



Évaluation du stress oxydant après une ischémie cérébrale chez le rat

Sandy Berbak, Noémie Haddad, Zina Lanseur, Pauline Thiebot, Emmanuel
Curis, Dorota Desaulle, Isabelle Kousignian, Dominique Lerouet

► To cite this version:

Sandy Berbak, Noémie Haddad, Zina Lanseur, Pauline Thiebot, Emmanuel Curis, et al.. Évaluation du stress oxydant après une ischémie cérébrale chez le rat. *Acta discipulorum academiae medicamentariae artis*, 2018, 2, pp.15-19. hal-01877101

HAL Id: hal-01877101

<https://hal.science/hal-01877101>

Submitted on 19 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Évaluation du stress oxydant après une ischémie cérébrale chez le rat

Étudiantes : Sandy BERBAK, Noémie HADDAD, Zina LANSEUR, Pauline THIEBOT

Enseignants : Emmanuel CURIS, Dorota DESAULE, Isabelle KOUSIGNIAN, Dominique LEROUET

Résumé

Quatre-vingt pour cent des accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont d'origine ischémique, c'est-à-dire qu'ils sont causés par l'obstruction d'un vaisseau sanguin. Cette ischémie cérébrale est notamment responsable d'une production importante de radicaux libres à l'origine d'un stress oxydant. Pour lutter contre ce stress oxydant, l'organisme possède des systèmes antioxydants endogènes, tels que le glutathion.

Le but de ce travail est de quantifier les concentrations en glutathion total à différents temps dans le cerveau de rats ayant subi une ischémie cérébrale avec reperfusion.

Nos résultats montrent une diminution des concentrations en glutathion quelques heures après la reperfusion, puis une réaugmentation progressive jusqu'à une valeur normale en quelques jours. Le glutathion semble donc être un bon marqueur pour analyser l'évolution du stress oxydant lors de la reperfusion post-ischémique et son dosage pourrait être utilisé pour évaluer l'efficacité de stratégies anti-oxydantes dans ce modèle d'ischémie cérébrale chez le rat.

Mots-clés : Ischémie cérébrale, glutathion, stress oxydant

Introduction

L'accident vasculaire cérébral (A. V. C.) fait partie des maladies cardio-vasculaires, deuxième cause de mortalité en France après les cancers¹. Les séquelles engendrées par un A. V. C. sont la première cause de handicap acquis de l'adulte².

L'A. V. C. est lié à une diminution importante du débit sanguin cérébral et peut avoir deux origines : ischémique lorsqu'il est causé par l'obstruction d'un vaisseau par un caillot sanguin ou un débris de dépôt graisseux, ou hémorragique lorsqu'il est issu de la rupture d'un vaisseau, due à une malformation ou à un anévrisme. Près de 80 % des A. V. C. sont d'origine ischémique contre 20 % d'origine hémorragique³. Dans les deux cas, une prise en charge thérapeutique précoce est essentielle pour améliorer le pronostic et limiter les séquelles neurologiques engendrées par la diminution du débit sanguin cérébral. Les A. V. C. sont en effet à l'origine de déficits neurologiques plus ou moins sévères selon la structure lésée et la sévérité de la lésion : il peut s'agir d'une altération des fonctions motrices, de la mémoire ou du langage par exemple.

L'A. V. C. est donc un enjeu de santé publique de part sa morbidité et sa mortalité, et plus particulièrement l'A. V. C. d'origine ischémique, le plus fréquent. Celui-ci ne présente pas de traitement thérapeutique actuellement et les cliniciens ne disposent que d'un thrombolytique, l'activateur tissulaire du plasminogène recombinant (rt-PA), qui permet la lyse du caillot obstruant le vaisseau sanguin et ainsi la reperfusion des tissus ischémiés. Cependant, son utilisation reste très limitée (moins de 2 % des patients) en raison d'une fenêtre thérapeutique étroite (administration idéale au plus tard 4 h 30 après l'ischémie) et du risque de transformation hémorragique. Cette absence de traitement s'explique notamment par les diverses étiologies de l'AVC et la complexité des mécanismes physiopathologiques impliqués.

