

**T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Tufan HİÇDÖNMEZ

**DENEYSEL OMURİLİK TRAVMA MODELİNDE  
N-ASETİLSİSTEİN'İN SEKONDER HASARIN  
ÖNLENMESİNDEKİ YERİ**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Turgay PARSAK**

EDİRNE - 2006

## **TEŐEKKÜR**

Uzmanlık eğitimim süresince yetiŐmemde büyük emekleri olan Sayın Prof. Dr. Sebahattin Çobanoğlu, Yrd. Doç. Dr. M. Kemal Hamamcıoğlu, Yrd. Doç. Dr. Cumhuri Kılınçer, Yrd. Doç. Dr. Osman ŐimŐek, tez danıŐmanım Yrd. Doç. Dr. Tufan Hiçdönmez' e, histopatolojik çalıŐmalarına yardım eden Doç. Dr. Mehmet Kanter'e, biyokimyasal çalıŐmalarına yardım eden Yrd. Doç. Dr. Nurettin Aydoğdu'ya ve ayrıca tüm çalışma arkadaşlarıma, sevgili eŐim Dilek' e, beni yetiŐtiren anne ve babama teŐekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>2</b>
<b>TARİHÇE .....</b>	<b>2</b>
<b>OMURİLİK YARALANMASININ FİZYOPATOLOJİSİ .....</b>	<b>2</b>
<b>LEZYON BÖLGESİNDE PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER.....</b>	<b>7</b>
<b>SERBEST RADİKALLER.....</b>	<b>9</b>
<b>SERBEST RADİKALLERİN HÜCRESEL ETKİLERİ.....</b>	<b>11</b>
<b>ANTIÖKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI.....</b>	<b>12</b>
<b>N-ASETİLSİSTEİN .....</b>	<b>13</b>
<b>GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>16</b>
<b>BULGULAR.....</b>	<b>21</b>
<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>25</b>
<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>29</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>31</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>32</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>34</b>
<b>EKLER</b>	

## SİMGE VE KISALTMALAR

<b>AMPA</b>	: Amino 3 hidroksi -5- Metil -4- İsoksazol propionik asit
<b>EAA</b>	: Eksitator aminoasit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>MDA</b>	: Malonildialdehid
<b>NAC</b>	: N-Asetilsistein
<b>NMDA</b>	: N-metil D-aspartat
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süperoksit radikali
<b>PSS</b>	: Periferik sinir sistemi
<b>SDS</b>	: Sodyum dodesil sülfat
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asid

## GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik yaralanmaları, oluşturduğu sonuçlar bakımından, insanlığın henüz kontrol altına alamadığı büyük bir sorundur. Bu tür yaralanmalar kişinin sakat kalmasına ve hatta yaşamını yitirmesine yol açabilir. Üst seviyelerdeki omurilik yaralanmaları sonucu uzun süre yoğun bakımda kalma gereksinimi, hayati tehlikeyi atlama ve omurga stabilizasyonun sağlanması sonrası uzun rehabilitasyon dönemi, araya giren sekonder sorunlar ve tüm mevcut tedavilere rağmen tam bir iyileşme sağlanamaması önemli bir sorun olarak güncelliğini korumaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarla, omurilik yaralanmalarının fizyopatolojisinin aydınlatılması yönünde oldukça büyük yol katedilmesine rağmen, henüz tam etkin bir tedavi ortaya konulamamıştır. Son çalışmalar, omurilik yaralanması sırasında oluşan primer hasardan çok bunu takip eden dönemde ortaya çıkan sekonder hasarın prognostik açıdan son derece önemli olduğunu ortaya koymuştur. Sekonder hasarda serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu büyük bir öneme sahiptir. Giderek artan sayıdaki deneysel çalışmalarda serbest oksijen radikallerinin omurilikteki zararlı etkileri daha iyi anlaşılmış, bu radikallerin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlayan serbest radikal temizleyicileri “free radical scavengers” ve antioksidan maddelerin tedavide olumlu etkileri deneysel olarak gösterilmiştir.

Bir glutatyon prekürsörü olan N-asetilsistein’in birçok sistem üzerinde antioksidan özelliği deneysel çalışmalar ile belirlenmiştir. Ancak nörotravma üzerine olan etkisi yeterince aydınlatılamamıştır.

Bu çalışmada, deneysel omurilik travma modelinde N-asetilsistein’in sekonder hasar üzerindeki nöroprotektif etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

## **GENEL BİLGİLER**

### **TARİHÇE**

Omurilik yaralanmalarının standardize edilmeleri ve kantitatif olarak ölçülmesi ilk kez 1911 yılında Allen tarafından uygulanarak, ağırlık düşürme yöntemiyle kedilerde yapılan çalışmada 300 g/cm'lik travmanın geçici, 400 g/cm'nin ise kalıcı paraplejiye neden olduğu saptamıştır. Özellikle, Allen köpekler üzerinde yaptığı çalışmalar ile omurilik travmalarının patofizyolojisinde günümüzde de geçerliliğini koruyan primer ve sekonder yaralanma ayırımından bahsetmiş, ayrıca travma bölgesinde oluşan hemorajik nekrotik alanda yaralanmayı artıran -zararlı madde- olarak isimlendirdiği bir madde tanımlamıştır. 1927 yılında Ferraro tavşanların sırtına demir çubukla vurarak travma oluşturmuş ve ilk 6 günde değişik zaman dilimlerinde oluşan değişiklikleri kaydetmiş, birinci saatte aksonlarda şişme, on ikinci saatte myelin kılıfında değişiklikler, dört gün içerisinde ak maddede dejenerasyon, ön boynuz hücrelerinde değişiklik ve reaktif gliosis oluştuğunu gözlemlemiştir (1-3).

Son çeyrek yüzyıldır yapılan çalışmalar ve tıbbi teknolojideki ilerlemeler sayesinde sekonder yaralanmanın en az primer yaralanma kadar önemli olduğu saptanmıştır (4-12). Tator ve Fehlings'in yaptıkları çalışmalar ile sekonder yaralanma sonucu oluşan vasküler, elektrolit dengesi, biokimyasal ve enerji metabolizmasına ait değişiklikler ortaya konarak, sekonder yaralanmanın önemine dair önemli bilgiler elde edilmiştir (13).

### **OMURİLİK YARALANMASININ FİZYOPATOLOJİSİ**

Omurilikte görülen ilk (primer) hasar, dakikalar içinde oluşan ve günler veya haftalar boyunca devam eden moleküler ve hücrel değişimler zincirini tetikler. Bunu takip eden

sekonder hasar zincirinin durdurulması için nöral dokunun korunması (nöroproteksiyon) önemlidir. Hasarlı nöronların yaşamlarına devam etmeleri, aksonların uygun hedeflere uzanması ve sonuçta fonksiyonel sinapsların oluşması ise rejenerasyon sürecindeki esas basamaklardır. İnsanda, periferik sinir sisteminde (PSS) spontan aksonal rejenerasyon varken, santral sinir sistemi (SSS) rejenere olmaz. Otopsi çalışmaları, omurilik yaralanmalarının çoğunda klinik olarak tam yaralanma olsa dahi, omuriliğin anatomik olarak sağlam kaldığını göstermiştir. Ayrıca, deneysel çalışmalar, spinal aksonların %12 kadar az bir oranın korunmasının, nörolojik iyileşmeyi destekleyeceğini göstermektedir. Böylece, hasarlı bölgeyi geçebilen fonksiyonel akson oranını artıran ya da bu aksonlardan gelen zayıf uyarılara alt motor nöronların yanıtını artırıcı her türlü girişim, nörolojik iyileşmede belirgin etki gösterebilir (14).

Omurilik yaralanmalarında en etkin tedavi, sekonder hasarın önlenmesidir. Omurilik yaralanmasında sekonder hasarın önlenmesi için hedefler: glutamaterjik, kolinerjik ve katokolinerjik nörotransmisyon sistemleri, serbest radikal üretiminin engellenmesi, lipid peroksidasyon, kalsiyum ve diğer iyon kanalları, büyüme faktörleri, nörotrofik faktörler, inflamasyon süreci, endojen opioid reseptörleri, enzimler, apoptotik hücre ölümü ve rejenerasyon mekanizmalarıdır (14).

### **Primer Hasar**

Primer yaralanma mekanizmaları içerisinde en sık görüleni darbe ve basının birlikte etkileridir. Omurilikte oluşan yaralanma miktarında basıdan çok darbe etkeninin daha etkili olduğu bilinmektedir (2,14-19).

Travma sonucu omurilikte primer hasarın oluşumunda omuriliğin maruz kaldığı mekanik travmanın şekli ve etkinliğinin anlaşılması amacıyla Thomas E. Anderson'nun ağırlık düşürme ve klip kompresyon yöntemiyle yaptığı deneysel çalışmada, travma etkeninin omuriliğe dokunma hızı ile bası miktarının omurilik üzerinde oluşturduğu yaralanmanın fonksiyonel özellikleri belirlenmiştir. Bunun sonucunda, dokunma hızlarının artırılması ile uyarılmış potansiyel dalgalarında hafif bir etkilenme olduğu, kompresyon miktarının artırılmasıyla ise uyarılmış potansiyel dalgalarının bozuldukları görülmüştür (2,15-23).

### **Sekonder Hasar**

Omurilik yaralanmasında iki basamaklı mekanizma kavramı Allen'in 1900'lerin başlarında, omurilik travmalı hayvanlarda ilerleyici hasar oluştuğunu göstermesi ile ortaya

atılmıştır (10). Dohrmann ve Wick'in (24) 1971 yılında yaptıkları deneysel çalışmada travma oluşturulan omurilikten çeşitli zaman dilimlerinde alınan parçaların elektron mikroskopik incelemesinde; ilk 5. dakikada gri madde içerisinde yer alan venüllerde değişikliklerin başladığı ancak aksonlarda herhangi bir değişimin olmadığı izlenmiş, travmadan sonraki 15 ile 30 dakika arasında yapılan kesitlerde postkapiller ve musküler venüllerin perivasküler bölgelerinde eritrosit ekstrasvazasyonu ile küçük hemorajiler olduğu ve bazı aksonal değişikliklerin başladığı tesbit edilmiştir. Travmadan sonraki 4. saatte myelin kılıfında yırtılmalar, aksonal dejenerasyon ve iskemik endotelial yaralanmalar görülmekte ve takip eden 5 gün içerisinde aksonal değişiklikler ilerleyerek nekrotik odakların oluşması ve kist formasyonu ile sonuçlanmaktadır.

Omurilik yaralanmasının patofizyolojisindeki sekonder hasar mekanizmaları Tablo 1' de gösterilmiştir.

**Tablo 1. Omurilik yaralanmasının patofizyolojisindeki sekonder hasar mekanizmaları (25)**

<b>Sistemik etkiler ( Nörojenik şok)</b>
Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi
Kan basıncı kısa süreli hipertansiyon, daha sonra uzun süreli hipotansiyon
Periferik dirençte azalma
Kalp debisinde azalma
<b>Omurilik mikrodolaşımında lokal vasküler hasar</b>
Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
Kanama (özellikle gri cevherde)
Mikrodolaşımında kayıp, mekanik, tromboz, vazospazm
<b>Biyokimyasal değişiklikler</b>
Serbest radikal üretimi
Lipid peroksidasyon
Eksitotoksisite (glutamat)
Nörotransmitter birikimi
Endojen opioidler
Katekolaminler (noradrenalin, dopamin)



**Tablo 1.' in devamı**

Araşidonik asit salınımı
Eikosanoid üretimi
Prostaglandinler
Sitokinler
<b>Elektrolit kaymaları</b>
İntrasellüler kalsiyumda artış
İntrasellüler potasyumda artış
İntrasellüler sodyumda artış
<b>İnflamatuvar Cevap</b>
Serbest radikal üretimi
Akson yıkımı
Miyelin artıklarının uzaklaştırılması
Sitokinlerin salınımı
Glial hücre aktivasyonu
Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler
Waller dejenerasyonu
<b>Ödem</b>
<b>Apoptozis</b>
<b>Enerji Metabolizmasında Kayıp</b>
Azalmış ATP üretimi

### **Sekonder Hasar Oluşumunu Etkileyen Faktörler**

**İyon mekanizmaları:** Tüm nöronal yaralanmaların patogeneğinde temel mediatör olarak rol oynayan faktör hücre içerisinde miktarı oldukça artan serbest kalsium iyonlarıdır. Kalsium travma sonrası kısa ve uzun süre içerisinde yaptığı etki ile nöronal fonksiyon ve sonradan oluşacak olan reorganizasyonda önemli derecede etkilidir (4,10,11,26-28).

