

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

Tez Yöneticisi  
Yrd. Doç. Dr. Tufan HİÇDÖNMEZ

**DENEYSEL KÜNT KAFA TRAVMASINDA  
N-ASETİLSİSTEİNİN SEKONDER BEYİN HASARI  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**(Uzmanlık Tezi)**

**Dr. Mehmet TİRYAKİ**

EDİRNE - 2006

## **TEŞEKKÜR**

Nöroşirürji uzmanı olarak yetişmemde büyük emekleri olan başta Prof. Dr. Sebahattin Çobanoğlu olmak üzere sevgili hocalarım Yrd. Doç. Dr. M. Kemal Hamamcıoğlu'na, Yrd. Doç. Dr. Cumhur Kılınçer'e, Yrd. Doç. Dr. Tufan Hiçdönmez'e, Yrd. Doç. Dr. Osman Şimşek'e, bana yardımcı olan asistan arkadaşlarıma ve tüm klinik çalışanlarına, tez çalışmam sırasında, histopatolojik çalışmalarına yardımcı olan Doç. Dr. Mehmet Kanter, biyokimyasal çalışmalarına yardımcı olan Yük. Kimyager Şentürk Çiftçi'ye ayrıca eğitimim süresince bana büyük bir özveri gösteren sevgili eşim ve biricik kızıma, beni yetiştiren anne ve babama teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|                                                    |           |
|----------------------------------------------------|-----------|
| <b>GİRİŞ VE AMAÇ.....</b>                          | <b>1</b>  |
| <b>GENEL BİLGİLER .....</b>                        | <b>3</b>  |
| <b>KAFA TRAVMALARININ SINIFLANDIRILMASI.....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>KAFA TRAVMALARININ FİZYOPATOLOJİSİ.....</b>     | <b>3</b>  |
| <b>TRAVMAYA BAĞLI BEYİN HASARININ NÖROKİMYASAL</b> |           |
| <b>MEKANİZMALARI.....</b>                          | <b>6</b>  |
| <b>ANTIOKSİDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI .....</b>     | <b>10</b> |
| <b>N-ASETİLSİSTEİN .....</b>                       | <b>10</b> |
| <b>GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>                     | <b>13</b> |
| <b>BULGULAR.....</b>                               | <b>19</b> |
| <b>TARTIŞMA.....</b>                               | <b>24</b> |
| <b>SONUÇLAR.....</b>                               | <b>28</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                                   | <b>30</b> |
| <b>SUMMARY.....</b>                                | <b>31</b> |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>                              | <b>33</b> |
| <b>EKLER</b>                                       |           |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|                                   |                                               |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>AA</b>                         | : Araşidonik asit                             |
| <b>AMP</b>                        | : Adenozin monofosfat                         |
| <b>AMPA</b>                       | : 3-hidroksi-5-metil-4 izoksaloleprionik asit |
| <b>Asp</b>                        | : Aspartat                                    |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat                          |
| <b>BOS</b>                        | : Beyin omurilik sıvısı                       |
| <b>EAA</b>                        | : Eksitatör amino asit                        |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit                           |
| <b>H&amp;E</b>                    | : Hemotoksilen-eosin                          |
| <b>HO-1</b>                       | : Hemoksigenaz 1                              |
| <b>HO<sub>2</sub><sup>-</sup></b> | : Hidroperoksil radikali                      |
| <b>KBB</b>                        | : Kan beyin bariyeri                          |
| <b>KİB</b>                        | : Kafa içi basıncı                            |
| <b>KKK</b>                        | : Kallikrein-kininojen-kinin                  |
| <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>OH<sup>-</sup></b>             | : Hidroksil radikali                          |
| <b>P CO<sub>2</sub></b>           | : Parsiyel karbondioksit basıncı              |
| <b>PG</b>                         | : Prostoglandinler                            |

|            |                         |
|------------|-------------------------|
| <b>SDS</b> | : Sodyum dodesil sülfat |
| <b>SKA</b> | : Serebral kan akımı    |
| <b>TBA</b> | : Tiobarbitürik asit    |
| <b>TNF</b> | : Tümör nekroz faktör   |

