



Allopürinolün hipoksik-iskemik beyin hasarı oluşturulan yenidoğan sıçanlarda kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi üzerine etkisi

Allopurinol's effect on caspase-3 and caspase-8 activity in hypoxic-ischemic newborn rats

Kenan Özcan, Mehmet Satar*, Necmiye Canacankatan**, Erdal Taşkın***, Kenan Dağlıoğlu****

Özel Güney Adana Hastanesi, Adana, Türkiye

*Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Neonatoloji Bilim Dalı, Adana, Türkiye

**Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin, Türkiye

***Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Yenidoğan Yoğun Bakım Birimi, Elazığ, Türkiye

****Çukurova Üniversitesi TIPDAM, Adana, Türkiye

Özet

Amaç: Hipoksi-iskemi sonrası reperfüzyon-reoksijenasyon döneminde küçük damar endotel hücrelerinde serbest radikallerin üretimine neden olan siklooksijenaz ve ksantin oksidazın aktive olduğu iki önemli yol tetiklenir. Ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinolün hipoksik iskemik ansefalopatide nöroprotektif olabileceği gösterilmiştir. Kaspaz-3 ve kaspaz-8 nöronal apoptozda anahtar bir role sahiptir. Bu çalışmada yenidoğan sıçanlara hipoksi-iskemi sonrası değişik dozlarda uygulana allopürinolün beyin dokusunda apoptozun öncül proteinleri olan kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesine etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada her gruba yedi günlük 10 sıçan alındı. Etik Kurul onayı (TIBDAM-25) alınan sıçanların sol karotis arteri bağlanıp 2,5 saat hipokside bırakıldı. Kontrol (S) ve hipoksi iskemi (H-İ) gruplarına ilaveten, bir gruba (AL48) 30 dak ve 12 saat sonra, bir gruba da (AL72) 30 dak ve 12 saate ilaveten 24 saat sonra 24 mg/kg dozda allopürinol periton içine uygulandı. Son ilaç uygulanmasından 24 saat sonra sıçanlar kafaları kesilerek beyin dokusunda kaspaz-3 ve kaspaz 8 aktivitelerine bakıldı.

Bulgular: Tüm grupların kendi sağ ve sol beyin kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktiviteleri arasında fark yoktu ($p>0,05$). H-İ, AL48 ve AL72 gruplarının her iki beyin küresindeki kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeyleri kontrol grubuna göre belirgin yüksekti (hepsi için $p=0,0001$). Ancak AL48 grubu ile H-İ grubu arasındaki kaspaz düzeyleri farklılık göstermez iken ($p>0,05$), AL72 grubunda kaspaz düzeyleri hem Hİ hem de AL48 grubuna göre daha düşüktü (sırası ile $p=0,0001$, $p=0,001$).

Çıkarımlar: Toplam 72 mg/kg allopürinol verilen hipoksik iskemik yenidoğan sıçanların beyin dokularında kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeylerinin azalması, bu dozdaki allopürinolün hipoksik iskemik hasarda nöronal apoptozu azaltarak etkili olabileceğini düşündürmektedir. (*Türk Ped Arş 2013; 48: 48-52*)

Anahtar sözcükler: Allopürinol, hiopksi-iskemi, kaspaz-3, kaspaz-8, yenidoğan sıçan

Summary

Aim: During reperfusion period of hypoxia-ischemia, cyclooxygenase and xanthine oxidase pathways are induced. A xanthine oxidase inhibitor, allopurinol has been shown to be neuroprotective in hypoxic- ischemic encephalopathy. Caspase-8 and caspase-3 have a key role in neuronal apoptosis. We aimed to test repeated doses of allopurinol's effect on caspase-3 and caspase-8 activities in newborn rats with hypoxic-ischemic encephalopathy.

Material and Method: Seven days old newborn rats were taken and there were 10 rats in each group. After Ethical Committee was approved (TIBDAM-25), rats were subjected to left carotid artery ligation and hypoxia (8% oxygen and 92% nitrogen) for two and half hours. Hypoxic ischemic rats treated with 24 mg/kg allopurinol 30 minutes and 12 hours (AL48 group), and 30 minutes, 12 and 24 hours (AL72 group) after hypoxic- ischemic insult. Twenty four hours after last dose, rats were decapitated. The others groups were sham and saline- treated hypoxic- ischemic (H-I) group. Caspase- 3 and caspase- 8 activities were measured in both hemispheres.