**Eksitator aminoasitler:** Omurilik yaralanması sonrası eksitator aminoasitlerden (EAA) glutamat ve aspartat dakikalar içinde hızla yükselir. EAA hasarında, hücre içinde sodyum ve kalsium artışı hücre şişmesi ile proteazlar, kinazlar ve fosfolipazlar gibi kalsium bağımlı olayların başlamasına neden olur. Kafa travmasında en güçlü eksitotoksik etki NMDA reseptörleri aracılığıyla olurken, travmatik omurilik yaralanmasında AMPA ve kainat gibi non-NMDA reseptörleri üzerinden olmaktadır (14).

**Opiat reseptörleri:** Opiat reseptör blokajının ilerleyici doku hasarını önlemesi, sekonder yaralanma patofizyolojisinde endojen opioidlerin rolü olabileceğini düşündürmüştür (14).

**İnflamatuvar cevap:** Omuriliğin travmatik yaralanması sonrası enflamasyon cevabı saatler içinde başlar. Bu cevap endotel hasarı, enflamasyon mediatörlerinin salınımı, vasküler permeabilite artışı, ödem gelişimi, periferel inflamatuvar hücrelerinin göçü ve mikroglialın aktivasyonu olarak gözlemlenir. Polimorfonükleer granülositler lezyon bölgesini ilk birkaç saat içerisinde infiltre etmeye başlar. birinci günde en üst değerine ulaşır ve üçüncü günde kaybolurlar. İkinci dalgada yaralanma bölgesine migrasyon gösteren periferel hücreler monosit, makrofaj ve mikroglial gruptur.

Metilprednizolon, PAF antagonistleri, siklooksigenaz ve lipogenazların hepsi etkilerini inflamatuvar cevapları kısmen azaltarak ya da tamamen inhibe ederek göstermektedirler (14,29,30).

**Vasküler mekanizmalar ve endotel hasarı:** Tator ve Fehlings'in (13) 1991 yılında koloidal karbon anjiyografi yöntemiyle yaptığı deneysel çalışmada şiddetli travma sonrası omurilikten 15. dakika, 2. ve 24. saatlerde aldığı kesitlerde hem travma bölgesinde hem de travma bölgesinin kranial ve kaudal bölgelerinde yer alan venüllerde, kapiller yapılarda ve arteriollerde yetersiz dolum olduğunu tesbit etmiştir. Postravmatik iskeminin kesin nedeni tam olarak bilinmemektedir. Yaralanmayı oluşturan mekanik travma, vazoaaktif aminlerin salınımı, hemoraji, trombozis, trombosit agregasyonu, endotel hasarı ve şişme vazospazmı tetikleyebilir. Bir nörotransmitter ve eksitator aminoasit olan Glutamatın da sekonder vasküler yaralanmada etkisi olduğu düşünülmektedir. Glutamat reseptörlerinin uyarılmaları sonucu sodyum hücre içine toplanarak sitotoksik ödeme yol açar. Ayrıca hücre içi kalsium konsantrasyonunun artması sonucu hücre yıkımı gelişir (4,26,27). Endoteldeki NMDA reseptörlerinin blokajı ile hücre içi kalsium blokajı önlenir. Bir NMDA reseptör blokajı olan MK-801 in omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (13,14).

**Apoptozis:** Apoptozis ölen hücrenin fagositozu ile sonuçlanan, nükleer kromatinin kondansasyonu, sitoplazmik organellerin paketlenmesi ve plazma membranında değişiklikler ile karakterize bir hücre ölümü çeşididir. Apoptozis intrasellüler proteolitik bir süreç tarafından regüle edilir. Primer olarak sistein proteinlerinden oluşan kaspas ailesinin üyelerinin proteolitik olarak birbirlerini ve birçok intrasellüler anahtar hedef proteinini bölerek aktiflemesi ile hücre ölümünün gerçekleştirilmesi esasına dayanır (14,31).

Yakın zaman önce yapılan çalışmalar antiapoptotik ajanların nöroprotektif olabileceğini göstermiştir. Li ve ark. (32) akut omurilik yaralanmasından sonra kaspas-1 ve kaspas-3 inhibisyonunun lezyon boyutunu küçülttüğünü ve nörolojik iyileşmeye neden olduğunu gösterdiler. Ancak Ozawa ve ark. (33) ratlarda omurilik yaralanması sonrası uygulanan caspase blokerleri gibi apoptotik inhibitörlerin apoptozu önlemediği, histolojik ve klinik düzelmeye neden olmadığını göstermişlerdir. Omurilik yaralanmalarında apoptoz inhibitörlerinin denenmesi çok yenidir. Omurilik yaralanmasında apoptoz mekanizmasının anlaşılması ve peptid olmayan apoptoz inhibitörlerinin geliştirilmesi ile ileride daha başarılı sonuçlar alınabilir.

## **LEZYON BÖLGESİNDE PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER**

Omurilikte travmayı takiben başlayan sekonder hasar süreci akut, subakut, geç faz olarak sınıflanabilir.

### **Akut Faz (Hemorajik nekroz)**

Yaralanmadan sonraki ilk değişiklik omurilik gri cevher mikrovaskülaritesindeki ilk değişikliklerdir. Santral kanal etrafı ve ön boynuzdaki multifokal peteşial hemorajiler saatler içinde radial olarak yayılma eğilimindedirler. Mikrotrombüslerin gözlenmesi ve kanın ekstravaze olması ilk 24 saatte belirginleşir. Yaralanmadan dakikalar sonra endotel bileşikleri açılmaya başlar. Santral peteşiler genişledikçe glial reaksiyon ve nöronal dejenerasyon belirgin hale gelir. Gri cevherdeki nekrotik değişiklikler ilk saatlerde artar, 8. saatten sonra beyaz cevhere yayılmaya başlar. hücre içi kalsiyum artışı sonucu nükleazlar, proteazlar, kinazlar, lipazlar ve NO sentetazın aktivasyonu ile hücre hasarı artar ve hücre ölümü nekroz yada apoptoz şeklinde gerçekleşir (14).

### **Subakut Faz**

Aktive olmuş mikrogliya ve astrositler reaktif gliozis oluşturmaya başlarlar. Mikrogliya, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Bu hücreler lezyon merkezinde çalışırlar ve nadiren yayılırlar. Yaralanmaya cevap olarak astrositler hipertrofi ve proliferasyon gösterirler. Reaktif astrositler birinci haftada lezyon yanında birikmeye başlar. Astrositik cevap 14. günde en fazla iken, 28. güne kadar görülebilir. Yaralanmış kan-omurilik bariyerine bağlı ödem formasyonu, yaralanmadan sonra erken saatlerde başlar, radial ve longitudinal olarak ilerler, ilk 24 saatte belirginleşir. 8. güne kadar süren ödem hidrostatik veya filtrasyona bağlıdır. Ödem, pia elastisitesi olmadığı için vasküler rezistansın artmasına ve dolayısı ile omurilik kan akımının azalmasına neden olur. Enflamatuvar hücrelerin yaralı omuriliğe göçünde iki dalga vardır. Birincisinde, polimorfonükleer granulositler yaralanmadan saatler sonra lezyon bölgesine gelerek sitotoksik etkileri ile nöronofaji yapabilirler. 24 saatte maksimum düzeye ulaşırlar, 3. günde kaybolurlar. İkinci dalgada, lezyon bölgesine monosit ve gelir, hücre debrisini fagosite ederler. Schwann hücreleri, meningeal hücreler ve fibroblastlar lezyon bölgesine göç eden diğer periferik hücrelerdir (14).

### **Geç Faz**

Yaralanmadan haftalar ve aylar sonrası santral kanal ile birleşmiş beyin omurilik sıvısı ile dolu kistik kaviteler gelişir. Omurilikte yara iyileşmesi kistik kavite oluşması ile sonuçlanır. Kist gelişmesinde 3 evre vardır. Nekroz evresi: 1. gün başlar travmadan sonraki 1.-2. haftaya kadar sürer; Tamir evresi: travmadan sonraki 2.-8. haftalar arasındadır; Stabilizasyon evresi: 8. haftadan 1. yıla kadar değişir. Travmadan sonraki 3. günde parankimatöz hemorajiler, vasküler trombozis, ödem, aksonal segmentasyon ve enflamatuvar infiltrasyon ile birlikte mikrokistik kaviteler görülmeye başlar. Travmadan 4-5 hafta sonra trabeküler sistem içindeki kistlerin sınırları belirginleşir. Geç lezyonun önemli bir komponenti de miyelin kaybıdır. Demiyelinizasyon ilk 24. saatte başlar, 2. haftada maksimum seviyesine ulaşır. Remiyelinizasyon 3. haftada başlar. Remiyelinizasyonda oligodentrositlerin rolü olabileceği gibi, lezyon sahasına dorsal köklerin giriş bölgesi “dorsal root entry zone” bölgesinden Schwann hücrelerinin göçü, bu hücrelerinde remiyelinizasyonda rol aldıklarını düşündürmektedir (13-15).

## SERBEST RADİKALLER

İlk kez 1970' lerde Demopoulos tarafından ortaya atılan hipoteze göre serbest oksijen radikalleri ve ürünleri ilerleyici doku hasarına neden olurlar. Vücuttaki birçok reaksiyonda rol oynayan moleküler oksijen yaşam için şarttır ve aerobik organizmalar için önemli bir besindir. Oksijensiz ortamda ölüm olur. Ancak bu durum daha çok oksijenin daha iyi olacağı anlamına gelmez. Oksijen konsantrasyonu % 100 olduğunda insanların yanı sıra bir çok aerobik organizma için toksik etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli hastalıkların tedavisi sırasında kullanımını sınırlı olmaktadır (14,34).

Serbest oksijen radikalleri, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Elektronlar, dış yörüngelerinde çiftler halinde bulduklarında o bileşik daha kararlı ve sabit bir yapıya sahip olur. Eksik elektronlu moleküller ise karalı değildirler. Kolaylıkla elektron alıp vererek, herhangi bir molekül ile reaksiyona girebilirler. Serbest oksijen radikallerinin yarı ömürleri çok kısa olmasına rağmen genel olarak çok reaktiftirler (35).

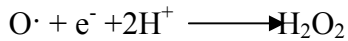
Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun organ ve dokularda meydana getirdiği hasar ve hastalıkların patogenezindeki rolleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, yanıklar, akciğer hastalıkları, karsinogenez, diabet, ateroskleroz ve katarakt oluşumundaki etkileri birçok çalışmada kanıtlanmıştır (36).

### Süperoksit Radikali (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşanı süperoksit (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radikalidir. Mitokondrideki yetersiz elektron transferi neticesinde süperoksit radikali oluşur. Süperoksit genellikle instabildir ve hidrojen peroksit ile oksijene dönüşür. Ancak daha ciddi hasara neden olan oksijen radikallerinin öncüsü olması nedeni ile önemlidir (14,37).

### Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Süperokside bir elektron eklenmesiyle oluşur.