## GİRİŞ VE AMAÇ

Kafa travması, insanlık tarihi kadar eski olmasına rağmen, bu gün halen mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerinden biri olarak, çok büyük sayıda insan ve ekonomik maliyet kaybına yol açmaktadır (1,2). Günümüzde teknolojik gelişmelere ve insan eğitime paralel olarak travmaların önlenmesine yönelik çalışmalar sürmektedir. Tıp bilimindeki ilerlemeler ışığında, beynin biyokimyasal ve histokimyasal yapısı daha iyi anlaşılır hale gelerek kafa travmasının daha iyi değerlendirilmesi ve daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi mümkün olmaktadır. Kafa travmaları, neden, sıklık, yaralanma şekli ve oluşum mekanizmaları bakımından önemli farklılıklar göstermektedir. Travmaya bağlı oluşan beyin hasarı, etki eden güçlerin direk etkisi ile oluşan primer (birincil) hasar ve daha sonra gelişen çeşitli metabolik olayların zincirleme reaksiyonu sonucu oluşan sekonder (ikincil) hasar şeklinde olmaktadır (3). Kafa travmasına bağlı primer hasarı önlemeye yönelik çalışmalar ancak koruyucu yöntemler geliştirmek ve eğitim ile olmaktadır. Son yıllarda yapılan deneysel ve klinik çalışmalar daha çok birincil hasarı takiben gelişen fizyopatolojik değişikliklere bağlı ortaya çıkan sekonder hasarı önlemeye yönelmiştir.

Serbest radikal salınımı ve hücre hasarı sekonder hasarla suçlanan önemli fizyopatolojik mekanizmalar arasındadır. Bu konuda çalışmalar son yıllarda giderek artmaktadır. Serbest oksijen radikallerinin sekonder hasarlanmada yaptığı en önemli patolojik süreç membran hasarı sonucu hücre ölümü ile biten lipid peroksidasyonudur (4-9).

Bu deneysel çalışmada, standardize edilmiş deneysel künt kafa travması modelinde, ratlarda serbest oksijen radikallerine bağlı oluşan sekonder beyin hasarını değerlendirmek ve

antioksidan etkisi birçok sistem üzerinde deneysel çalışmalar ile gösterilmiş N-asetilsistein (NAC) maddesinin beyni sekonder hasardan koruyucu olası etkisini araştırmak amaçlandı.

## **GENEL BİLGİLER**

### **KAFA TRAVMALARININ SINIFLANDIRILMASI**

Kafa travmaları temel olarak; nedenlerine, mekanizmalarına ve sonuçlarına göre sınıflandırılır. Nedenlerine yönelik sınıflandırma, epidemiyolojik olarak önem taşımakla birlikte, bu grupta en yaygın neden trafik kazalarıdır. Pediatrik yaş grubunda yüksekten ve bisikletten düşmeler, erişkin yaş grubunda; saldırılar, intihar girişimleri, spor ve iş kazaları da diğer önemli nedenleri oluşturmaktadırlar (1,2). Mekanizmasına göre sınıflandırmada, kafa travmaları künt (kapalı) ve penetran (açık) yaralanmalar olarak ikiye ayrılırlar. Künt kafa travmaları en sık rastlanılan tiptir. Genellikle, hareket eden bir objenin kafaya çarpması ya da hareket eden kafanın düz bir yüzeye çarpması ile ortaya çıkmaktadır. Penetran yaralanmalar ise, çoğu kez düşük hızlı ajanlarla olmaktadır. Yüksek hızlı mermiler, yakın mesafede yaygın bir hasar oluşturmakla birlikte, uzak mesafede düşük hızlı ajanlar gibi davranmaktadırlar. Penetran yaralanmalar daima açık yara şeklinde olup, enfeksiyon riski taşırlar (1). Ciddiyetine göre ise hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılır. Travma sonucu oluşan beyin hasarı; büyük oranda ortaya çıkan nöral ve vasküler yaralanmaya bağlıdır. Bu hasar, doğrudan etki eden kuvvete bağlı olabileceği gibi, ödem, iskemi ve yer kaplayıcı lezyon oluşumu gibi sekonder komplikasyonlara bağlı olarak da gelişebilir (1).

