3*2 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.



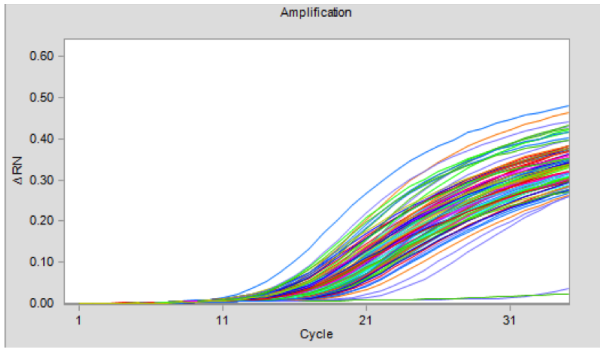
Şekil 1c. Kontrol grubu NOS3*3 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.



Şekil 1d. Hasta grubu NOS3*3 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.

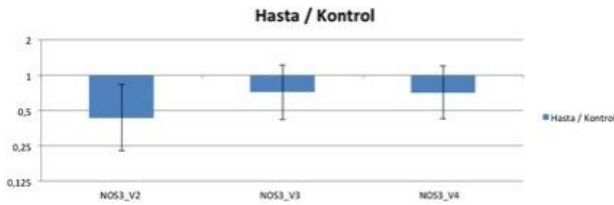


Şekil 1e. Kontrol grubu NOS3*4 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.



Şekil 1f. Hasta grubu NOS3*4 gen ifadesi real time PCR analiz sonuçları.

Örnekler için anlık çoğaltımın başladığı eğriler tespit edildi. Her örnek için hedef gen CT (Threshold Cycle) ve hamarat gen CT değerleri tespit edilip ΔCT oranları hesaplandı. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemiyle hesaplandı. (Livak et al., 2001), Tüm örneklerden elde edilen verilerin GraphpadInstat istatistik programı kullanılarak Mann Whitney U testi ile istatistiksel analizleri yapıldı. İstatistiksel değerlendirmeler neticesinde NOS3'ün 2, 3 ve 4 numaralı varyantlarının gen ifadesinin hasta grubunda anlamlı biçimde az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. NOS3 transkript varyant 2, 3 ve 4'ün ifade düzeyleri.

P değerleri sırasıyla, $p=0,013$, $p=0,03$ ve $p=0,03$ olarak hesaplanmıştır. Şekil 2'de gösterilen grafiklerde mavi çubuklar ortalama kat değişimine işaret ederken, hata çubukları ise, %95 güven aralığında, hastaların kontrollere göre en düşük ve en yüksek oranlarını göstermektedir. Hata çubuklarının gösterdiği oranlar geniş bir alanda dağılım gösterdiği için, oran 1'e çok yakın ve hatta üzerinde olduğu için gen ifadeleri MS oluşumuyla ilişkilendirilememiştir.

TARTIŞMA

MS'de immun düzeneklerle ilgili genlere ait özelliklerin yüksek oranda bulunması, bu hastalıkta immun sistemi içine alan bir anormalliği düşündürmektedir (10). Periferik kan ve beyin omurilik sıvısı bulgularının yanı sıra, hayvan modellerinde oluşturulan merkezi sinir sistemi patolojisi ve miyelin hasarı, MS patogenezinde bağışıklık tepkisi yolaklarının rol oynadığı varsayımını desteklemektedir (14).

Hastalığın oluşum seyrinde bir dizi faaliyet sonucu sitokinler; makrofajlar ve mikroglial hücreler gibi diğer bağışıklık hücrelerini alana çeker ve bu hücreler TNF- α veya IFN- β gibi proinflatuvar sitokinleri salgılayarak miyelin kılıfının doğrudan doğruya fagositik hasarını başlatırlar (12). Hastalık, MSS'de miyelin kaybından, oligodendrositlerin tam kaybına kadar değişen doku kaybına, ağır mikroglia veya astrosit çoğalmasına ve aksonal kesilerin oluşmasına neden olmaktadır (13).

Nörodejenerasyonun şiddetini arttıran veya azaltan proteinlerin ifadesi hastalığın tanı ve tedavisinde önemli açılımlar sağlayabilir.

Nitrik oksit muhtemelen tanımlanmış en küçük ve çok yönlü biyoaktif bir moleküldür (17). Nitrik oksit (NO), sinir, kardiyovasküler ve bağışıklık sistemlerinde meydana gelen çok sayıda süreçlerde önemli bir aracı molekül olarak hareket eder (18, 19). Nitrik oksit (NO) merkezi sinir sistemindeki fizyolojik ve patolojik süreçlerde temel işlevlere sahiptir (18, 9). Ayrıca, NO'nun nöronlar üzerinde hem koruyucu hem de toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından, L-argininden sentez edilir. NOS'un; tetiklenebilir NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS) ve nöronal NOS (nNOS) olmak üzere üç izoformu vardır. Tetiklenebilir izoform kalsiyumdan bağımsız olarak ve çeşitli enflamatuvar uyarılara yanıt olarak ifade edilir ve bu nedenle, iNOS'un nörotoksik etkilere sahip NO ürettiği kabul edilmektedir (20-22). Nöronal ve endotelial izoform kalsiyum-bağımlıdır ve eNOS koruyucu etki gösteren bir NO üretir (23).