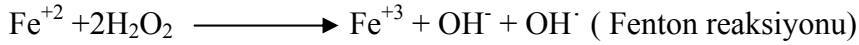


Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelial hücreleri hasarlayabilen güçlü bir sitokindir. Serbest radikal olmadığı halde birçok reaktifin oluşum reaksiyonlarına katıldığı için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de toksik metabolitler içinde yer alır. Toksik özellik gösterebilmesi için hidroksil radikaline dönüşmek zorunda olabilir (38). Hidrojen peroksit zayıf ve yavaş bir oksidandır. Katalaz enzimi ile H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye yıkılır. Ancak reperfüzyonda

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonuna girer (37). Haber-Weiss reaksiyonu, demirin (Fe) katalizörlüğünde gerçekleşen, süperoksit radikali ve hidrojen peroksite Fe eşliğinde reaksiyona girip, sonuçta hidroksil radikali (OH<sup>·</sup>), hidroksil kökü (OH<sup>-</sup>) ve oksijenin oluştuğu bir reaksiyondur.

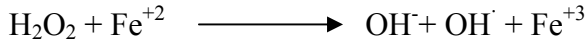


Normal şartlarda bu reaksiyon fizyolojik önemi olmayacak kadar yavaştır. Ancak hemoproteinler ve metal şelatların varlığında Fenton reaksiyonu denen reaksiyonla daha hızlı olarak meydana gelir (39).



### **Hidroksil Radikali (OH<sup>·</sup>)**

Fe ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin birleşmesi ile oluşur.



Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (40). En önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur (41).

### **Hidroperoksil Radikali (HO<sub>2</sub><sup>-</sup>)**

Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşan ve süperoksitten daha güçlü olan bir ajandır. Biyolojik membranlardan kolay geçebilme ve yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girebilme özelliği vardır (42).

### **Nitrik Oksit (NO)**

NO, hemostatik olaylarda ve organizmanın savunma mekanizmalarında otokrin ve parakrin etkisi olan bir araçtır. Makrofajlar, nötrofiller, hepatositler ve endotel hücreler tarafından üretilir. En önemli fonksiyonu vücudun çeşitli dokularında interlökin-1 (IL-1) ve sitokinlerin etkilerine paralel bir işlev görmesidir (42,43).

### **Fosfolipaz A2 aktivasyonu**

Reperfüzyon sırasında hücre içi Ca<sup>2+</sup> akışının artması, fosfolipaz A2'nin aktivasyonuna neden olur. Fosfolipaz A2, hücre membranındaki fosfolipidlerden yağ asitlerini ayırarak lesitinden lizolesitin, sefalinden lizosefalin ve fosfotidilkolinden lizofosfidilkolin

oluşturan hidrolitik bir enzimdir. Oldukça sitotoksik olup, iskemi sonrası permeabiliteyi artırır (39). Hücre içi  $Ca^{2+}$  artışı ile birlikte fosfolipaz  $A_2$ 'nin aktivasyonu siklooksijenaz ve lipoksioksijenaz yollarını harekete geçirir. Siklooksijenaz yolu ile prostoglandinler, lipoksioksijenaz yolu ile  $LTB_4$  ve diğer araşidonik asit metabolitleri olan tromboksan  $A_2$  ( $TXA_2$ ) oluşur.  $TXA_2$  ve  $LTB_4$  güçlü kemotaktik ajanlardır. Proteolitik enzimleri arttırarak serbest oksijen radikallerinin artışına ve reperfüze olan dokuda nötrofillerin birikimine neden olurlar (44).

### **Nötrofil Aktivasyonu**

Serbest oksijen radikalleri, nötrofil aktivasyonu ile birlikte lipid peroksidasyonuna ve epitelial hasara yol açarlar. Nötrofiller, şiddetli mukozal lezyonların oluşumundan büyük ölçüde sorumludur (41). Aktive olan nötrofiller fazla miktarda oksijen tüketimine ve hücre membranındaki Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) enziminin katalizörlüğündeki bir reaksiyonla aşırı miktarlarda süperoksit anyonların oluşumuna yol açar. Ardından süperoksit dismutaz ve myeloperoksidaz enzimlerinin katalizörlüğünde  $H_2O_2$ ,  $OH^-$  ve hipoklorik asit oluşur (45).

### **SERBEST RADİKALLERİN HÜCRESEL ETKİLERİ**

Serbest radikaller hücredeki lipid, deoksiribonükleik asit (DNA), hücre membranı ve proteinlere saldırarak zarara uğrattırlar.

### **Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu**

Hücre membranındaki yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler ve steroller serbest radikallerin en genel hedefleri arasındadır. Bu radikaller hücre membranında bulunan proteinler ve lipidleri oksidasyona uğratarak membran akışkanlığının ve iyonik gradiyentin bozulmasına neden olurlar. Bu oksidasyon tepkimesi hidroksil, hidroperoksil ve tekil oksijen radikalleri tarafından gerçekleştirilir (46).

### **Malonildialdehit (MDA)**

Lipid peroksidasyonun en belirgin ürünü olan malondialdehit (MDA) aynı zamanda lipid peroksidasyonunu belirlemede kullanılır. MDA oluşum yerinden kolayca difüze olur. Membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membranın kendine özgü özelliklerin değişmesine yol açar ve permeabiliteyi bozmaktadır (46).

### **Nükleik Asitler ve DNA**

Serbest radikallerle nükleotidlerin etkileşmesi sonucu DNA zincirinde kırılma ve mutasyonlar oluşabilir. DNA hasarının büyüklüğü serbest radikallerin polimeraz enzimi ile reaksiyona girerek DNA'nın onarılmasını engellemesi ile ilişkilidir (46).

### **Proteinler**

Serbest radikaller protein yapısındaki aminoasitlerle reaksiyona girerek sülfidril gruplarının kaybına ve karbonil gruplarının oluşmasına neden olurlar (47).

### **Karbonhidratlar**

Hidroksil radikali glukoz, mannitol ve deoksi şekerlerle doğrudan reaksiyona girer. Monosakkaritlerin oksidasyonu peroksitler, hidrojen peroksit ve okzoaldehyitler oluşur. Okzoaldehyitler DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar yapma özelliğinden dolayı hücrede zararlı etkilere yol açarlar (46).

## **ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI**

Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller enzimatik antioksidan mekanizmalar (sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutazlar, katalazlar, glutatyon peroksidazlar) ya da non-enzimatik antioksidanlar (-tokoferol, -karoten, glutatyon, askorbik asit, ürat, sistein, bilirubin, albumin), ya da metal bağlayıcılar (seruloplazmin, transferin, laktoferrin) ile inaktive edilerek doku hasardan korunur. Merkezi sinir sistemi askorbat, glutatyon ve tokoferol gibi antioksidan mekanizmalara yüksek oranda sahiptir. Ancak travma sonrası dokuda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır. Oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler, nükleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitler oluştururlar ve bunun sonucunda daha fazla serbest radikal oluşur (14).

Omurilik yaralanmasından sonra kanamayı takiben hemoglobin, ferritin ve transferinden demir açığa çıkar. Demirin katalizlediği membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu neticesinde mebran parçalanır ve hücre ölür. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin yaptığı endotel hasarına bağlı olarak kan-omurilik bariyeri bozular. Bunun sonucunda yaralanma bölgesine zararlı maddelerin birikimi olur. SSS' de SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin az olması nedeniyle serbest radikal hasarına yatkındır. Ayrıca serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girebilen doymamış yağ asitleri ve kolesterol

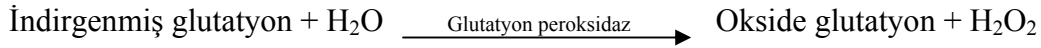


ile serbest radikal oluşma reaksiyonlarını katalizleyen askorbik asit ve demirin fazla miktarda olması, SSS' nin travmatik ve iskemik yaralanmadan daha çok etkilenmesine neden olur.

### **Glutasyon peroksidaz**

Glutasyon, serbest radikallerin hücre içinde detoksifikasyonunu sağlayan ve lipid peroksidasyonunu önleyen en önemli endojen antioksidandır (48). Hücre içi glutasyon, antioksidan olarak bulunan tiol bileşiğidir. Septik şokta glutasyon düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir ve hücre içi glutasyon depolarının azalması ile mortalitenin arttığı görülmüştür (45).

Glutasyon peroksidaz enzimi selenyuma bağlı bir enzim olup, glutasyon elektronları kopararak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye ve okside glutasyona dönüştürür.



Endojen yada eksojen oluşan radikaller bir taraftan glutasyon düzeyini azaltarak öte yandan da glutasyon metabolizmasına bağlı enzimlerin aktivitesini inhibe ederek alveoler makrofaj fagositozunu bozar ve lökositlerin kemotaksisini engelleyerek hasarın ilerlemesine neden olurlar. Glutasyon peroksidazın H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin neden olduğu hücre sel hasara karşı koruyucu gücünün katalaza göre daha fazla olduğu bilinmektedir (39).

### **N-ASETİLSİSTEİN**

NAC'ın bir glutasyon prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur. L-sistein'in sodyum tuzu olan NAC derivasyonunun doğal sisteinden daha az irritatif olması ve göreceli olarak daha az toksik ve daha çok sülfidril grubu içermesinden dolayı klinik kullanımının daha etkili ve uygun olacağı belirtilmiştir.

### **Farmakokinetik**

NAC, doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç amino asitten biridir. Asetilsistein C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S şeklinde formüle edilebilir. Molekül ağırlığı 163.2 dir. %22 oranında suda erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir (49). NAC karaciğerde metabolize olur ve yarılanma ömrü iki ile altı saattir. Yaklaşık %20-30'u idrarla

değişmeden atılır. Aktif metabolitleri disülfidler, sistein, sistin, methionin ve indirgenmiş glutatyondur (50).

### **Etki Mekanizması**

Asetilsistein mukoproteindeki disülfid bağları ile reaksiyona giren serbest sülfidril grupları içeren bir thiol bileşiğidir. Sonuçta sülfidril-disülfid bağlarının yer değiştirmesi ile mukoprotein molekülleri daha küçük parçalara ayrılır ve daha az visköz birimler haline gelip infekte sekresyondaki DNA bağlarını belirgin önemli ölçüde azaltır. Mukopürülan materyal lizise uğrar ve daha az visköz hale gelmiş olur. Bu primer etki NAC'ın bir mukokinetik ajan olarak kullanımının ana nedenidir.

Glutasyon major bir serbest radikal giderici bir ajandır. Bir glutasyon prekürsörü olan NAC'ın serbest radikalleri detoksiye edebilme yeteneğinin anlaşılması son yıllarda bu ajanın klinik kullanımı oldukça yaygınlaştırmıştır (49). NAC, serbest radikalleri ve reaktif elektrofilleri detoksifiye eder. Reaktif elektrofiller, elektronlara afinitesi oldukça yüksek olan ve yeni radikalleri oluşturmaya hazırlanan molekül parçalarıdır. NAC ayrıca ortamdaki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> düzeyini azaltır ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin toksik etkilerine karşı hücreyi korur. NAC'ın toksik radikallere karşı koruyucu etkisi, glutasyon biyosentezini arttırması ve glutasyon prekürsörü olması nedeniyle (51). NAC alındıktan sonra hızla absorbe ve deasetile edilerek hücre içi ve hücre dışı glutasyon depolarına eklenir. NAC, sistein derivasyonu olarak daha az toksik ve glutasyon prekürsörü olabilme yeteneği en iyi olan sistein derivasyonlarına dönüşür (52).

### **Tedavide Kullanımı**

**Akciğer hastalıklarının tedavisinde:** NAC mukoproteindeki kimyasal disülfid bağlarını parçalayan serbest sülfidril gruplarını içermesi sayesinde sekresyonların viskozitesini azaltarak mukolitik etki gösterir (49,53,54).