### **KAFA TRAVMALARININ FİZYOLOGİSİ**

Travmatik beyin yaralanmaları primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olarak iki kategoriye ayrılır. Primer yaralanma travma anında ya da travmanın direkt etkisi sonucu beyin parankiminde ya da akselerasyon ve deselerasyon kuvvetlerine bağlı uzun beyaz cevher traktuslarında meydana gelir. Skalp ve kafatası yaralanmaları da bu kategori içinde yer alır.

Künt kafa travmasında primer beyin yaralanması yerel veya yaygın hasar şeklinde oluşabilir. Yerel lezyonlar, serebral kontüzyonlar, lacerasyonlar, hematomlar, beyin sapı yaralanmaları, kranyal sinir ve hipofiz sapı yaralanmalarını içerir. Primer yaygın beyin yaralanmaları serebral konküzyon ve yaygın aksonal yaralanmayı kapsar. Sekonder yaralanma ise travmayı takiben veya ondan belli bir süre sonra başlayan fizyopatolojik olaylar sonucunda oluşur. Primer yaralanmaya yanıt olarak dakikalar, saatler veya günler sonra gelişebilir. Nöronal harabiyet ve hücre ölümüne yol açarak klinik kötüleşme oluşturur. Sekonder beyin hasarı oluşturduğu bilinen durumlar sistemik ve kafa içi nedenler olarak ikiye ayrılabilir (10).

### **Sistemik Nedenler**

Ciddi kafa travması sonrası sık olarak ortaya çıkan, mortalite ve morbidite üzerinde oldukça etkili olan sistemik nedenlere bağlı beyin hasarlarından korunmak mümkündür. Deneysel çalışmalar ile erken dönemde ortaya çıkan hipoksi ve hipotansiyonun serebral perfüzyon ve oksijenasyonun kritik sınırların altına inmesine sebep olarak kötü çıkış tablosu oluşumunu arttırdığı doğrulanmıştır (10,11).

**Hipoksi:** Kafa travmalarında hipoksi mevcudiyetinin mortalite oranını %24 ile 50 arasında artırdığı gösterilmiştir (12).

**Hipotansiyon:** Acil servislere veya yoğun bakım ünitelerine getirilen travmalı olguların yaklaşık %35'inde sistemik hipotansiyon saptanmıştır. Erken dönemdeki hipotansiyonun mortalite oranını iki katına çıkardığı gösterilmiştir (12).

**Hiperkapni:** Serebrovasküler dilatasyon oluşturarak, kafa içi basıncını ve kitle etkisini artırır. Travma sonrası metabolik beyin asidozu ile birliktelik gösterir. Birçok araştırmacı bu etkinin nörolojik iyileşmeyi kötü yönde etkilediğinde birleşmektedir (13). Bununla birlikte son yapılan çalışmalarda, sıklıkla tedavi amacı için uygulanan kontrollü hiperventilasyona bağlı ileri derecede hipokapninin de eşit düzeyde zararlı olduğu gösterilmiştir.

**Hipokapni:** Vazokonstriksiyon, serebral kan volümünde ve serebral kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Serebral kan akımındaki uzun süreli azalma beyin yaralanmış bölgelerinde iskemi riskini arttırmaktadır. Aşırı hipokapni anaerobik metabolizmanın olduğu yerlerde vazokonstriksiyona yol açarak laktik asidozun artmasına neden olur (14,15).

**Hipertermi:** İskemi çalışmalarındaki hipertermi (39°C'nin üzerinde), eksitotoksik nörotransmitterlerin salınımının artması, proteinkinaz C aktivite değişikliği ve iskemik beyin hasarının fizyopatolojik etkilerinin artması ile görülmektedir. Deneysel travma çalışmalarında hipotermi'nin nöroprotektif etkisi ortaya konulmuştur (16,17).

### **Kafa İçi Nedenler:**

**Beyin şişmesi:** Kapalı kafa travması sonrası yaygın beyin şişmesinin 20 ila 30 dakika gibi kısa bir sürede olduğu bildirilmektedir. Bu şişmenin nedeni vasküler dilatasyon, serebral ödem veya her ikisinin birlikteliğidir (18).