Bu koruyucu etkinin ortadan kalkmış olabileceği, NOS3'ün MS'li hastalarda nörodejenerasyonun şiddetini etkiliyor olabileceği düşüncesi ile bu çalışma tasarlanmış, NOS3 geni varyantlarının (2, 3 ve 4) gen ifadesinin istatistiksel değerlendirmeler neticesinde hasta grubunda anlamlı düzeyde düştüğü tespit edilmiştir. (Sırasıyla; $p=0,013$; $p=0,03$ ve $p=0,03$). Fakat gerek hasta grubunda gerekse kontrol grubunda gen ifadelerinin çok geniş bir aralıkta değişkenlik gösteriyor oluşu nedeniyle MS oluşumu ile doğrudan ilişki kurulamamıştır.

NOS3 ifadesinin düşmesinin NO salınımının azalmasına neden olduğu düşünülebilir. Azalan NO üretimi doku hasarına sebep olmaktadır. Fokal serebral iskemi (24) ve akut glomerulonefrit (25) üzerine yapılmış çalışmalar da bu düşüncüyü desteklemektedir. NO'nun yüksek miktarlarını, demir sülfür grupları ve DNA ile etkileşimi sonucu doğrudan sitostatik veya sitotoksik etki

gösterebilmektedir. NO ayrıca superoksit anyonları ile etkileşerek peroksinitrit gibi yüksek derecede reaktif radikallerin üretilmesine ve dolayısıyla lipid peroksidasyonunun başlamasına yol açıp proteinlere hasar verebilir (25, 26). Fakat NO önleyiciler kullanılarak aşırı NO üretimini baskılamak üzere yapılan çalışmalar da çelişkili sonuçlar doğurmuştur. Bazıları NO cevabının koruyucu olduğunu öne sürerken diğerleri bu faydalı etkiyi endotelyumdan salınan düşük seviyeli NO'ya bağlamışlardır. Burada dikkat edilmesi gereken, bizce, düşük seviyeli olarak belirtilen NO sentezinin sağlıklı bireylerde gözlenen normal seviye olduğudur. Gen ifadesi azalan NO'nun koruyucu etkinlik gösteremediği ve hastalığın seyri içinde tetiklenen farklı yolların da etkileri ile ortaya çıkan miyelin hasarını önlemekte yetersiz kaldığı düşüncesi belirtmektedir.

KAYNAKLAR

1. Stewart S, Hart CL, Hole DJ, McMurray JJ. Population prevalence, incidence, and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart* 2001; 86: 516-21.
2. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Eng J Med* 2000; 343: 938-52.
3. Confavreux C, Aimard G, Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* 1980 and 1980; 103: 281-300.
4. Kurtzke JF. A reassessment of the distribution of multiple sclerosis. Parts I and II. *Acta Neurol Scand Vols Scand* 1975; 51: 110-57.
5. Ebers GC, Sadovnick AD. Epidemiology. *Multiple sclerosis* 1997; 5-28.
6. Altıntaş A, Kantarcı O, Siva A. Multiple sklerozda sitokinlerin rolü. *Türk Nörol Derg* 1995; 4: 167-71.
7. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 1121-31.
8. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA. Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 2004; 283-9.
9. Berner M, Beghetti M, Ricou B, Rauge JC, Pretne R, Friedli B. Relief of severe pulmonary hypertension after closure of a large ventricular septal defect using low dose inhaled nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-70.
10. Moncada S, Higgs A. The L-Arginin Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
11. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *The Lancet* 1994; 343: 1199-206.
12. Berner M, Beghetti M, Ricou B, Rauge JC, Pretne R, Friedli B. Relief of severe pulmonary hypertension after closure of a large ventricular septal defect using low dose inhaled nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 1990; 347: 768-70.
13. Koh PO. Ferulic acid modulates nitric oxide synthase expression in focal cerebral ischemia. 2012; 273-8.
14. Defer GL, Barre J, Ledudal P, Tillement JP, Degos JD. Methylprednisolone infusion during acute exacerbation of MS: plasma and CSF concentrations. *Eur Neurol* 1995; 35: 143-8.
15. Yılmaz, NÇ. Multipl Skleroz ve Otoimmünite. 2006, Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 91 sayfa, İstanbul (Doç. Dr. Hülya TİRELİ). Altıntaş A, Benbir G. Miyelinizasyon, Demiyelinizasyon Ve Remiyelinizasyon Mekanizmaları. *Türk Nöroloji Dergisi* 2005; 2.
16. Conzales GG, Avellana-Adalid V, Alli C, Baron Van Evercooren A. Myelination of the central nervous system, From Basic Immunology to Immun-Mediated Demyelination. Springer-Verlag 1999; 101-15.
17. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 300-10.
18. Szabo C. Physiological and pathophysiological roles of nitric oxide in the central nervous system. *Brain Res Bull* 1996; 41: 131-41.
19. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol* 1996; 10: 291-316.
20. Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, et al. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 2046-50.
21. Galea E, Reis DJ, Xu H, Feinstein DL. Transient expression of calcium-independent nitric oxide synthase in blood vessels during brain development. *FASEB J* 1995; 9: 1632-7.
22. Sparrow JR. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system. *J Mol Neurosci* 1994-1995; 5: 219-9.
23. Hashiguchi A, Yano S, Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Takeuchi Y, Fukunaga K. Up-regulation of endothelial nitric oxide synthase via phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to ischemic tolerance in the CA1 subfield of gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24: 271-9.
24. Koh PO. Ferulic acid modulates nitric oxide synthase expression in focal cerebral ischemia. *Lab Anim Res* 2012; 28: 273-8.
25. Heeringa P, Steenbergen E, van Goor H. A protective role for endothelial nitric oxide synthase in glomerulonephritis. *Kidney Int* 2002; 61: 822-5.
26. Groves JT. Peroxynitrite: Reactive, invasive and enigmatic. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3: 226-355.