Physiopathologie de l'A. V. C.

La diminution du débit sanguin cérébral causée par l'AVC entraîne une diminution des apports en glucose et en oxygène. Cette hypoxie et ce manque de substrat énergétique ne permettent plus aux cellules de fonctionner correctement, ce qui se traduit par une diminution de la synthèse d'ATP (adénosine triphosphate) par les neurones (diminution de la glycolyse aérobie). Les canaux ioniques (sodium, potassium et calcium) dépendants de l'ATP ne sont ainsi plus fonctionnels. Ce déséquilibre ionique est à l'origine d'une libération massive de neurotransmetteurs excitateurs comme le glutamate (excitateur majoritaire du cerveau⁴).

Le glutamate accumulé dans la fente synaptique des neurones^{5,6,7} entraîne une suractivation de ses récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate) qui favorise un influx massif de sodium, d'eau et de calcium^{8,9}. Ainsi, les enzymes calcium-dépendantes (protéases dont caspases, lipases, NO-synthases [NOS], cyclo-oxygénases [COX]...) sont suractivées et responsables d'altérations structurelles et fonctionnelles^{10,11,12}, conduisant, d'une part, à un stress oxydant et donc à une mort par nécrose (mort prématurée ; elle concerne surtout les cellules proches de la lésion) et, d'autre part, à une mort par apoptose (mort programmée ; plus tardive, elle concerne les cellules plus éloignées de la lésion) des neurones^{13,14}. Ce phénomène est appelé excitotoxicité neuronale, c'est-à-dire une altération et une destruction des neurones suite à une hyperactivation par des neurotransmetteurs excitateurs. Le stress oxydant engendré est lié à une production excessive d'espèces chimiques très instables, appelées radicaux libres.

La reperfusion du vaisseau obstrué permet une reprise de l'irrigation des tissus ischémiés, mais a également des conséquences délétères, car elle entraîne une surproduction de radicaux libres^{15,16,17,18}.

Ce stress oxydant est responsable de mécanismes cytotoxiques (peroxydation des lipides membranaires, lésions de l'ADN...) conduisant à une mort cellulaire, et une activation du système immunitaire¹⁹. La production de médiateurs inflammatoires par les cellules lésées permet le recrutement de cellules gliales et immunes (macrophages, polynucléaires neutrophiles [PNN]), qui limiteront l'extension de la lésion et permettront une restauration du tissu^{20,21}. Cette inflammation, bien que favorable à la réparation de la lésion, aggrave aussi la situation en produisant des radicaux libres et des médiateurs inflammatoires (amplification du stress oxydant, figure 1).

En conditions physiologiques, les radicaux libres produits sont neutralisés par des systèmes antioxydants endogènes enzymatiques (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...). En raison de sa concentration intracellulaire élevée, le glutathion réduit (GSH) est l'un des principaux systèmes antioxydants utilisés par les cellules. En effet, la majeure partie (plus de 90 %) du glutathion intracellulaire se trouve sous forme réduite. La glutathion peroxydase permet d'éliminer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou les hydroperoxydes (LOOH) par oxydation du glutathion en glutathion oxydé (GSSG). Le GSSG est réduit à nouveau en GSH par la glutathion réductase en utilisant le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotique phosphate ; figure 2).