**Beyin ödemi:** Beyin dokusunun, su içeriğinin artması sonucunda total kitlesinin artması ile karakterizedir. Ciddi kafa travmaları sonrası çıkış durumunun belirlenmesindeki önemli faktörlerden biridir (19). Beyin, kan-beyin bariyeri (KBB) tarafından anatomik ve fonksiyonel yönden, vasküler (arterler, kapillerler ve venler), hücre içi ve dışı beyin omurilik sıvısı (BOS) ve intertisyel sıvı olmak üzere üç kompartmana ayrılmıştır. Son 25 yıl içinde beyin ödemi sınıflandırmaları ortaya konmuştur. Patogenezinin göre beyin ödemi sınıflandırması vazojenik, sitotoksik, osmotik ve hidrostatik olarak yapılmaktadır (20).

Beyinde lokal bir yaralanma olduğunda, doğrudan etki eden kuvvete bağlı KBB'nin açılması, ölen nöral hücrelerden eksitator amino asit (EAA) ve trombotik materyalden serotonin salınması meydana gelir. Plasma içine yayılan glutamat, serotonin, kallikrein-kininogen-kinin (KKK) sistem ürünleri ve yağ asitleri ödemin yaralanma çevresine yayılmasına neden olur. Glutamat, kendi salınımını daha fazla artırarak hücre membranlarından  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  geçişinin artmasına, buna bağlı hücre ödemi ve nekroza neden olur. Serotonin bariyer açıklığını artırır ve serebrovasküler fonksiyonu bozar. Yağ asitleri hücresel enerji metabolizmasını bozarak hücre şişmesine ve KKK sistemi bariyer açıklığının artmasına, hücre yaralanmasına yol açar. Tüm bu ikincil olayların son aşamasında serbest radikaller ve lizozomal enzim aktivasyonları oluşur (20).

**Serebral hiperemi:** Travmatik vazoparalizi ve serebral hipervoleminin serebrovasküler genişlemeye yol açarak beyin şişmesi ve KİB artışı oluşturduğu klinik ve deneysel olarak gösterilmiştir. Ciddi kafa travmalarında, hipotalamus ve beyin sapındaki yaralanmaya bağlı oluşan serebral vazoparalizi, serebral kan akımının volüm artışını tetikler. Sonuçta, serebral şişme oluşmakta, kafa içi basınç artmakta, serebral perfüzyon basıncı azalmakta ve venöz dönüş engellenmektedir (21,22).

**Beyin herniasyonları:** Herhangi bir nedene bağlı kafa içi kitle artışı (hematom, abse veya beyin ödemi) beyin herniasyonuna yol açabilir. Bu durum ikincil olarak sıkışmış beyinde iskemi oluşturarak, tüm elektriksel, metabolik ve biyokimyasal olayların bozulmasına yol açabilir (23).

**Artmış kafa içi basınç:** Ciddi kafa travması sonrasında olguların %72'den fazlasında kafa içi basınç (KİB) artar (23). Kafa travması sonrası artmış KİB ile kötü çıkış durumu

arasındaki ilişki çok net olarak ortaya konmuştur (24). Artmış KİB ile nörolojik kötüleşme arasındaki ilişki ise net değildir fakat serebral kan akımındaki azalma ile ilişkisi açıktır.

**KİB ve serebral perfüzyon basıncı:** Genel olarak, KİB’de artma, yer kaplayan lezyon veya BOS akımında tıkanıklık olması sonucunda ortaya çıkar. Travmatik beyin yaralanmasından sonra, parenkimal kompartman farklı mekanizmalar ile artabilir. En sık görülen mekanizma serebral ödemdir. Travma sonrasında, fizyolojik, iskemik veya eksitotoksik mekanizmalar ile, genellikle aynı anda vazojenik ve sitotoksik ödem oluşur. Beyin ödemi yalnız kitle etkisi ile KİB’i artırmaz, burada parenkimin viskoelastik durumu ve kompliansı önemlidir. Ciddi kafa travması sonrası olguların %31’inden fazlasında basınç otoregülasyonu büyük oranda bozulmuş olabilir (25).