Results: There was no difference in caspase-3 and caspase-8 activities between right and left brain hemispheres in each group ($p>0.05$). Caspase-3 and caspase-8 activities were significantly lower in sham group when compared to H-I group, AL48 and AL72 groups (all of it, $p=0.0001$). Even though there were no difference activities of caspase-3 and caspase-8 between H-I group and AL48 group ($p>0.05$), activities of caspase-3 and caspase-8 in AL72 group were significantly lower than H-I group and AL48 group (respectively $p=0.0001$, $p=0.001$).

Conclusions: Decreased activities of caspase-3 and caspase-8 in AL72 group may suggest that totally dosage of 72 mg/kg allopurinol may be effective for reducing neuronal apoptosis in newborn rats with hypoxic-ischemic insult. (*Turk Arch Ped 2013; 48: 48-52*)

Key words: Allopurinol, caspase-3, caspase-8, hypoxic-ischemia, newborn rats

Giriş

Hipoksik iskemik ansefalopati yenidoğan dönemindeki ölüm ve uzun dönemde de nörolojik kayıpların en önemli nedenlerinden biridir (1,2). Hipoksik iskemide doymamış yağ asitlerinden zengin olan merkezi sinir sistemi dokuları enflamasyona ve oksidatif strese maruz kalır (3). Hipoksik iskemik özelliikle reperfüzyon döneminde ksantin oksidaz, nitrik oksit sentetaz ve prostaglandin üretiminin artışı serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkmasına neden olur. Serbest oksijen radikalleri, antioksidan koruyucu sistemlerinin kapasitesini aştıklarında lipit peroksidasyonu ile DNA ve protein yapılarının değişmesine, kaspazların aktivasyonuna yol açarak apoptoz ile hücre ölümüne neden olur (4,5).

Hipoksik iskemik sırasındaki serbest radikal oluşumu karmaşık bir süreçtir. Hipoksik iskemik sürecinde serbest radikal oluşumundaki en önemli metabolik yollardan birisi ksantin oksidaz/ksantin dehidrogenaz enzim sistemidir (6). Ksantin dehidrogenaz kalsiyumdan bağımsız bir proteaz tarafından ksantin oksidaza çevrilir (7). Reperfüzyon süresince ksantin oksidazın aktive olması ile ksantin ve hipoksantin artışı meydana gelir ve bu süreç oksijen varlığında serbest radikal üretimine neden olur (8). Deneysel hipoksik iskemik hayvan örneklerinde ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinölün hipoksik iskemik beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir (6,9-11). Ancak allopürinölün terapötik dozu, süresi ve başlama zamanı hakkında fikir birliği henüz yoktur (12,13).

Nöronal apoptoz hipoksik iskemik beyin zedelenmesinde esas rol oynar ve akut hipoksik iskemik ansefalopatiden sonra nöral dokunun kaybına katkıda bulunur. Nöronal apoptoz kaspaz kaskadının aktivasyonu ile başlar. Kaspaz kaskadı intrinsik ve ekstrinsik yol ile aktive olur. Ekstrinsik yolda plazma zarı üzerindeki ölüm almaçlarının uyarılması ile kaspaz-8 aktive olur. Kaspaz-8 nöronal apoptozda anahtar rol oynayan kaspaz-3'ü aktive eder (14-17). Yapılan çalışmalarda kaspaz inhibisyonunun nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (16).