**Parasetamol toksisitesinde:** Yüksek dozda parasetamol alkilleyici bileşiklere dönüşüp glutasyonu baskılayarak yada karaciğer hücre membranına hasar vererek hücre nekrozuna neden olur. NAC reaktif parasetamol metabolitlerin tükettiği mitokondrial ve sitozolik glutasyon depolarını doldurarak etki gösterir (55).

**Kistik fibroz ve mekonyum ileusu tedavisinde:** NAC içeren solüsyonlar oral yada rektal enema uygulaması şeklinde özellikle kistik fibrozlu hastaların ince bağırsaklarında meydana gelen mekonyum ileusu olgularında başarıyla uygulanmaktadır (49,56).

**Septik şokta :** Deneysel çalışmalarda NAC'ın hepato-splanik kan akımını arttırdığı görülmüştür. Antioksidan ve sitoprodüktif etkisi olan NAC aynı zamanda endotel kökenli gevşetici faktörü stimüle edebilir ve mikrovasküler kan akımını artırır (57).

**Antidot olarak kullanımı:** NAC altın, kobalt ve diğer ağır metaller, karbontetraklorür, metimerkür, halotan, arsenik, asetaldehid, kumarin, interferon, bromobenzen, naftalin ve doksorubisin zehirlenmesinde de antidot olarak kullanılmaktadır (49,56).

**Kardiovasküler sistem ve miyokard infarktüsünde:** NAC nitratın vazodilatör etkisine olan toleransı tersine çevirerek küçük kan damarlarında direkt vazodilatötör etki yapar. NAC'ın aynı zamanda pozitif inotrop ve güçlü vazodilatötör etkileri vardır (58). NAC'ın intravenöz uygulamasının miyokard infarktüsülü hastalarda trombolitik ajan olarak kullanılabilceği ve gliseril trinitritin periferal ve koroner etkilerini potansiyelize ettiği bildirilmiştir.

**Diğer klinik kullanım alanları:** Siklofosfamid ile oluşan hemorajik sistitte NAC'ın thiol grupları sistide yol açan akrolenin aldehid grupları ile reaksiyona girerek toksik molekülleri nötralize eder. NAC kullanımının romatoid artrit, vaskülit ve skleroderma gibi inflamatuvar hastalıkların tedavisinde faydalı etkileri bulunmuştur. Nefrolitiyazis ve sistünürü profilaksisinde diyetle alınan sistini daha çok çözünür sistin disülfid haline getirerek yaralı etkileri gösterilmiştir (49). NAC'ın güçlü karsinogenler üzerinde farklı dozlarda farklı etkileri görülebilir. Yüksek dozlarda mutajenik metabolitlerin aktivasyonunu engeller. Bu etkisi ile karsinogenezisin değişik evrelerinde farklı karsinojen ve mutajenlere karşı koruma sağlayabilir (52).

### **Yan Etkileri**

NAC'ın toksisitesi son derece nadirdir. Çok ender olarak anafilaksi, taşikardi, ürtiker ve bronkospazm gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir (49).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Mikronöroşirürji Laboratuvarı (Şekil 1), Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Fizyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Bkz. Ek1). Kullanılan denekler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi.

Çalışmada toplam 32 adet, ortalama ağırlıkları 250-320 g arası değişen Spraque-Dawley türü erişkin erkek rat kullanıldı. Denekler her biri 8 rat içeren dört gruba ayrıldı:

- Grup 1. Kontrol grubu
- Grup 2. N-asetilsistein uygulanan kontrol grubu
- Grup 3. Travma grubu
- Grup 4. Travma ve N-asetilsistein tedavi grubu

Denekler, intraperitoneal yolla verilen 70 mg/kg Ketamin ve 7 mg/kg Ksilazin hidroklorür (Rompun HCl) ile anestezi sağlanarak yüzüstü pozisyonda tespit edildi (Şekil 2). Cerrahi sterilizasyon ve cilt temizliği sonrası torakal bölgeyi içine alan 5 cm uzunluğunda orta hat deri ve derialtı kesisi yapıldı. Daha sonra cerrahi ameliyat mikroskobu (OpMi 99 Zeiss Inc., Oberkochen, Germany) altında, mikrocerrahi aletleri kullanılarak, paravertebral adeleler diseke edilip omurganın kemik arka bölümleri ortaya konuldu. Th4 - Th10 arası laminektomi yapıldı (Şekil 3). Bu işlemler sırasında omurilikte travma oluşturulmamasına dikkat edildi. Hafif bir travma şüphesinde bile denek çalışma dışı bırakıldı.

Kontrol grubunda (Grup 1) laminektomi sonrası travma uygulanmadan cerrahi işleme son verilerek denek uyandırıldı.

NAC uygulanan kontrol tedavi grubunda (Grup 2) laminektomiden 15 dakika sonra NAC (%2 Asist amp., Hüsnü Arsan, İstanbul, Türkiye) 150 mg/kg ölçüsünde intraperitoneal tek doz olarak verildi.

Travma grubunda (Grup 3), omuriliğe Th7 - Th8 düzeyinde ekstradural olarak bir dakika süre ile kapanış basıncı 70 g olan Yaşargil FE 701 K Anevrizma Klibi (B. Braun Aesculap, Tuttlingen, Germany) uygulandı (Şekil 4 ve 5). Bu gruba tedavi uygulanmadı.

Tedavi grubunda (Grup 4) ise klip uygulandıktan 15 dakika sonra NAC 150 mg/kg intraperitoneal tek doz olarak verildi.

Her dört gruptaki denekler 2 saat sonra sakrifiye edildi. Bu işlem, 18 G. enjektör ile intrakardiyak olarak 5 -7 ml kan alınarak gerçekleştirildi.

Travmalı omurilik bölgesini içeren 4 cm. uzunluğunda omurilik segmenti alındı (Şekil 6). Omurilik segmentinin travmalı kısmının kranial bölümünde kalan doku bölümü sabit bir süre içinde -80°C de korunacağı derin dondurucu ortamına taşındı. Bu doku bölümü biyokimyasal olarak malonildialdehid (MDA) düzeyleri ölçümünde kullanıldı.

Tüm deneklerden travma bölgesini içeren omurilik segmenti ışık mikroskopi incelemesi için ayrılarak %10 formaldehid çözeltisine konuldu.

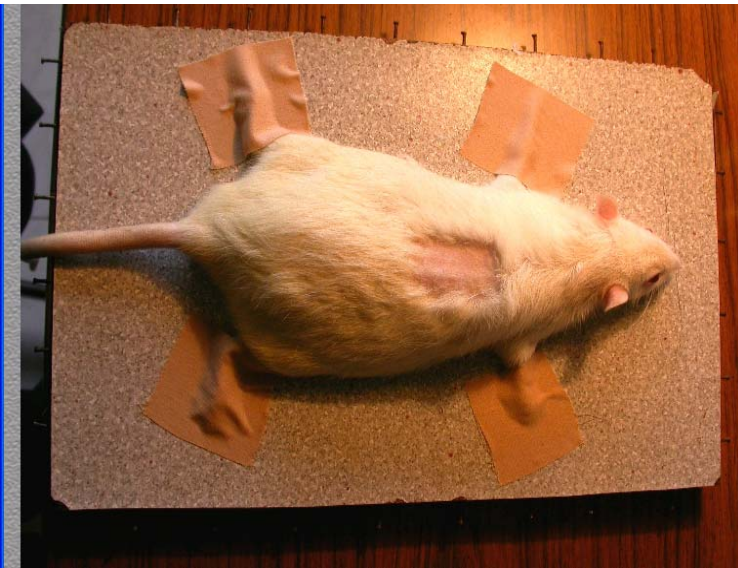
Biyokimyasal işlemler için ayrılan omurilik bölümü -80°C de saklandığı derin dondurucudan çıkarıldıktan sonra buz çözülmeyen kesilerek 0.4 g parçalar halinde tüpe yerleştirildi. MDA düzeylerinin belirlenebilmesi için 0,15 M KCl çözeltisi hazırlandı. Homojenizatör (Polytron PT 2100 Kinematica AG, Germany) kullanılarak buz içinde homojenize edildi. Hazırlanan homojenatlar dakikada 4000 devirde 10 dk süre ve +4°C'de santrifüje edilerek üstte kalan berrak kısmı ayrıldı ve spektrofotometrik MDA ölçümlerinde kullanıldı.

0,2 ml 10 kez seyreltilmiş doku homojenatı, 0,2 ml % 8.1'lik sodyum dodesil sülfat (SDS), 1,5 ml % 20'lik asetik asit, 1,5 ml % 0.8'lik tiyobarbitürik asid (TBA) ve 0,6 ml distile su ile karıştırıldı. Elde edilen bu karışım 95°C' de sıcak su banyosunda bir saat tutuldu. Tüp içerisindeki materyal musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15/1) eklenerek mekanik karıştırıcı (vorteks) ile bir dakika karıştırıldı. Organik faz dakikada 4000 devirde 10 dakika süre ile santrifüje edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Spectronic Unicam Helios α, England) okundu. Sonuçlar nmol/g doku olarak tanımlandı (59).

Verilerin istatistiksel analizi Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Bilgi İşlem Merkezi'nde bulunan S0064 Minitab Release 13 programı (Lisans No. 1331.00197) kullanılarak bilgisayar ortamında gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler için gruplar arası kıyaslamalı Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. Anlamlı farklılık çıkanlara Mann-Whitney U testi uygulandı.



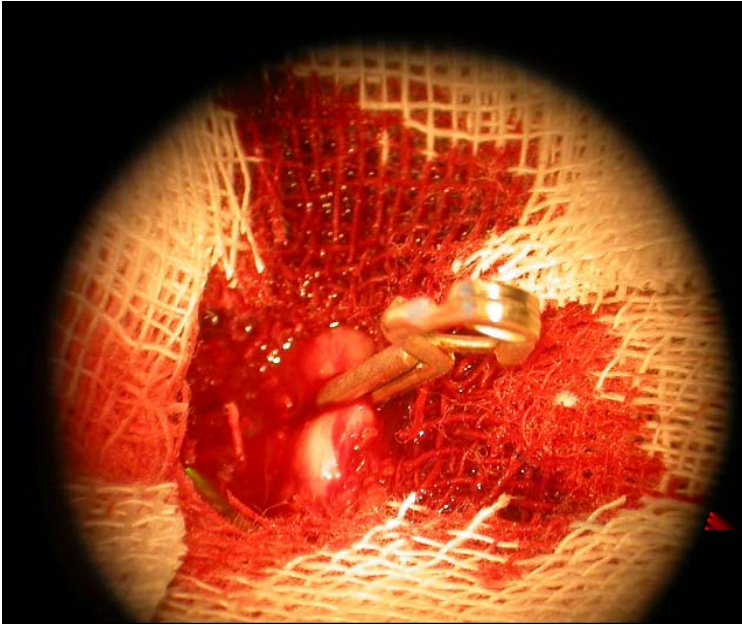
**Şekil 1. Mikronöroşirürji labarotuarında çalışma ortamı**