**KİB, serebral kan akımı ve metabolizma:** Deneysel travmatik beyin yaralanması çalışmalarında akut dönemde glikolitik mekanizmanın belirgin olarak arttığı gösterilmiş, oysa oksidatif metabolizmada değişiklik saptanmamıştır. Bu dönemi takiben nörolojik fonksiyonların geri gelmesine kadar olan sürede yaygın serebral metabolik azalma oluşmaktadır. Artmış glikolitik dönem ilk 4 ila 5 güne uzamakta, takiben oluşan azalmış glikolizis dönemi 6 ayda sonlanmaktadır. Erken travma sonrası dönemde serebral glikolizis ile serebral kan akımı (SKA) arasındaki anlamlı ilişki, oksijenin metabolizma oranı ile karşılaştırıldığında görülmemektedir. Mevcut bilgiler kafa travması sonrası SKA ile metabolizma arasındaki ilişkiyi açıklamak için yeterli değildir. Bu durumun açıklanması için daha ileri çalışmalar gerekmektedir (22,26). SKA metabolik ihtiyaç için yetersiz ise iskemi oluşur. Bu nedenle kafa travmasına bağlı ölümlerde, beyinde iskemik nekrozu gösteren nöropatolojik bulgular sıklıkla mevcuttur.

**Travma Sonrası Oluşan Nöbetler:** Travma sonrası ortaya çıkan nöbetler, ikincil hasarı tetikleyen önemli nedenlerdendir (27).

**Kafa İçi Enfeksiyonlar:** BOS fistülleri, açık ve penetran kafa yaralanmaları, KİB monitörlerinin uygulanması ve cerrahi girişimler kafa travmaları sonrası kafa içi enfeksiyon için risk faktörüdür.

## **TRAVMAYA BAĞLI BEYİN HASARININ NÖROKİMYASAL MEKANİZMALARI**

Nörokimyasal değişiklikler, temel olarak şu başlıklar altında toplanmıştır. 1- Fazla miktarda EAA salınımı, 2- Enflamatuvar sitokinlerin salınımı, 3- Apoptozis, 4- Kalpain proteolizi, 5- Serbest radikallerin oluşumu.

### **Eksitator Amino Asit Hipotezi**

EAA hipotezinin en büyük varsayımı; çok sayıda nörotransmitterlerin salınımının, içinde travmanın da bulunduğu değişik yaralanmalarda aşırı salınımı ve birikimi ile kesintisiz hücre hasarı başlattığı,  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine girerek hücre ölümüne yol açacağı esasına dayanır (27,28,29). EAA'ler üzerinde en çok çalışılanlar, memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleri olan Glutamat ve Aspartat'tır. Bunlar sinaptik geçişin yönlendirilmesi ve nöron içine iyon geçişinin kontrolünde rol oynarlar. Bu amino asitler, eksitator iletiden sorumlu oldukları halde belli koşullarda paradoksal olarak, nörotoksisitenin de potansiyel kaynağıdır (29,30,31). Travma, iskemi, epilepsi ve benzeri patolojik süreçler sırasında EAA salınımı ve buna bağlı olarak öncelikle AMPA ve Kainat reseptör kanalları yoluyla  $Na^+$  hücre içine girer, hücrede şişme ortaya çıkar. İkinci aşama hücre içine normalin üzerinde  $Ca^{2+}$  girişidir ki, bu NMDA reseptör kanalları aracılığıyla gerçekleşir (30). Hücre içindeki  $Ca^{2+}$  artışı lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik (Calpain I ve diğer  $Ca^{2+}$  bağımlı proteazlar) enzimleri aktive edecektir. Proteolitik enzimlerle hücre zarı ve iskeletini oluşturan yapılar yıkılırken, lipolitik enzimler ise nöron membranındaki fosfolipidleri parçalarlar. Bu olay kısır bir olay olan araşidonik asit (AA) döngüsünü başlatır. AA enzimler aracılığı ile okside olur ve prostoglandinler (PG);  $PGE_2$ ,  $PGD_1$ ,  $PGF_1$ ,  $PGF_2$ ,  $PGG_2$ , prostasiklin, lökotrienler ve değişik hidroksi türevlerine dönüşür. Bu süreci takiben oluşan serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu sonucu hasar ilerler ve nöronun ölümü ile sonuçlanır (4,30,31).

### **Sitokinler**

Sitokinler (Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-10) ve tümör nekroz faktör (TNF) hücre hasarında temel rol oynayan veya travma sonrası hücre hasarını sınırlayan anti-enflamatuvar bileşiklerdir. Kortikosteroid ve prostoglandinlerin, sitokinlerin üretimini durdurdukları ve kontrollerini bozdukları gösterilmiştir (32,33).