Bu deneysel çalışmada hipoksik-iskemik oluşturulan yenidoğan sıçanlarda seçici olmayan ksantin oksidaz inhibitörü allopürinölün farklı dozlarda kullanımı sonrası beyin dokularında kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktiviteleri ölçülerek nöronal apoptoz üzerine muhtemel etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

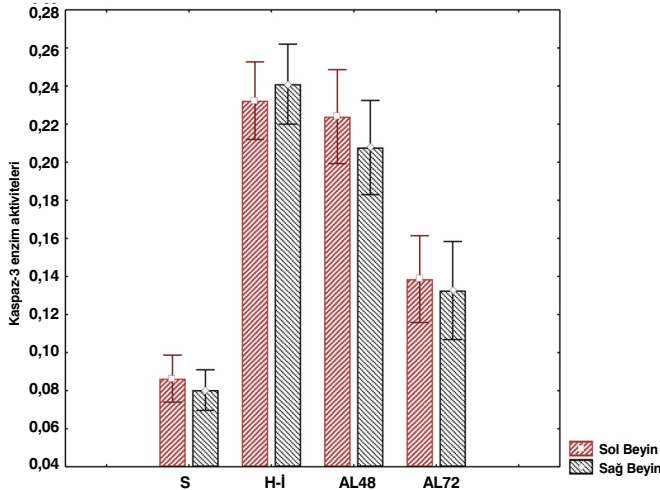
Gereç ve Yöntem

Bu çalışma, hipoksi-iskemi örneği oluşturulan yenidoğan Wistar-albino sıçanlar üzerinde yapıldı. Çalışma ile ilgili olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde oluşturulan etik kuruldan onay alındı.

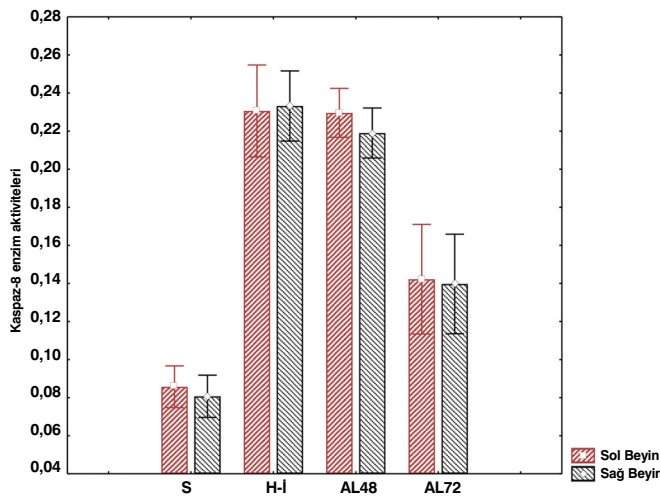
Her bir gruba rastgele on sıçan alındı. Gruplar sadece cerrahi işlem uygulanıp herhangi bir tedavi verilmeyen kontrol (S) grubu, serum fizyolojik (SF) verilen hipoksi-iskemi (H-İ) grubu, iskemik sonrası 30. dakika ve 12 saat sonra 24 mg/kg (toplam 48 mg/kg) allopürinöl tedavisi verilen tedavi (AL48) grubu ve hipoksi-iskemi sonrası 30. dakika, 12 saat ve 24 saat sonra 24 mg/kg (toplam 72 mg/kg) allopürinöl tedavisi verilen tedavi (AL72) grubu olarak belirlendi.

Sıçanların hipoksi-iskemi örneği için Levin (18) tarafından tarif edilen yöntem kullanıldı (18). Annelerinin yanında bulunan ve anne sütü ile beslenen sıçan yavruları yedi günlük olduklarında çalışmaya alındı. Eter anestezisi altında trakeanın hemen solundan uygulanan 0,5 cm'lik kesi ile sol arteriya karotis kommunis bulundu. 4/0 ipek dikiş ile arter iki tarafından bağlanılarak ortası kesildi. Anestezisi etkisi geçene kadar annelerinin yanına verilen sıçanlar beşerli gruplar halinde %8 oksijen, %92 nitrojen içeren bir kafeste 2,5 saat bekletildi. Bu işlemin ardından yarım saat oda havasında iyileşmeye bırakılan sıçanlara allopürinöl ve SF; periton içine uygulandı. Allopürinöl (Allopurinol flakon 5 g Sigma-Aldrich-USA) AL48 grubuna toplam 48 mg/kg doz olacak şekilde hipoksi-iskemi işlemi bittikten yarım saat ve 12 saat sonra olacak şekilde iki dozda, AL72 grubuna toplam 72 mg/kg doz olacak şekilde hipoksi-iskemi sonrası 30. dakika, 12 saat ve 24 saat sonra olacak şekilde üç dozda verildi. Hipoksi-iskemi grubuna ise sadece SF hipoksi-iskemi işlemi bittikten yarım saat sonra tek doz olarak uygulandı. Uygulamadan 24 saat sonra tüm gruplardaki sıçanlar hafif eter anestezisi altında kafası kesildi. Beyin hızlıca çıkarılarak sağ beyin hemisfer, sol beyin hemisfer ayrıldı, kuru buz içinde tutulan tüplere konuldu ve çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