**Şekil 2. Hazırlık ve pozisyonlama**

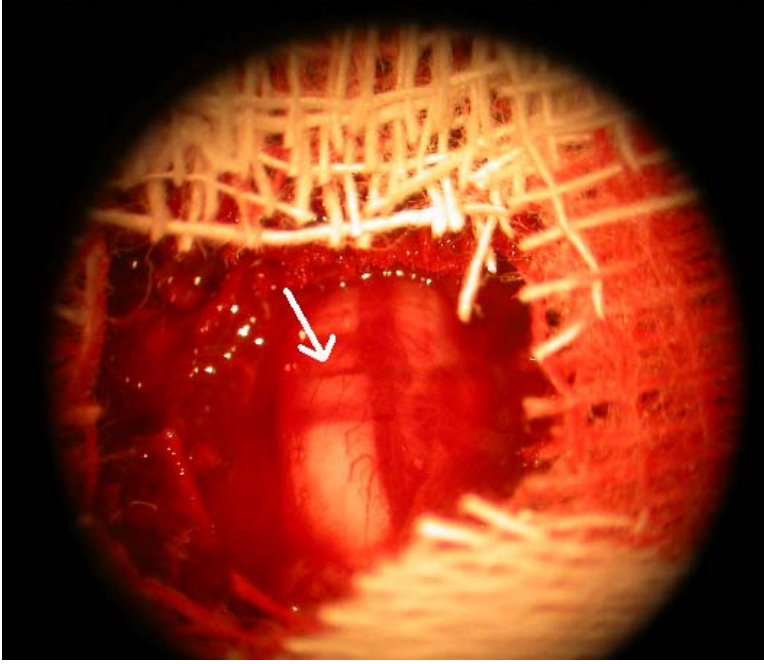


**Şekil 3. Laminektomi sonrası omuriliğin görünümü**

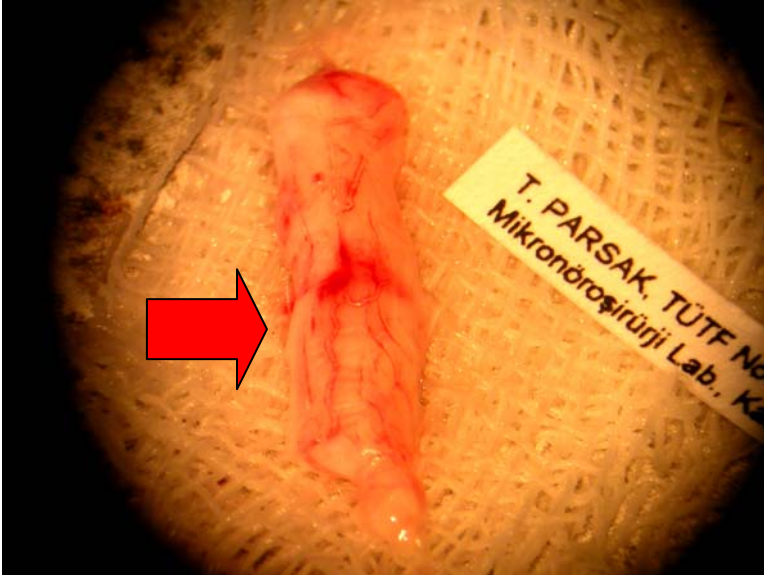


**Şekil 4. Omuriliğe anevrizma klibi ile hasar oluşturulma aşaması**





**Şekil 5. Klip çıkartılmasını takiben omurilikte oluşan hasar ok ile gösterilmektedir**



**Şekil 6. Çıkarılan omurilik segmentinde klip tarafından oluşturulan yapısal hasar alanı (ok) görülmektedir**



## BULGULAR

Yapılan biyokimyasal analizler sonucu elde edilen doku MDA değerleri Tablo 2 de görülmektedir.

İstatistiksel analizler için gruplar arası kıyaslamalı Kruskal-Wallis varyans analizi yapıldı. Anlamlı farklılık bulunanlara Mann-Whitney U testi uygulandı ve ( $p<0,05$ ) değeri anlamlı kabul edildi. Elde edilen p değerleri tablo 3 de görülmektedir.

**Tablo 2. Doku Malonildialdehid değerleri (nmol/g doku)**

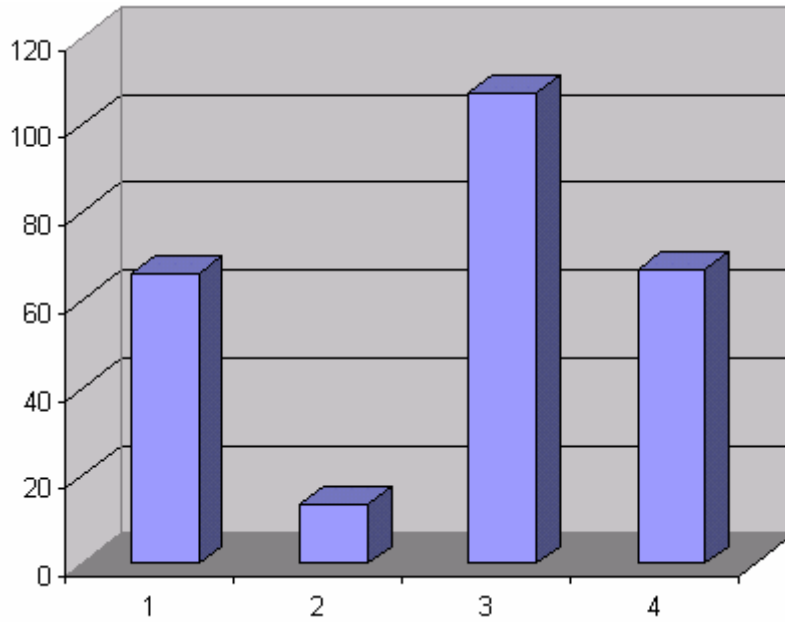
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
	Kontrol	Kontrol + NAC	Travma	Travma + NAC
Denek 1	17,57	20,81	89,02	42,35
Denek 2	170,17	8,15	165,51	53,41
Denek 3	162,57	16,43	105,95	49,88
Denek 4	34,27	13,08	31,54	116,24
Denek 5	24,69	8,07	198,24	38,38
Denek 6	52,97	12,47	62,49	176,82
Denek 7	31,92	8,80	114,83	24,59
Denek 8	36,14	20,34	90,70	33,91
ORT $\pm$ SD	66,28 $\pm$ 62,63	13,51 $\pm$ 5,21	107,28 $\pm$ 53,55	66,94 $\pm$ 52,48

(ORT, ortalama değer; SD, standart sapma; NAC, N-asetilsistein)

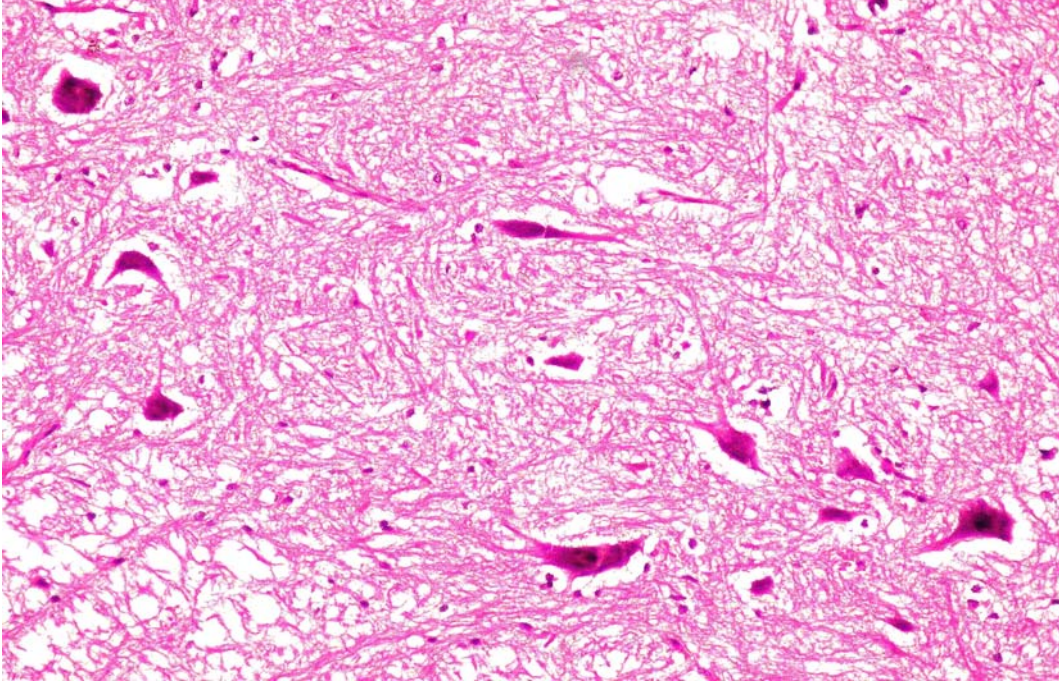
**Tablo 3. Gruplar arası ilişkide p değerleri**

	p değeri
Grup 1 - Grup 2	P< 0,01
Grup 1 - Grup 3	P< 0,01
Grup 3 - Grup 4	P< 0,05

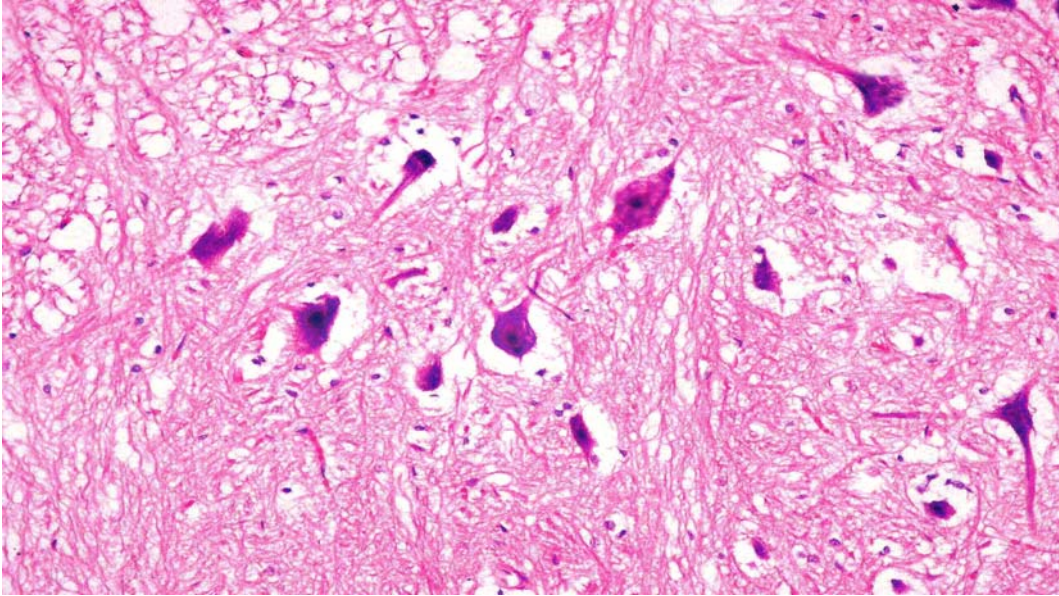
Kontrol grubu (Grup 1) ile NAC verilen kontrol grubu (Grup2) doku MDA değerleri karşılaştırıldığında Grup 2' ye ait MDA değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,01$ ) düşük olduğu görüldü. Kontrol grubu (Grup 1) ile travma grubu (Grup 3) karşılaştırıldığında MDA değerlerinin Grup 3' de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,01$ ) yükseldiği saptandı. Travma grubu (Grup 3) ile NAC verilen travma grubu (Grup 4) karşılaştırıldığında ise MDA değerlerinin Grup 4' de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,05$ ) azaldığı belirlendi (Tablo 2). Tüm gruplara ait ortalama MDA değerleri Şekil 7' de görülmektedir.