### **Apoptozis**

Apoptozis ve hücre ölümünün programlanmasına olan ilgi son yıllarda artmıştır. Apoptozis histolojik olarak hücreyi nekroz aşamasından ayıran en önemli faktördür (34). Plazma membranı ile çevrili apoptotik cisimlerin tanınması, hücrenin büzülmesi, kromatinin yoğunlaşması, nükleusun piknotik hal alıp internükleozomal DNA'nın parçalanması, terminal deoksinükleotid transferazın aracılık ettiği deoksiüridin trifosfatın bozulması, apoptoz için DNA hasarını gösteren primer standartlardır. Nekroz ve apoptoz arasındaki evreye etki eden ajanlar mevcuttur. Kafa travması sonrası apoptozisi belirleyici mekanizmaların varlığı

gösterilebilirse, bunu engelleyecek farklı tedavilerin olabileceği ve hücre ölümünün durdurulabileceği düşünülmektedir (35).

### **Kalpain Proteolizi**

İrreversibl nöronal hasar gelişiminde,  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine girişinin ana faktör olduğuna ilişkin yaygın kanı mevcuttur (36). Fokal veya global iskemi, kafa travması Glutamat veya voltaj kanalları üzerinden  $Ca^{2+}$ 'un hücre içine girerek nöron hasar reaksiyonlarını başlatması ile sonuçlanır (37).  $Ca^{2+}$ 'un homeostazisi bozulduğunda, proteazlar, fosfatazlar, kinazlar ve lipazları içeren çok sayıda  $Ca^{2+}$  duyarlı enzim aktive olur. Bunlar arasında,  $Ca^{2+}$ 'un aktive ettiği hücre içi proteazlardan kalpainlerin aktivasyonu özellikle ilgi çekicidir.

### **Serbest Radikallerin Oluşumu Ve Hücre Ölümü**

Serbest radikaller, dış orbitalinde bir veya birden fazla (tek sayıda) elektron içeren molekül veya molekül parçalarıdır. Bir atom veya molekül, bir elektron vererek (oksidasyon) veya alarak (indirgenme) serbest radikal haline gelebilir (38). Biyolojik sistemler; normal koşullarda içerdikleri  $O_2$ 'nin büyük bölümünü tetravalan olarak indirgerler. Bu işlem için mitokondrilerdeki sitokrom oksidaz benzeri sistemleri kullanırlar. Normal koşullar içerisinde nadiren kullanılan, ancak bazı patolojik olaylarda artan univalan indirgeme ile değişik reaktivitelere sahip serbest radikaller oluşur. Bir, iki veya üç elektronun  $O_2$  ile reaksiyona girmesi sonucu sırasıyla; süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikali ( $OH^\cdot$ ) meydana gelir.  $H_2O_2$  serbest radikal değildir ancak hidroksil radikale dönüşür. Lipid, protein ve DNA molekülleri ile reaksiyona giren hidroksil radikali ise oldukça toksik bir yapıya sahiptir (5).

Bu indirgenme mitokondrial solunum zincirinin ilk basamağında oluşur. Ekstramitokondrial reaksiyonlarda ise hipoksantin ve ksantin, ksantin oksidaz tarafından ürik aside okside edildikleri reaksiyonda serbest radikaller oluşmaktadır. Bu reaksiyon iskemi-yeniden kanlanma esnasında serbest radikallerin başlıca oluşum şeklidir. Çünkü iskemi esnasında hipoksantin ve ksantin birikimi olmakta ve  $Ca^{2+}$  yükselmeside ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çeviren proteazları aktive etmektedir (5).

Hidroksil radikali son derece toksik bir yapıdır ve komşu lipid, protein ve DNA molekülleri ile reaksiyona girer. Hidroksil radikali, oksijen radikali ve  $H_2O_2$  nin oluşturduğu kimyasal reaksiyonda oluşur. Bu reaksiyona “Haber-Weiss reaksiyonu” adı verilmektedir. Bu reaksiyon doğal durumda çok yavaş olurken demir tarafından katalize edildiğinde

hızlanmakta ve böylece hidroksil radikali oluşumu hızla artmaktadır (5). Normal şartlar altında taşıyıcı proteinlerine (ferritin ve transferrin) sıkı şekilde bağlı olan  $Fe^{3+}$ , oksijen radikali varlığında ferritinden, asidoz varlığında da transferrinden ayrılır (5,39). Serbest radikaller kimyasal olarak güçlü reaktif moleküllerdir. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa serbest radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin oluştuğu zincirleme bir reaksiyonu başlatırlar (40).

Serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir; 1) lipidlerin peroksidasyonu ile hücre zarının geçirgenliği bozulur, 2) oluşan serbest radikaller çevrelerindeki zincirleme reaksiyonun yayılmasıyla daha uzaklardaki biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar oluşturur. Reaksiyona girdikleri biyolojik moleküller arasında, plazma membranı, hücre organellerinde bulunan doymamış yağ asitleri, çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve çeşitli sentez ve genetik kod aktarımını yöneten nükleik asitler yer alır (5,39).

Travmatik beyin yaralanması sonrası, serbest radikal hasarı oldukça önemlidir. Büyük lipid içeriği ve yüksek oranda oksidatif metabolizması nedeniyle beyin, oksijen radikalleri tarafından oluşturulan hücresel destrüksiyon için iyi bir hedeftir. Araşidonik asit metabolizması, kalsiyum tarafından uyarılma ile mitokondriden salınma, katekolaminlerin otooksidasyonu, damar dışına çıkma, hemoglobinin yıkılması ve ksantin oksidaz aktivasyonu gibi çeşitli yollarla oluşabilir. Araşidonik asit döngüsü travmatik yaralanmayı takiben serbest radikallerin oluşmasında en önemli yoldur. Özellikle, EAA salınımına bağlı olarak kalsiyum açığa çıkması sonucunda zararlı proteaz ve lipazların artışı olur (fosfolipaz A2, lipooksijenaz ve siklooksijenaz). Bu enzimler tromboksan A2, prostoglandin, lokotrien ve serbest yağ asitlerinden araşidonik asit oluşturur. Bu ürünlerin yıkılmasındaki döngüde serbest oksijen radikalleri üretilir. Hipoksantin-ksantin yolu kafa travmasını takiben serbest radikal kaynağı olarak ikinci önemli yoldur. EAA döngüsü ile tetiklenir, kalsiyum tarafından aktive edilen proteoliz ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza çevirir, sonuçta hipoksantin ksantine oksidasyonu gerçekleştirilir ve ürik asitle birlikte aynı zamanda oksijen radikalleri oluşur (41,42).

Serbest radikallerin oluşturduğu patolojik süreç; lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre membranının geçirgenliğinin bozulmasına yol açar. Bu süreçte bağımlı ve bağımsız oluşan zincirleme reaksiyonlar ile hücrenin diğer organelleri içerisinde bulunan doymamış yağ asitleri, bazı enzimlerin yapısına giren proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerde hasar oluştururlar (4,5,7).

Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer. Peroksidasyon, membranın lipid yapısındaki değişiklikler nedeni ile zar işlevinin bozulması, oluşan serbest O<sub>2</sub> radikallerinin hücrenin diğer bileşenlerine etkisi ile vasküler geçirgenlikte artma, enflamasyon, ödem, kemotaksis ile sekonder hücre hasarına yol açar (5,6,8). Lipid peroksidasyon son ürün olarak malonildialdehid (MDA) meydana getirir. MDA hücre zarından kolayca geçer ve hücre içinde Schiff bazlarıyla birleşerek, lipofuksin şeklinde sitoplazma içinde toplanır. Hücre kültürlerinde yapılan çalışmalar, MDA'nın genotoksik ve mutajenik etkileri olduğunu ortaya koymuştur (9).

### **ANTIOKSIDAN SAVUNMA MEKANİZMALARI**

Antioksidanlar endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılırlar:

- 1- Endojen antioksidanlar: Bu gruba organizmada kendisi veya öncülü bulunan antioksidanlar girer. Örneğin; süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz , katalaz,  $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, glutatyon, vitamin C, bilirubin ve melatonin.
- 2- Eksojen antioksidanlar: Bu gruba ise daha çok organizmanın dışardan aldığı antioksidanlar girer. Örneğin; Allopurinol, folik asit, soya fasulyesi tripsin inhibitörü, difenilin iyodür ve desferoksamin.