Kaspaz-3, Caspase-3/PPP32 Colorimetric Assay Kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) ile, Kaspaz-8 ise FLICE/Caspase-8 Colorimetric Protease Assay Kit (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) ile kit içeriğinde açıklandığı



Şekil 1. Çalışma grubundaki sıçanların sol ve sağ beyin kaspaz-3 aktivitesi



Şekil 2. Çalışma grubundaki sıçanların sol ve sağ beyin kaspaz-8 aktivitesi

şekilde ölçüldü. Yöntem, işaretlenmiş substratın kırılmasıyla açığa çıkan kromofor p-nitroanilitin (pNA) spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. pNA miktarı 405 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) emilim değeri ölçülerek tayin edildi.

İstatistiksel analiz

Değişkenlerin normal dağılıp dağılmadığı kontrol edildi ve değişkenler normal dağılım gösterdiği için analizlerde değişken testler kullanıldı. Veriler SPSS 15 paket programına girilerek analizleri yapıldı ve grafikler STATISTICA 6.1'de yapıldı. P<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular

Yenidoğan sıçanların ortalama ağırlıkları 11,3±2,3 (8,2-16) g olup gruplar arasında cinsiyet ve ağırlık açısından istatistiksel farklılık yoktu (p>0,05).

Çalışma grubundaki sıçanlardan alınan sağ ve sol beyin kürelerinde kaspaz-3 kaspaz-8 aktivitesi çalışıldı. Grupların kendi içinde sol ve sağ beyin küresi kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (p>0,05) (Şekil 1 ve Şekil 2).

Kontrol grubundaki sıçanların sol ve sağ beyin küresi kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi H-İ grubu, AL48 grubu ve AL72 grubundaki sıçanların kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesine göre belirgin düşük bulundu (Tablo 1 ve Tablo 2) (hepsi için p=0,0001).

Hipoksi-iskemi grubundaki sıçanların sol ve sağ beyin küresi kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi ile AL48 grubundaki sıçanların kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi arasında fark yokken, AL72 grubundaki sıçanların kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesi belirgin düşük bulundu (Tablo 1 ve Tablo 2) (p>0,05, p=0,0001).

AL48 grubundaki sıçanlar AL72 grubundaki sıçanlarla karşılaştırıldığında, AL72 grubundaki sıçanların sol ve sağ beyin küresi kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesinin AL48 grubundaki sıçanların kaspaz aktivitesinden daha düşük olduğu saptandı (p=0,0001).

Tablo 1. Çalışma grubundaki sıçanların beyin kaspaz-3 aktivitesi (optik yoğunluk 405 nm)

Çalışma Grupları	n	Kaspaz-3 sol beyin yarım küresi Ort±SS	Kaspaz-3 sağ beyin yarım küresi Ort±SS	p
S	10	0,09±0,02*	0,08±0,02*	p>0,05
H-İ	10	0,23±0,03*#Ω	0,24±0,03*#Ω	p>0,05
AL48	10	0,22±0,04*&Ω	0,21±0,04*&Ω	p>0,05
AL72	10	0,14±0,03*#&	0,13±0,04*#&	p>0,05

*S ve H-İ, S ve AL48, S ve AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-3 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

H-İ ve AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-3 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

& AL48 ile AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-3 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

Ω H-İ ve AL48 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-3 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (p>0,05).