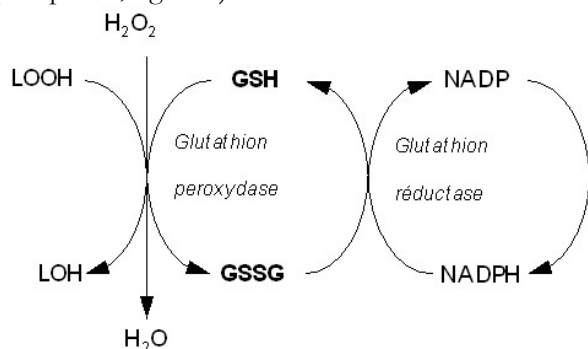


Figure 2. Le glutathion, système antioxydant endogène cellulaire

Mais les dysfonctionnements cellulaires provoqués par un AVC (inflammation, activation des COX et NOS, dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale...) ont pour conséquence une production de radicaux libres rapide et massive, pouvant dépasser les capacités des systèmes antioxydants physiologiques.

De nombreuses études^{22, 23, 24} ont montré que la réduction du stress oxydant pourrait être une stratégie thérapeutique dans le traitement d'un AVC ischémique, cependant aucune molécule n'est aujourd'hui disponible chez l'Homme.

L'objectif de cette étude est d'étudier la cinétique du glutathion comme témoin d'un stress oxydant dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat avec reperfusion.

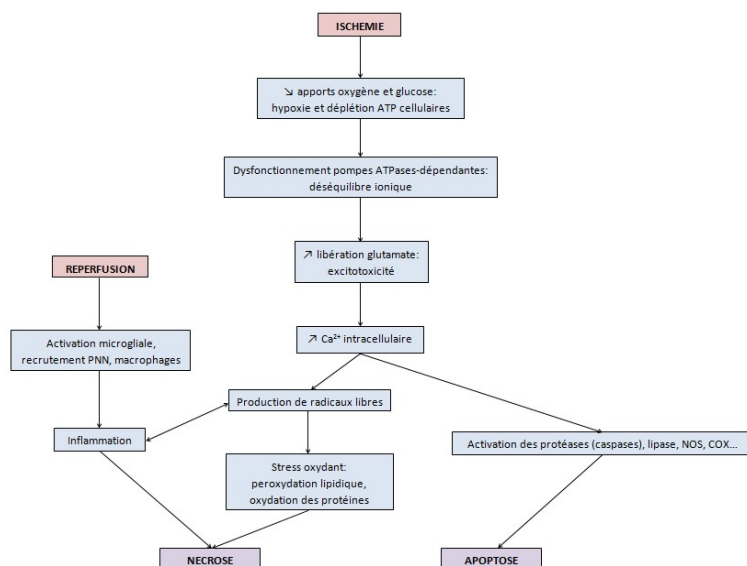


Figure 1. Mécanisme physiopathologique simplifié de l'AVC ischémique et de la reperfusion qui suit.

Matériel et méthodes

Modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat

L'expérience est réalisée sur 42 rats mâles Spragues-Dawley (Iffa Credo, France) d'un poids compris entre 300 et 330 g. L'expérience consiste à occlure l'artère carotide commune gauche et l'artère cérébrale moyenne gauche des rats à l'aide d'un microclip par craniotomie, puis de les déclamper au bout de deux heures afin de permettre la reperfusion des tissus. Ce modèle est à l'origine d'une lésion cérébrale corticale et striatale. L'occlusion des artères est réalisée par approche subtemporale²⁵.

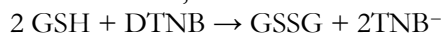
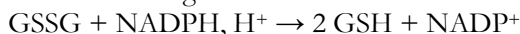
Dosage du glutathion total

L'évolution du stress oxydant lors de la reperfusion post-ischémique est mesurée par dosage du glutathion total dans la région ischémisée. Le glutathion total est dosé chez 6 rats naïfs, c'est-à-dire des animaux n'ayant subi aucune chirurgie, et chez des rats ischémisés et euthanasiés à différents temps post-reperfusion (6 rats à chaque temps défini : 30 min, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h et 7 j).