**Şekil 7. Grupların doku MDA ortalama değerlerinin grafiği**

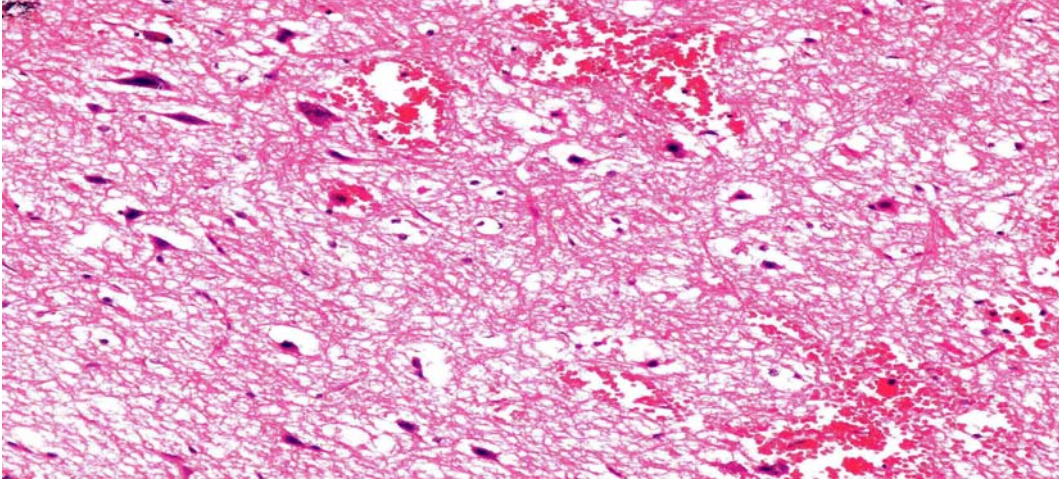


**Şekil 8. Kontrol grubuna (Grup 1) ait omuriliğin histopatolojik görünümü**

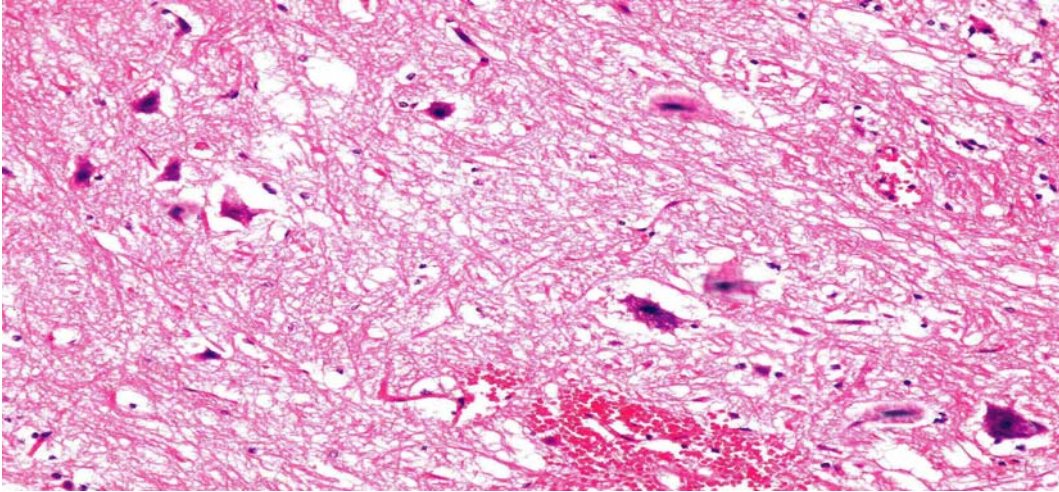


**Şekil 9. Kontrol + NAC tedavi grubuna (Grup 2) ait omuriliğin histopatolojik görünümü**





**Şekil 10. Travma grubuna (Grup 3) ait omuriliğin histopatolojik görünümü**



**Şekil 11. Travma + NAC tedavi grubuna (Grup 4) ait omuriliğin histopatolojik görünümü**

Histolojik değerlendirmede, kontrol grubunda normal görünümde nöronlar ve ara doku görüldü (Şekil 8). Kontrol + NAC tedavi grubuna ait histopatolojik kesitlerde kontrol grubundan farklılık saptanmadı (Şekil 9). Travma uygulanan grupta nöronlar oldukça koyu, dejenere ve piknotik nükleusa sahip olup ara dokuda kanama alanları ve ödem varlığı görüldü (Şekil 10). NAC tedavi grubunda ise nükleusların iyi korunduğu, ara dokudaki ödem ve kanama alanlarının kısmen gerilediği görüldü (Şekil 11).

## TARTIŞMA

Travmatik omurilik yaralanması, primer hasar ve günler içinde artarak seyreden sekonder hasar ile doku yıkımına neden olur (60). Sekonder hasar, vasküler değişiklikleri (ödem, iskemi, hipoksi), eksitotoksik biyokimyasal olayları (serbest radikaller ve nitrik oksit formasyonu, proteaz salınımı) ve hücrel cevabı (immün hücrelerin invazyonu, glial hücrelerin aktivasyonu, nöronların ölümü) içerir. Primer travma sonrası oluşan subsellüler düzeydeki sekonder hasar, başlangıçtaki primer hasarın çevresindeki alanda, primer travmadan ilk aşamada teorik olarak zarar görmemiş nöral dokunun haraplanmasına ve ölümüne neden olur. Primer travma çevresinde yer alan bu risk altındaki alanın sekonder hasardan kurtarılması veya sekonder hasarın mümkün olan en alt düzeye indirilmeye çalışılması, omurilik yaralanmasında tedavinin temel hedefidir.

Konumuzu oluşturan sekonder doku (nöronlar ve glial hücreler) hasarında, lipid peroksidasyonunun ve bununla ilintili olarak serbest oksijen radikallerinin çok önemli bir rolü olduğu bilinmektedir (6,61,62).

Sinir sistemi, yüksek oksijen kullanımı, antioksidan kapasitesinin düşüklüğü, membran lipidleri yan zincirli poliansatüre yağ asitleri açısından zengin olduğu ve bu yapıların serbest radikal hasarı için hedef bölgeler oldukları için, lipid peroksidasyonuna çok duyarlıdır (6,63-66). Sekonder hasara neden olan oksidatif strese karşı önemli bir savunma mekanizması olan tripeptid glutatyon dokuları iskemik hasardan koruduğu bilinmektedir (67-70).

Güçlü bir antioksidan ve bir serbest radikal temizleyicisi olan N-asetilsistein'in oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (53,67,68,73-75). Beyinde ve omurilik

yaralanmalarında oksidatif stresin etkilerini inceleyen Juurlink ve Paterson, NAC gibi glutasyon prekürsörü ile oksidatif stresin en aza indirilebileceğini bildirmişlerdir (76).

Malonildialdehid (MDA) lipid peroksidasyonun indirekt ancak en sık kullanılan göstergelerinden biridir. Değişik travma modellerinde MDA seviyeleri travmanın hemen ardından yükselmeye başlamakta, travmanın ilk saatleri içinde (1, 2 ve 4. saatler) en üst düzeye ulaşmakta ve giderek düşmektedir (77-79).

NAC'ın antioksidan etkinliği birçok deneysel hayvan modelinde ve çok farklı doku/organ sistemlerde gösterilmiştir (67,80-90). Bu konuda yapılmış olan deneysel çalışmaların önemli bir bölümü santral ve periferik sinir sistemi ile ilişkili olanlardır. Ancak, bunların tamamına yakını, beyin ve omuriliğin iskemi ve/veya iskemi-reperfüzyon modellerinde NAC'ın koruyucu ve/veya tedavi edici etkisinin incelenmesini konu alır (67,80,84-88,90,91). Sekhon ve ark. (86), rat beyin modelinde NAC uygulamasının iskemiye azalttığını ve reperfüzyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Khan ve ark. (88), ratlarda oluşturdukları deneysel inme modelinde, iskemi başlangıcından sonra NAC verilmesinin beyni serbest radikal hasarından ve apoptozisten koruduğunu göstermişler ve yorumlarında artmış glutasyon düzeyi ve azalmış apoptotik hücre ölümünün önemini vurgulamışlardır. Bu modelde, reperfüzyon sonrası 6 saat aralarla uygulanan düşük (50 mg/kg) ve yüksek (500mg/kg) dozlarda NAC'ın yeterli koruma sağlamadığı, buna karşılık en iyi koruyucu etkinin 150 - 250 mg/kg arasındaki NAC dozları ile elde edildiğini belirlemişlerdir (88). Bizim çalışmamızda travmatik hasar sonrası ilk 15. dakikada uyguladığımız NAC dozu 150 mg/kg olarak belirlenmiş olup kaynaklardaki seçilmiş dozlar ile uyum göstermektedir.

Santral sinir sistemi travması sonrası oluşan sekonder hasarı önlemeye yönelik NAC etkisi, beyin ve omuriliğin iskemi ve/veya iskemi-reperfüzyon modelleri ile karşılaştırıldığında, ne varki, yeterince incelenmemiştir. Bunun sonucu olarak, beyin ve omuriliğin travmatik hasarında NAC'ın pozitif veya negatif etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Biz, çalışmamızda omurilik yaralanmasında travma sonrası intraperitoneal tekdoz olarak 150 mg/kg NAC uyguladık. Biyokimyasal ve histolojik inceleme sonuçlarımız, NAC uygulamasının omurilik yaralanmasında sekonder hasarı en azından azaltıcı etkisini gösterir özellikle olarak değerlendirildi. Kaynaklarda karşılaştığımız tek benzer çalışma ise, çelişkili bir sonuç ortaya koymuştur (92). Bu çalışmada, Kaynar ve ark. travmanın hemen sonrasında uygulanan 163mg/kg tek doz intraperitoneal uygulamanın etkisini bir saat sonra omurilik MDA düzeyini ölçerek değerlendirmişler ve deneysel omurilik yaralanmasının erken döneminde lipid membranının peroksidasyonu üzerine tedavi edici etkisinin olmadığını

bildirmişlerdir (92). Çalışmalarının negatif sonucuna dayanılarak, NAC'ın lipid peroksidasyonunu azaltamamasının muhtemel sebeplerini uygulama yöntemi ve doz yetersizliği ve lipid peroksidasyonunda diğer olası mekanizmaların varlığı şeklinde yorumlamışlardır. Bizim çalışmamızın sonuçları Kaynar ve ark. nın sonuçları ile uyumlu bulunmamıştır. Olasılıkla, primer hasar sonrası hemen verilen tek bir NAC dozuyla ilk bir saat içerisinde belirlenen MDA düzeyleri NAC tedavisi sırasındaki gerçek biyokimyasal olayları yansıtmayabileceği düşünülebilir. Bizim çalışmamızda, NAC etkisi biyokimyasal olarak MDA düzeyleri ve histolojik bulgulara dayanılarak incelendi. Oluşturduğumuz travma sonrasında yükselen MDA düzeylerinin, travmadan 15 dakika sonra uygulanan NAC etkisi ile istatistik olarak anlamlı azalmış gösterdi. Bunun ötesinde, farklı olarak NAC uygulama zamanını travmadan hemen 15 dakika sonra olarak belirledik. Bu durumun, gerçek yaşamın acil travmatoloji prensipleri bağlamında travma hastasına yapılan ilk müdahaleyi daha iyi simüle ettiğini ve böylelikle klinik uygulamada daha gerçekçi olduğunu düşünüyoruz.

Sonuçlarımız, genel olarak, travmatik nöral yaralanmada NAC in etkisini inceleyen diğer deneysel çalışmalar ile uyumludur. Ellis ve ark. (93) sıvı-perfüzyon hasarını takiben serebrovasküler cevabı düzenlemede NAC'ın etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Xiong ve ark. (94) kortikal incinmede mitokondrial disfonksiyona karşı NAC'ın etkili olduğunu göstermişlerdir. Yine bir başka deneysel çalışmada, Yi and Hazell, kafa travmasını takiben hasarlanmış beyin korteksi glial hücrelerinde travmadan 5 dakika sonra NAC verilmesinin, oksidatif stresi azalttığı düşündüren hemoksigenaz-1 indüksiyonunda belirgin azalmaya neden olduğunu ileri sürmüşlerdir (95).