Tablo 2. Çalışma grubundaki sıçanların beyin kaspaz-8 aktiviteleri (optik yoğunluk 405 nm)

Çalışma Grupları	n	Kaspaz-8 sol beyin yarım küresi Ort±SS	Kaspaz-8 sağ beyin yarım küresi Ort±SS	p
S	10	0,09±0,02*	0,08±0,02*	p>0,05
H-İ	10	0,23±0,03*#Ω	0,23±0,03*#Ω	p>0,05
AL48	10	0,23±0,02*&Ω	0,22±0,02*&Ω	p>0,05
AL72	10	0,14±0,04*#&	0,14±0,04*#&	p>0,05

*S ve H-İ, S ve AL48, S ve AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

H-İ ve AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

& AL48 ile AL72 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptandı (p=0,0001).

Ω H-İ ve AL48 grubu sıçanlarda sol ve sağ beyin yarım küresi kaspaz-8 aktivitesi arasında istatistiksel farklılık saptanmadı (p>0,05)

Tartışma

Hipoksik-iskemik beyin hasarı, hipoksi-iskemi anında başlayıp canlandırma işlemi ardından iyileşme döneminde devam eden bir süreçtir. Akut dönemde selektif nöronal nekroz veya infarkt şeklinde gözlenen doku hasarı, nöron, gliya ve endotel hücre yapısının bozulması ile devam eder. İnfarkt alanına en yakın bölgede yer alan nöronlarda nekroz ya da programlanmış hücre ölümü yani apoptoz gelişir (2).

Ksantin oksidazın serbest radikaller için önemli bir kaynak olduğu bilinmektedir. Allopürinöl, ksantin oksidaz enzimlerinin önemli bir inhibitörü olup, hipoksantinden ksantin sentezini engeller ve serbest radikal süper oksidinin oluşumundan korur (8,19).

Beyin iskemisinden hemen sonra uygulanan allopürinölün koruyucu ve iyileştirici etkileri hakkında birkaç çalışma yapılmıştır (20-22). Yakın zamanda Güneş T ve ark. (22) asfiktik yenidoğan bebeklerde yaptıkları bir çalışmada serum NO düzeyinin asfiktik bebeklerde kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğunu ve beyin omurilik sıvısı NO düzeyinin ansefalopatının derecesi ile uyumlu olduğunu bildirmişler. Ayrıca allopürinöl ile tedavi ettikleri asfiktik yenidoğanların serum NO düzeylerinin azaldığını ve daha iyi nörolojik sonuçların olduğunu bulmuşlardır.

Palmer ve ark. (19), beyine hipoksi-iskemiden 15 dakika sonra allopürinöl uygulanmış genç farelerin beyin hasarlarının daha az olduğunu göstermiştir. Peeters-Scholte ve ark. (8) çalışmasında deneysel hipoksi uygulanan domuzlarda allopürinöl verilen grup, desferroksamin uygulanan grup ve kontrol grubu ile kıyaslandığında kaspaz-3 seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Çalışmada allopürinöl ve oksipürinöl düzeyleri 5-20 mg/L seviyeleri arasında seyretmiş olup, bu düzeylerde ksantin oksidaz seviyesini engellediği bilinmektedir. Yenidoğanlarda allopürinölün güvenli kullanılabilirliği halen tartışmalı olup daha çok çoklu tedaviler denenmiştir (12). Ayrıca kullanılan allopürinölün tedavi dozu, süresi ve başlama zamanı hakkında fikir birliği yoktur. Bizim çalışmamızda AL48 grubundaki yenidoğan sıçanlara 48 mg/kg, AL72 grubundaki sıçanlara 72

mg/kg dozda tek başına allopürinöl verilmiştir. Sağ ve sol beyin kaspaz-3 ve kaspaz-8 seviyeleri hipoksi-iskemi grubu ile kıyaslandığında 72 mg/kg dozda allopürinöl verilen grupta belirgin olarak düşük olduğu saptanmıştır.