Les cerveaux prélevés sont découpés et le morceau utilisé pour le dosage est choisi selon des critères anatomiques précis, en aval de la zone chirurgicale. Les échantillons sont ensuite pesés et homogénéisés à 4 °C dans 5 volumes d'une solution d'homogénéisation à 5 % d'acide sulfosalicylique (Merck 1.00691, Fontenay-sous-Bois, France) contenant 0,5 mL d'acide éthylène-diaminetétracétique (EDTA, Sigma ED4SS). Les homogénats sont ensuite centrifugés 5 minutes à 10000 g à 4 °C. Les surnageants sont prélevés et congelés à -40 °C jusqu'au jour du dosage.

Le dosage se fait par réaction enzymatique cyclique en utilisant le système glutathion réductase-NADPH, H^+ couplé au réactif d'Ellman (acide 5,5'dithio-bis-2-nitrobenzoïque ou DTNB). Le

glutathion oxydé, GSSG, est réduit par la glutathion réductase. Le glutathion réduit, GSH, réagit avec le DTNB pour former le TNB^- , chromophore jaune dont on mesure la vitesse d'apparition par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 410 nm :



Les formules chimiques correspondantes sont données en annexe 2.

Sont utilisés pour le dosage une solution à 0,6 mM de β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (β -NADPH, forme réduite, Sigma N7505 ; **1**), une solution à 6 mM de DNTB (Sigma D8130 ; **2**) et une solution à 10 U/mL de glutathion réductase (Sigma G3664 ; **3**). Ces solutions sont préparées dans un tampon phosphate sodique à 141 mM (pH = 7,5) contenant 6,3 mM d'EDTA.

Le surnageant est dilué au 1/5 dans la solution d'homogénéisation, puis 5 μL de cette solution sont incubés dans un puits de microplaque avec 35 μL d'eau distillée, 140 μL de **1**, 20 μL de **2** et 40 μL de **3**. Une gamme d'étalonnage de 50 à 500 μM (en 6 points) est réalisée à l'aide de glutathion (Sigma G4251). L'absorbance de la solution est mesurée à 410 nm toutes les 15 secondes pendant 2 minutes par un lecteur spectrophotométrique de microplaques (Dynex technologies, MRX *microplaques reader*®, Sigma). Pour chaque puits, la pente de la cinétique de la réaction est calculée ($\Delta\text{DO}/2 \text{ min}$, où DO est la densité optique). Grâce à la gamme d'étalonnage, la valeur de cette pente est convertie en concentration de glutathion total (GSSG + GSH) contenue dans le surnageant. La quantité de glutathion total présente dans chaque échantillon est exprimée en nanomoles par gramme de tissu frais (nmol/g tissu frais).

Grâce aux mesures d'absorbance et à la gamme d'étalonnage, les différentes concentrations en glutathion total sont obtenues pour chaque temps de reperfusion.

Analyse statistique

Nous avons cherché à modéliser ces données expérimentales selon une fonction d'équation

$$f(t) = A + B(e^{-\alpha t} - e^{-\beta t})$$

Avec f la concentration en glutathion, t la durée de reperfusion et A , B , α et β les paramètres du modèle, tels que $A < 0$; A correspond à la valeur basale de la concentration en glutathion. Ce modèle a été ajusté par régression des moindres carrés non-linéaires, avec un modèle d'erreur additif gaussien. Les valeurs initiales ont été obtenues par la méthode des résidus. Les intervalles de confiance ont été obtenus par profilage.

Les données et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel R et sont fournis dans l'annexe 1.