Çalışmamızda, travmatik omurilik dokusunun ışık mikroskopik histolojik değerlendirmeleri yapıldı. Bu histolojik özellikler ile NAC etkisinin yapısal özelliklerini belirlemeyi amaçladık. Sadece anestezi verilen ve travma uygulanmayan kontrol deneklerin histolojik incelemelerinde, nöronlar ve ara doku normal görünümde olup, travma uygulanan grupta nöronların oldukça koyu, dejenere ve piknotik nükleusa sahip oldukları görüldü. Ayrıca ara dokuda kanama alanları ve ödem varlığı dikkati çekti. NAC tedavi grubunda ise nükleusların oldukça iyi korunmuş oldukları ve ara dokudaki ödem ve kanama alanlarının kısmen gerilediği görüldü. Bu bulgularımız, her ne kadar immünohistokimya yapılmadan sadece ışık mikroskopisi görüntülerine dayansa da, yapısal histolojik özellikleri göstermesi açısından anlamlı oldukları düşüncesindeyiz. Kaynaklarda, histolojik ve histopatolojik incelemelerin yalın şekilleri ve immünohistokimyasal incelemeler eklenmiş daha ileri şekillerde yapılmış oldukları görülmektedir. Burada, çalışmamızın bir eksiği apoptozisin

değerlendirilmemiş olmasıdır. Sekhon ve ark.'nın ratlarda fokal beyin iskemi modellerinde, NAC uygulaması ile beyin infarkt hacminde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir (86). Kahn ve ark., fokal beyin iskemi ve reperfüzyon modellerinde, NAC uygulaması ile beyin infarkt alanında yaptıkları 6 peşisıra koronal keside infarkt alanının anlamlı olarak azalmış olduğunu bildirmişlerdir (88). Bir başka kaynakta, Thomale ve ark. her ne kadar NAC uygulamasının posttravmatik sitotoksik beyin ödeminde etkisinin olmadığını bildirmiş iseler de, bizim omurilik dokusundaki histolojik sonuçlarımız NAC tedavisi uygulanan kesitlerde ödemin azaldığını göstermiştir (68). Bu konuda, ödemin cinsi (vazojenik, sitotoksik), NAC etkisi (Kan-Beyin Bariyeri özellikleri) ve daha var olması olası diğer faktörlerin etkisi olması mantıklıdır.

Sonuç olarak, bizim bulgularımız, omurilik travması sonrası 15 dakika içerisinde tek doz 150 mg/kg NAC uygulamasının lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesi ve nöronal korunma üzerine olumlu etkili olabileceğini düşündürmektedir. NAC'ın potansiyel faydalarını, en uygun dozunu ve en uygun uygulama zamanlamasını belirlemek için daha ileri çalışmalara gereksinim vardır.



## SONUÇLAR

Akut omurilik travmalarında nöral dokuda oluşan primer hasardan başka, travma sonrası dönemde oluşan sekonder yaralanma sürecinin en az primer olan kadar nöral doku hasarına neden olduğu bilinmektedir.

Bu deneysel çalışmada sekonder omurilik hasarı sürecinde nöral doku hasarında oldukça önemli bir yer tutan serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirdiği bilinen glutatyon prekürsörü N-asetilsistein'in (NAC) etkisi biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle araştırıldı.

Biyokimyasal kriterlerin değerlendirildiği bölümde;

1. Kontrol grubu (Grup 1) ile NAC uygulanan kontrol grubu (Grup2) doku malonildialdehid (MDA) değerleri karşılaştırıldığında Grup 2' ye ait MDA değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,01$ ) düşük olduğu görüldü.

2. Kontrol grubu (Grup 1) ile travma grubu (Grup 3) karşılaştırıldığında MDA değerlerinin Grup 3' de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,01$ ) yükseldiği görüldü.

3. Travma grubu (Grup 3) ile travma uygulanan ve NAC teravisi verilen grup (Grup 4) karşılaştırıldığında MDA değerlerinin Grup 4' de istatistiksel olarak anlamlı şekilde ( $p<0,05$ ) düşmüş olduğu belirlendi.

4. Lipid peroksitlerinin serbest oksijen radikalleri gibi benzer hücresel komponentler üzerinde toksik etkilerini göstermesi ve bir lipid peroksidasyon ürünü olan Malonildialdehid (MDA) düzeyinin ölçülmesinin sekonder nöral hasar göstergesi olduğu kabul edildi. MDA sonuçları göz önüne alındığında, tedavi edilen gruba (Grup 4) ait sonuçların, travma

uygulanan ancak tedavi uygulanmayan gruba (Grup 3) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi olduğu görüldü.

Histopatolojik kriterlerin değerlendirildiği bölümde;

1. Travma uygulanan grupta (Grup 3) nöronların oldukça koyu, dejenere ve piknotik nükleuslu oldukları ve ara dokuda kanama ile birlikte ödematöz yapının bulunduğu belirlendi.

2. Tedavi grubunda (Grup 4) ise nöronlardaki dejenerasyonun kısmen önlendiği, ara dokudaki ödematöz yapının azaldığı görülmüştür.

Bu deneysel araştırma ile, travmaya bağlı sekonder hasarda ortaya çıkan oksidatif nöral hasar nedenlerini etkisiz hale getirme yönünde NAC uygulamasının olumlu etkisini ortaya koyar özellikle olduğu sonucuna varıldı.

## ÖZET

N-asetilsistein bir glutasyon prekürsörü, antioksidan ve serbest radikal temizleyicisidir. Sinir sisteminde iskemi ve iskemi/reperfüzyon modellerinde N-asetilsistein'in yararlı etkileri bilinmektedir. Ancak travmatik hasarın azaltılmasındaki etkisi iyi aydınlatılmamıştır. Bu çalışmada ratlarda oluşturulan deneysel omurilik yaralanması modelinde N-asetilsistein'in nöroprotektif etkisinin araştırılması planlandı.

Otuziki adet Sprague-Dawley rat, Grup1 (Kontrol), Grup 2 (Kontrol + N-asetilsistein tedavi), Grup 3 (Travma), Grup 4 (Travma + N-asetilsistein tedavi) olarak, her biri 8 rat içeren dört gruba ayrıldı. Tüm ratlara T4-T10 laminektomi uygulandı. Travma ve travmalı tedavi grubuna bir dakika süreyle klip uygulanarak omurilik hasarı oluşturuldu. Tüm ratlar cerrahi işlem sonrası ikinci saatte sakrifiye edildi. Omurilikten alınan örnekler biyokimyasal tetkik ve histopatolojik incelemelerde kullanıldı.

Travma uygulanan grubun kontrol grubuyla karşılaştırılmasında doku malonildialdehid değerlerinde istatistiksel anlamlı artış saptandı ( $p<0,05$ ). Travmadan 15 dakika sonra uygulanan N-asetilsistein tedavisi (150 mg/kg) ile doku malonildialdehid değerlerinde istatistiksel anlamlı düşüş ile ( $p<0,05$ ) koruyucu etki gösterildi.

Travma uygulanan grupta (Grup 3) nöronlar oldukça koyu, dejenere ve piknotik nükleusa sahip idi. N-asetilsistein tedavi grubunda (Grup 4) ise nükleuslar iyi korunmuştu.

Bu sonuçlar N-asetilsistein'in travmaya bağlı oksidatif omurilik hasarında yararlı olabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar sözcükler:** Omurilik, travma, malonildialdehid, N-asetilsistein, rat

## **THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON SECONDARY DAMAGE IN EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURIES**

### **SUMMARY**

N-acetylcysteine is a precursor of glutathione, a potent antioxidant, and a free radical scavenger. The beneficial effect of N-acetylcysteine on nervous system ischemia and ischemia/reperfusion models has been well documented. However, its beneficial effect on traumatic injury remains less understood. We aimed to investigate the neuroprotective effect of N-acetylcysteine with an experimental traumatic spinal cord injury model in rats.

Thirty-two adult male Sprague-Dawley rats were divided into four groups of 8 rats each: Group 1 (control), Group 2 (control+ N-acetylcysteine), Group 3 (trauma), and Group 4 (trauma+ N-acetylcysteine treatment). All the rats were T4-T10 laminectomized. The trauma and trauma+ N-acetylcysteine treatment groups were subjected to spinal cord injury using clipping of one minute duration. All the rats were sacrificed at 2 hours after the surgical intervention. The tissues taken from the spinal cords were examined biochemically and histopathologically.

The traumatic spinal cord injury significantly increased tissue malonyldialdehyde levels ( $p < 0.05$ ) when compared with controls. The administration of a single dose of N-acetylcysteine (150 mg/kg) 15 minutes after the trauma has shown protective effect via decreasing significantly the elevated malonyldialdehyde levels ( $p < 0.05$ ). In the trauma group (Group 3), the neurons became extensively dark and degenerated into picnotic nuclei. The

morphology of neurons in the N-acetylcysteine treatment group (Group 4) was well protected. These results suggest that N-acetylcysteine might be beneficial in trauma-induced oxidative spinal cord damage.

**Key words:** Spinal cord, trauma, malonyldialdehyde, N-acetylcysteine, rat

## KAYNAKLAR

1. Black P, Markowitz RS, Keller S. Naloxone and Experimental Spinal Cord Injury: Part 2 Megadose Treatment in a Dynamic Load Injury Model. *Neurosurgery* 1986;19:909-13.
2. Anderson TE. Spinal cord contusion injury: experimental dissociation of hemorrhagic necrosis and subacute loss of axonal conduction. *J.Neurosurgery* 1985;62:115-9.
3. Haghghi SS, Chehrazi B. Effect of Naloxone in Experimental Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 1987;20:385-95.
4. Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in Neurological Disease. *Neurosurgery* 1998;42:555-72.
5. Levasseur JE, Patterson JL, Ghatak NR, Kontos HA. Combined effect of respirator-induced ventilation and superoxide dismutase in experimental brain injury. *J Neurosurgery* 1989;71:573-7.
6. Ikeda Y, Long DM. The Molecular Basis of Brain Injury and Brain Edema: The Role of Oxygen Free Radicals. *Neurosurgery* 1990;27:1-11.
7. Guha A, Tator CH, Piper I. Effect of a calcium channel blocker on posttraumatic spinal cord blood flow. *J Neurosurgery* 1987;66:423-30.
8. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada prooksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1988;2:336-41.

9. Faden AL, Simon RP. A potential role of excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988;23:623-6.
10. Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22:987-92.
11. Balentine JD. Spinal cord trauma: in search of the meaning of granular axoplasm and vesicular myelin. *J Neuropathol Exp Neurol* 1986;47:77-92.
12. Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: Acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1993;33:285-92.
13. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurgery* 1991;75:15-26.
14. Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Aksoy K. (Editör). *Temel Nöroşirürji*. Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları; 2005. s.1144-55.
15. Iizuka H, Yamamoto T, Iwasaki Y. Experimental spinal cord injury: quantitation of axonal damage by automated image analysis. *J Neurosurgery* 1986;64:304-8.
16. Tator CH. Acute management of spinal cord injury. *Br J Surg* 1990;77:485-6.
17. Bravo P, Labarta C, Alcaraz MA. Outcome after vertebral fractures with neurological lesion treated either surgically or conservatively in Spain. *Paraplegia* 1993;31:358-66.
18. Brooks ME, Ohry A. Conservative versus surgical treatment of the cervical and thoracolumbar spine in spinal trauma. *Paraplegia* 1992;30:46-9.
19. Dickson RA. Spinal injuries: early surgical treatment. *Paraplegia* 1992;30:43-5.
20. Ohi M, Ide C, Tohyama K. Nerve regeneration in the dorsal funiculus of the rat spinal cord: A Light and Electron microscopic study. *Arch Histol Cytol* 1989;52:373-86.
21. Wagner FC, Chehraz B. Early decompression and neurological outcome in acute cervical cord injury. *J Neurosurgery* 1982;56:699-705.
22. Rubinstein A, Arbit E. Spinal Cord Blood Flow in the Rat under Normal Physiological conditions. *Neurosurgery* 1990;27:882-6.
23. Harrison MBM, Pollard JD. Pattern of Schwann cell remyelination in a spinal cord lesion. *Neurosci Lett* 1984;52:275-80.