Yaptığımız bu çalışmada allopürinölün toplam 72 mg/kg dozunda kullanıldığı AL72 grubunda sağ ve sol beyin dokularında kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeylerinin H-İ ve AL48 grubuna göre belirgin düşük olması allopürinölün hipoksik-iskemik ansefalopatide iskemi boyunca koruyucu etkisi olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma; hipoksik iskemik beyin hasarının önlenmesinde allopürinöl verilmesinin kaspaz-3 ve kaspaz-8 düzeylerini azaltarak etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu etkinin nöronal apoptozu azaltarak olduğu düşünülebilir, ancak hipoksik iskemik ansefalopatideki rollerinin daha iyi anlaşılabilmesi için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.

Çıkar çatışması: Bildirilmemiştir.

Kaynaklar

1. Perlman JM. Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatrics 2006; 117: 28-33.
2. Fatemi A, Wilson MA, Johnston MV. Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. Clin Perinatol 2009; 36: 835-58.
3. Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. Dev Neurosci 2001; 23: 198-202.
4. Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. Biol Neonate 2001; 79: 180-6.
5. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radic Biol Med 2000; 29: 323-3.
6. Boda D. Results of and further prevention of hypoxic fetal brain damage by inhibition of xanthine oxidase enzyme with allopurinol. J Perinat Med 2011; 39: 441-4.
7. Parks DA, Granger N. Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution, and physiology. Acta Physiol Scand Suppl 1986; 548: 87-99.
8. Peeters-Scholte C, Braun K, Koster J, et al. Effects of allopurinol and deferoxamine on reperfusion injury of the brain in newborn piglets after neonatal hypoxia-ischemia. Pediatr Res 2003; 54: 516-22.
9. Palmer C, Smith M, Williams GD. Allopurinol preserves cerebral energy metabolism during perinatal hypoxia-ischemia injury and reduces brain damage in a dose dependent manner. J Cereb Blood Flow Metab 1991; 11: 144-9.

10. Palmer C, Towfighi J, Roberts R, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rat. *Pediatr Res* 1993; 33: 405-11.
11. Marro PJ, Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of allopurinol on brain adenosine levels during hypoxia in newborn piglets. *Brain Res* 2006; 1073: 444-50.
12. Chaudhari T, McGuire W. Allopurinol for preventing mortality and morbidity in newborn infants with suspected hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 16: CD006817.
13. Kaandorp JJ, Benders MJ, Rademaker CM, et al. Antenatal allopurinol for reduction of birth asphyxia induced brain damage (ALLO-Trial); a randomized double blind placebo controlled multicenter study . *BMC Pregnancy Childbirth* 2010; 10: 8.
14. Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat* 2004; 28: 101- 5.
15. Zhu C, Wang X, Huang Z, et al. Apoptosis-inducing factor is a major contributor to neuronal loss induced by neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *Cell Death Differ* 2007; 14: 775-84.
16. Blomgren K, Zhu C, Wang X, et al. Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* 2001; 276(13) : 10191-8.
17. Hu BR, Liu CL, Ouyang Y, Blomgren K, Siesjö BK. Involvement of caspase-3 in cell death after hypoxia-ischemia declines during brain maturation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20(9): 1294-300.
18. Levine S. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. *Am J Pathol.* 1960; 36: 1-17.
19. Palmer C, Towfighi J, Roberts RL, Heitjan DF. Allopurinol administered after inducing hypoxia-ischemia reduces brain injury in 7-day-old rats. *Pediatr Res* 1993; 33: 405- 11.
20. Akdemir H, Aşık Z, Paşaoğlu H, Karaküçük I, Oktem IS, Koç RK. The effect of allopurinol on focal cerebral ischaemia: an experimental study in rabbits. *Neurosurg Rev* 2001; 24: 131- 5.
21. Kulah B, Besler HT, Akdag M, et al. The effects of verapamil vs. allopurinol on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. "An experimental study". *Hepatogastroenterology* 2004; 51(56): 401-7.
22. Gunes T, Ozturk MA, Koklu E, Kose K, Gunes I. Effect of allopurinol supplementation on nitric oxide levels in asphyxiated newborns. *Pediatr Neurol* 2007; 36(1): 17-24.