Résultats

Les moyennes et écart-types des concentrations en glutathion dosées lors de l'expérience sont disponibles dans le tableau 1. Ces données expérimentales sont

Durée de reperfusion (h)	Concentrations en glutathion (nmol/g de tissu frais)	
	Moyenne	Écart-type
0	1555,0333	120,6328
0,5	918,6500	105,5508
3	401,8667	130,8118
24	398,0000	208,8703
48	273,2000	28,3513
72	746,4500	151,7627
168	1194,8333	154,692

Tableau 1. Concentrations en glutathion total en fonction du temps de reperfusion

6 rats par temps ; $t = 0$ correspond au groupe de rats naïfs

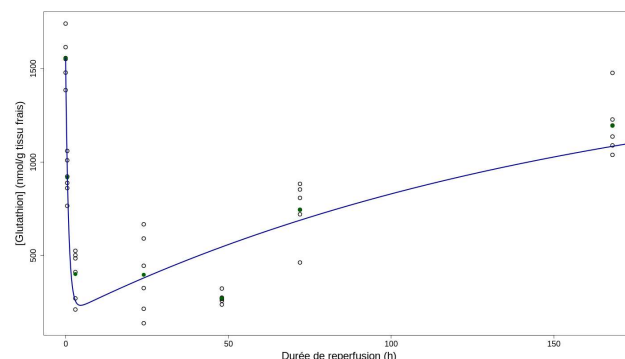


Figure 3 : Concentrations en glutathion en fonction de la durée de reperfusion.

Les points blancs correspondent aux mesures individuelles ; les verts représentent les moyennes des concentrations mesurées chez les 6 rats d'une durée de reperfusion donnée. Le trait continu correspond au meilleur modèle ajusté à ces données.

6 rats par temps ; $t = 0$ correspond au groupe de rats naïfs

Paramètre	Estimation	Intervalle de confiance
A (nmol/g)	1557,1209	[1406,9 ; 1707,4]
B (nmol/g)	-1369,3	[-1556,8 ; -1181,8]
α (h^{-1})	1,13	[0,6 ; 1,6]
β (h^{-1})	0,0063	[0,0040 ; 0,0087]

Tableau 2. Paramètres du modèle des concentrations en glutathion total en fonction du temps de reperfusion.

représentées sur la figure 3, avec le modèle obtenu. Les valeurs obtenues des paramètres de ce modèle sont indiquées dans le tableau 2, ainsi que leurs intervalles de confiance à 95 %.

Les résultats obtenus montrent une chute rapide des concentrations en glutathion total dans le cerveau des rats ischémiés dès 30 minutes et jusqu'à 4,6 heures après reperfusion. À partir de 4,6 heures et jusqu'à 7 jours de reperfusion, les concentrations en glutathion dans la région ischémiée augmentent jusqu'à une valeur normale. En effet, au bout de 7 jours, on observe des valeurs de concentration en glutathion similaires à celles des animaux naïfs.

Discussion

Ce travail a permis d'étudier la cinétique du glutathion total comme marqueur de stress oxydant dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat. En effet le glutathion intervenant dans les mécanismes antioxydants endogènes, une chute de sa concentration signe la survenue d'un stress oxydant. Par ailleurs, le GSH représentant plus de 90 % du glutathion total, les formes oxydée et réduite du glutathion n'ont pas été séparées dans l'étude. Grâce à nos résultats, nous avons examiné la cinétique d'apparition du stress oxydant dans la région ischémisée durant les heures suivant la reperfusion. Ainsi, la diminution de la concentration en glutathion observée révèle une augmentation majeure du stress oxydant, avec un pic à 4,6 h post-reperfusion. Ensuite, le glutathion revient progressivement à des valeurs comparables à celles des rats naïfs au bout de 7 jours. Cette augmentation pourrait être due à une diminution de la production de radicaux libres ou à une augmentation de leur clairance. Une synthèse accrue de glutathion pourrait également être envisageable, avec un délai de mise en route d'environ 4,6 heures. Le glutathion semble donc être un système antioxydant utilisé rapidement par les cellules pour protéger le tissu cérébral. À partir de 48 heures post-reperfusion, d'autres systèmes pourraient intervenir pour lutter contre le stress oxydant, permettant ainsi une régénération plus importante du glutathion. Cette cinétique de concentrations en glutathion au cours de la reperfusion semble être un bon marqueur du stress oxydant tissulaire développé à la suite d'un AVC ischémique.