24. Dohrmann GJ, Wick KM. Demonstration of the microvasculature of the spinal cord by intravenous injection of the fluorescent dye, thioflavine S. *Stain Technol* 1971;46:321-2.
25. Kaptanoğlu E, Tator CH. Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejileri. Zileli M, Özer F (Editörler). *Omurilik ve omurga cerrahisi*. İzmir: Saray Medikal Yayıncılık San. Tic. Ltd. Şti; 2002. s.813-32.
26. İldan F, Polat S. Effects of Naloxan on Sodium and Potassium activated and Magnesium dependent Adenosine5 Triphosphatase Activity and Lipid Peroxidation and Early Ultrastructural Findings after Experimental Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 1995;36:797-805.
27. Kurihara M. Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. Relationship between Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and lipid peroxidation. *J Neurosurgery* 1985;62:743-9.
28. Stokes BT, Fox P, Hollinden G. Extracellular Calcium Activity in the injured Spinal Cord. *Experimental Neurology* 1983;80:561-72.
29. Anderson DK, Means ED, Waters TR. Microvascularperfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurgery* 1982;56:106-13.
30. Braughler JM. Methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurgery* 1987;67:102-5.
31. Barut S, Ünlü YA, Karaoğlan A, Tunçdemir M, Dağistanli FK, Öztürk M. et all. The neuroprotective effect of z-DEVD.fmk, a caspase-3 inhibitor on traumatic spinal cord injury in rats. *Surgical Neurology* 2005;64:213-20.
32. Li M, Ona VO, Kaul M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mause model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 2000;99:333-42.
33. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 2002;177:306-13.
34. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1983; 23:239-57.
35. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; 8:3906-11.
36. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. *Biyokimya Dergisi* 1995; 4:43-56.



37. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 1994; 81:637-47.
38. Sohal RS, Brunk UT. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. *Mutat Res* 1992; 275(3-6):295-304.
39. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg* 1991;161(4):488-503.
40. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. *Biyokimya Dergisi* 1985; 2:60-89.
41. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998; 33(10):1536-9.
42. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, Hornstra G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. *J Appl Physiol.* 1997; 83(3):746-52.
43. Kolb H, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 1992; 13(5):157-60.
44. Mustafa NA, Yandı M, Turgutalp H, Ovalı E, Aydemir V, Albayrak L. Role of diltiazem in ischemia-reperfusion injury of the intestine. *Eur Surg Res* 1994; 26(6):335-41.
45. Molnar Z, Shearer E, Lowe D. N-Acetylcysteine treatment to prevent the progression of multisystem organ failure: a prospective, randomized, placebo-controlled study. *Crit Care Med* 1999; 27(6):1100-4.
46. Ayvaz S. N-asetilsisteinin intestinal iskemi- reperfüzyon hasarına etkisi (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2005.
47. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23(1):21-48.
48. Demir S, İnal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 1998; 275:127-35.
49. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42(8):513-9.
50. Stewart S, Ryan C, Poropat S. Managing patients with acute myocardial ischemia and reperfusion injury with N-acetylcysteine. *Dimens Crit Care Nurs* 1997; 16(3):122-31.

51. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50 Suppl 1:31-42.
52. van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107(5):1437-41.
53. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6):593-7.
54. van Herwaarden CL, Bast A, Dekhuijzen PN. The role of N-acetylcysteine in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Neth J Med* 1995; 47(2):45-8.
55. Wong JW, Ebeler SE, Rivkah-Isseroff R, Shibamoto T. Analysis of malondialdehyde in biological samples by capillary gas chromatography. *Anal Biochem* 1994; 220(1):73-81.
56. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20(2):123-34.
57. Spapen H, Zhang H, Demanet C, Vleminckx W, Vincent JL, Huyghens L. Does N-acetyl-L-cysteine influence cytokine response during early human septic shock? *Chest* 1998; 113(6):1616-24.
58. Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 1995; 346(8974):547-52.
59. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem* 1979;95:351-8.
60. Ramer LM, Ramer MS, Steeves JD. Setting the stage for functional repair of spinal cord injuries:a cast of thousands. *Spinal Cord* 2005;43:134-61.
61. McCall JM, Braugher JM, Hall ED. Lipide peroxidation and the role of oxygen radicals in CNS injury. *Acta Anaesthesiol Belg* 1987;38:373-9.
62. Clausen F, Lundqvist H, Ekmark S, Lewen A, Ebendal T, Hillered L Oxygen free radical-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase mediates apoptosis-like cell death after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004;21:1168–82.
63. Soffel M, Eriskat J, Plesnila M, Aggrawal N, Baethman A. The penumbra zone of a traumatic cortical lesion: a microdialysis study of excitatory amino acid release. *Acta Neurochir* 1997;70: 91-3.

64. Tanaka H, Katayama Y, Kawamata T, Tsubobawa T. Excitatory amino acid release from contused brain tissue in to surrounding brain areas. *Acta Neurochir* 1994; 60(Suppl): 524-7.
65. Grisar JM, Bolkenius FN, Petty MA, Verne J. 2,3-Dihydro-1-benzofuran-5-ols as analogues of  $\alpha$ -tocopherol that inhibit in vitro and ex vivo lipid autoxidation and protect mice against central nervous system trauma. *J Med Chem* 1995;38: 453-8.
66. Evans PH. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* 1993;49:577-87.
67. Santangelo F. Intracellular thiol concentration modulating inflammatory response: influence on the regulation of cell functions through cysteine prodrug approach. *Curr Med Chem* 2003;10:2599-610.
68. Thomale UW, Griebenow M, Kroppenstedt SN, Unterberg AW, Stover JF. The effect of N-acetylcysteine on posttraumatic changes after controlled cortical impact in rats. *Intensive Care Med* 2006;32:149-55.
69. Southorn PA. Free radicals in medicine. Chemical Nature and biological reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-9.
70. Ferrari G, Green LA. N-acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995;15:2857-66.
71. Krasowska A, Konat GW. Vulnerability of brain tissue to inflammatory oxidant, hypochlorous acid. *Brain Res* 2004;997:176-84.
72. Nicoletti VG, Marino VM, Cuppari C, Licciardello D, Patti D, Purello VS, Stella AM. Effect of antioxidant diets on mitochondrial gene expression in rat brain during aging. *Neurochem Res* 2005;30:737-52.
73. Ustun ME, Duman A, Ogun CO, Sumer F, Gubbilek M. Effects of deferoxamine on tissue superoxide dismutase and glutathione peroxidase levels in experimental head trauma. *J Trauma* 2001;51:22-5.
74. Jayalakshmi K, Sairam M, Singh SB, Sharma SK, Ilavazhagan G, Banerjee PK. Neuroprotective effect of N-acetyl cysteine on hypoxia-induced oxidative stress in primary hippocampal culture. *Brain Res* 2005;1046:97-104.
75. Nehru B, Kanwar SS. N-acetylcysteine exposure on lead-induced lipid peroxidative damage and oxidative defense system in brain regions of rats. *Biol Trace Elem Res* 2004;101:257-64.

76. Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med* 1998;21:309-34.
77. Üstün ME, Gürbilek M, Ak A, Vatansever H, Duman A. Effect of magnesium sulfate on tissue lactate and malondialdehyde levels in experimental head trauma. *Int Car Med* 2001;27: 264-8.
78. Vagnozzi R, Marmarou A, Tavazzi B, Signoretti S, Di Pierro D, del Bolgia F, et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury. *J Neurotrauma* 1999;16:903-13.
79. Hsiang JN, Wang JV, Ip SM, Stadlin A, Yu AL. The time course and regional variations of lipid peroxidation after diffuse brain injury in rats. *Acta Neurochir* 1997;139(Suppl):464-8.
80. Demir S, Inal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta* 1998;275:127-35.
81. Cakir O, Erdem K, Oruc A, Kilinc N, Eren N. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine and hypothermia on the spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 2003;11: 375-9.
82. Paintlia MK, Paintlia AS, Barbosa E, Singh I, Singh AK. N-acetylcysteine prevents endotoxin-induced degeneration of oligodendrocyte progenitors and hypomyelination in developing rat brain. *J Neurosci Res* 2004;78:347-61.
83. Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, Wiberg M. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* 2004;125:91–101.
84. Thomas Dickey D, Muldoon LL, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res* 2004;193:25-30.
85. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabro G, Cucinotta G, et al. Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:537-48.
86. Sekhon B, Sekhon C, Khan M, Patel SJ, Singh I, Singh AK. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2003;971:1-8.
87. Shen WH, Zhang CY, Zhang GY. Antioxidants attenuate reperfusion injury after global brain ischemia through inhibiting nuclear factor-kappa B activity in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24:1125-30.

88. Khan M, Sekhon B, Jatana M, Giri S, Gilg AG, Sekhon C, Singh I, Singh AK Administration of N-acetylcysteine after focal cerebral ischemia protects brain and reduces inflammation in a rat model of experimental stroke. *J Neurosci Res* 2004;76:519-27.
89. Hashimoto K, Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Shimizu E, Iyo M. Protective effects of N-acetyl-L-cysteine on the reduction of dopamine transporters in the striatum of monkeys treated with methamphetamine. *Neuropsychopharmacology* 2004;29:2018-23.
90. Tian H, Zhang G, Li H, Zhang Q. Antioxidant NAC and AMPA/KA receptor antagonist DNQX inhibited JNK3 activation following global ischemia in rat hippocampus. *Neurosci Res* 2003;46: 191-7.
91. Sochman J. N-acetylcysteine in acute cardiology: 10 years later: what do we know and what would we like to know. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1422-8.
92. Kaynar MY, Erdinler P, Tadayyon E, Belce A, Gumustas K, Ciplak N. Effect of nimodipine and N-acetylcysteine on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Neurosurg Rev* 1998;21:260-4.
93. Ellis EF, Dodson LY, Police RJ. Restoration of cerebrovascular responsiveness to hyperventilation by the oxygen radical scavenger N-acetylcysteine following experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 1991;75:774-9.
94. Xiong Y, Peterson PL, Lee CP. Effect of N-acetylcysteine on mitochondrial function following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 1999 ;16:1067-82.
95. Yi JK, Hazell ASN-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury. *Brain Res* 2005;1033:13-9.

## **EKLER**

## EK I



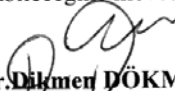
T.C.  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı: 17

Karar Tarihi: 15.12.05

1-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 01.12.2005 tarihinde; 09.09.2004 tarih ve 2004/ 094 no'lu etik kurul onayı almış olan "**Deneysel Omurilik Yaralanmalarında N-asetilsisteinin Sekonder Hasar Üzerine Etkileri**" adlı Araş.Gör.Dr.Turgay PARSAK'ın tez çalışmasını incelemek üzere toplandı ve çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonunda çalışmanın Fakültemiz Nöroşirurji Anabilim Dalında yapılacağı Yrd.Doç.Dr.Tufan HİÇDÖNMEZ'in yürütücüsü olduğu; araştırma protokolünün amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemler dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan Hakları Evrensel Bildirgesi ve etik kurallara uygun olarak hazırlandığına ve yapılabileceğine mevcudun oybirliği ile karar verildi.

  
**Doç.Dr. Dilmen DÖKMECİ**  
BAŞKAN  
Farmakolog

**Doç. Dr. Betül BİNER**  
ORHANER  
Üye  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları  
Uzmanı

**Doç. Dr. Dilek MEMİŞ**  
Klinisyen Üye  
Anesteziyoloji Uzmanı

**Doç.Dr. Betül UĞUR ALTUN**  
Klinisyen Üye  
İç Hastalıkları Uzmanı

**Yrd.Doç.Dr. Ümit Nusret**  
BAŞARAN  
Klinisyen Üye  
Çocuk Cerrahisi Uzmanı

**Yrd.DoçDr.Hakan ERBAŞ**  
Üye  
Biokimya Uzmanı

**Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA**  
Üye  
Patoloji Uzmanı

Posta Adresi:  
Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı  
Güllapoğlu Yerleşkesi  
22030 EDİRNE

Tel : (0284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: (0284) 235 76 52