Le modèle expérimental utilisé présente cependant quelques limites. La chirurgie subie par les animaux (craniotomie), à l'exception de l'occlusion des artères, est elle-même une source potentielle de stress oxydant

pour le tissu cérébral et contribue sûrement à la consommation de glutathion. Il aurait donc été intéressant de doser le glutathion chez des animaux témoins-opérés pour chaque temps étudié, c'est-à-dire des animaux ayant subi toute la chirurgie sans clampage des artères. Cela aurait permis d'évaluer le stress oxydant lié uniquement à l'ischémie cérébrale.

D'autre part, cette expérience ne peut être reproduite chez l'Homme, le dosage de glutathion cérébral nécessitant un prélèvement d'échantillons cérébraux.

Enfin, il existe une grande hétérogénéité dans le choix des marqueurs de stress oxydant à la suite d'une ischémie cérébrale, car la plupart présentent des variations différentes selon les études (augmentation ou diminution des activités enzymatiques antioxydantes^{26,27,28,29}). La majorité des études menées utilisent donc au moins deux marqueurs^{30,31}. Le dosage d'un autre marqueur aurait pu accompagner le dosage du glutathion dans cette étude, afin de renforcer l'interprétation de la cinétique de ce dernier.

Conclusion

La cinétique du glutathion dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez le rat semble être un bon outil pour suivre l'évolution du stress oxydant. Pendant les premières heures de reperfusion, les concentrations de glutathion sont très basses, signe que le tissu cérébral lutte, afin d'éliminer la surproduction de radicaux libres. Le dosage du glutathion pourrait donc être utilisé comme marqueur de stress oxydant post-AVC et permettre d'évaluer l'efficacité de stratégies antioxydantes comme l' α -phényl-*tert*-butyl-nitrone (PBN)³² ou la N-acétylcystéine³³. Cependant d'autres techniques de dosages devront être utilisées pour une application humaine, comme par exemple la spectroscopie par résonance magnétique.

Bibliographie

- 1 Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès. Interrogation des données sur les causes de décès de 2015. <http://www.cephdc.inserm.fr/inserm/html/index2.htm>, consulté le 17/03/2018.
- 2 Blanc-Labarre C, Delpond B, Hervieu-Bègue M, Osseby GV, Ricolfi F, Thouant P, Giroud M, Béjot Y (2017) Acute management of ischemic stroke in 2017. *Rev Med Interne* S0248-8663 (17)30602-1.
- 3 Ovbiagele B, Nguyen-Huynh MN (2011) Stroke epidemiology: advancing our understanding of disease mechanism and therapy. *Neurotherapeutics* 8:319-329.
- 4 Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115:157-188.
- 5 Bosley TM, Woodhams PL, Gordon RD, Balazs R (1983) Effects of anoxia on the stimulated release of amino acid neurotransmitters in the cerebellum *in vitro*. *J Neurochem* 40:189-201
- 6 Drejer J, Benveniste H, Diemer NH, Schousboe A (1985) Cellular origin of ischemia-induced glutamate release from brain tissue *in vivo* and *in vitro*. *J Neurochem* 45:145-151.
- 7 Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I, Hamberger A (1985) Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:413-419.
- 8 Berdichevsky E, Riveros N, Sanchez-Armass S, Orrego F (1983) Kainate, N-methylaspartate and other excitatory amino acids increase calcium influx into rat brain cortex cells *in vitro*. *Neurosci Lett* 36:75-80.

- 9 Jancso G, Karcsu S, Kiraly E, Szebeni A, Toth L, Bacsy E, Joo F, Parducz A (1984) Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium. *Brain Res* 295:211-216.
- 10 Tremblay ME, Stevens B, Sierra A, Wake H, Bessis A, Nimmerjahn A (2011) The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci* 31:16064-16069.
- 11 Biesmans S, Meert TF, Bouwknicht JA, Acton PD, Davoodi N, De Haes P, Kuijlaars J, Langlois X, Matthews LJ, Ver Donck L, Hellings N, Nuydens R (2013) Systemic immune activation leads to neuroinflammation and sickness behavior in mice. *Mediators Inflamm* 271-359.
- 12 Hernandez-Ontiveros DG, Tajiri N, Acosta S, Giunta B, Tan J, Borlongan CV (2013) Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol* 4:30.
- 13 Yamashima T (2004) Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* 36:285-293.
- 14 Li J, Yuan J (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene* 27:6194-6206.
- 15 Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:196-205.
- 16 Li J, Zhang H, Zhang C (2012) Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: mechanisms and therapeutic implications. *J Mol Cell Cardiol* 52:865-872.
- 17 Olmez I, Ozyurt H (2012) Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. *Neurochem Int* 60:208-212.
- 18 Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FJ, Salom MG (2013) Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 19:2776-2794.
- 19 Eltzschig HK, Eckle T (2011) Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med* 17:1391-1401.
- 20 Kumar A, Loane DJ (2012) Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* 26:1191-1201.
- 21 Xanthos DN, Sandkuhler J (2014) Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 15:43-53.
- 22 Fabian RH, Derry PJ, Rea HC, Dalmeida WV, Nilewski LG, Sikkema WKA, Mandava P, Tsai AL, Mendoza K, Berka V, Tour JM & Kent TA (2018) Efficacy of Novel Carbon Nanoparticle Antioxidant Therapy in a severe middle cerebral artery stroke in acutely hyperglycemic rats. *Front Neurol* 3:199.
- 23 Godunova AR, Rakhimova AA, Leontyeva OI, Talipova IG, Yakhin RM, Musin SG (2018) An influence of submaximal doses of mexidol on oxidant stress and inflammation in the acute period of ischemic stroke. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova* 118(2):27-30.
- 24 Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK (2017) Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Exp Neurol* 288:25-37.
- 25 Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1(1):53-60.
- 26 Aygul R, Kotan D, Demirbas F, Ulvi H, Deniz O (2006) Plasma oxidants and antioxidants in acute ischaemic stroke. *J Int Med Res* 34:413-8.
- 27 Zimmermann C, Winnefeld K, Streck S, Roskos M, Haberl RL (2004) Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk. *Eur Neurol* 51:157-61.
- 28 Cojocaru IM, Cojocaru M, Sapira V, Ionescu A (2013) Evaluation of oxidative stress in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* 51:97-106.
- 29 Ozkul A, Akyol A, Yenisey C, Arpacı E, Kiyioglu N, Tataroglu C (2007) Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 14:1062-6.
- 30 Dohare P, Hyzinski-Garcia MC, Vipani A, Bowens NH, Nalwalk JW, Feustel PJ, Keller RW Jr, Jourdain D, Mongin AA (2014) The neuroprotective properties of superoxide dismutase mimetic tempol correlate with its ability to reduce pathological glutamate release in a rodent model of stroke. *Free Radic Biol Med* 77:168-182.
- 31 Milallioğlu A, Aslan M, Ozkol H, Cilingir V, Nuri Aydın M, Karadas S (2016) Serum antioxidant enzymes activities and oxidative stress levels in patient with acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *Wien Klin Wochenschr* 128(5-6):169-74.
- 32 Margail I, Plotkine M, Lerouet D (2005) Antioxidant strategies in the treatment of stroke. *Free Radic Biol Med* 39(4):429-43.
- 33 Moss H, Brown T, Wiest D, Jenkins D (2018) N-acetylcysteine rapidly replenishes central nervous system glutathione measured via magnetic resonance spectroscopy in human neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* doi:10.1177/0271678X18765828.