### **N-ASETİLSİSTEİN**

N-asetilsistein'in bir glutatyon prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur (43,44).

### **Farmakokinetik**

NAC, doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç aminoasitten biridir. Asetilsistein C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>3</sub>S şeklinde formüle edilir. Molekül ağırlığı 163.2 dir. %22 oranında suda erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir. 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 (43-50).

### **Etki Mekanizması**

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 (44). 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  $H_2O_2$  düzeyini azaltır ve  $H_2O_2$ 'nin toksik etkilerine karşı hücreyi korur. NAC'ın toksik radikallere karşı koruyucu etkisi, Glutasyon biyosentezini arttırması ve Glutasyon prekürsörü olması nedeniyledir (45). 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 (46).

### **Tedavide Kullanımı**

1. Akciğer hastalıklarının tedavisinde: NAC mukoproteindeki kimyasal disülfid bağlarını parçalayan serbest sülfidril gruplarını içermesi sayesinde sekresyonların viskozitesini azaltarak mukolitik etki gösterir (44).

2. Kistik fibroz ve mekonyum ileusu: NAC içeren solüsyonlar oral ya da rektal uygulaması şeklinde özellikle kistik fibrozlu hastaların ince bağırsaklarında meydana gelen mekonyum ileusu olgularında başarıyla uygulanmaktadır (44).

3. Antidot olarak kullanım: NAC altın, kobalt ve diğer ağır metaller, karbontetraklorür, metimerkür, halotan, arsenik, asetaldehid, kumarin, interferon, bromobenzen, naftalin ve doxurubisin zehirlenmesinde de antidot olarak kullanılmaktadır (44,48).

4. Septik şok: Deneysel çalışmalarda NAC'ın hepato-splaknik kan akımını arttırdığı görülmüştür (49).

5. Parasetamol toksisitesi: NAC reaktif parasetamol metabolitlerin tükettiği mitokondrial ve sitozolik GSH depolarını doldurarak etki gösterir. Zehirlenmeden saatler sonra NAC verildiğinde nötrofiller üzerindeki etkisiyle hepatik hasarın ilerlemesine karşı koyar ve mikrodolaşımın yeniden oluşmasını sağlar (50).

6. Kardiovasküler sistem üzerine etkisi: NAC nitratın vazodilatör etkisine olan toleransı tersine çevirerek küçük kan damarlarında direkt vazodilatatör etki yapar. NAC'ın intravenöz uygulamasının miyokard infarktüsli hastalarda trombolitik ajan olarak kullanılabileceği ve gliseril trinitritin periferik ve koroner etkilerini potansiyelize ettiği

bildirilmiştir. NAC bir thiol bileşigi olarak küçük koroner damarların dilatasyonunu arttırır. (43-50).

### **Yan Etkileri**

NAC toksisitesi son derece nadirdir. Çok ender olarak anaflaksi, taşikardi, ürtiker ve bronkospazm gibi aşırı duyarlılık reaksiyonları gelişebilir (44).

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu deneysel çalışma Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Mikronöroşirürji Laboratuvarı (Şekil 1), Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alındı (Bkz. Ek1). Kullanılan denekler Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edildi. Deney hayvanları intraperitoneal yolla verilen 70 mg/kg ketamin (Ketalar 50 mg/ml 10 ml flakon, Pfizer İlaçları Ltd. İstanbul) ve 7 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun %2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer-Türk İlaç Ltd. İstanbul) ile spontan solunumda uyutuldu.



**Şekil 1. TüTF Mikronöroşirürji Laboratuvarında deneysel çalışmanın düzeneği.**





**Şekil 3. Deneysel standart kafa travması düzeneği ve deneğin konumu.**

Kafa travmasının, kapalı kafa travması olması ve tekrarlanabilir beyin hasarı oluşturması için Shapira ve ark. (51) tarafından tanımlandığı şekilde; kafatasının frontoparyetal konveksitesinde, orta hattın 1-2 mm sağında tespit edilen noktaya uygulandı. Bunun için 7 cm yükseklikten düşürülen ağırlık ile kafatası üzerinde yaklaşık 0,5 Joule çarpma enerjisi elde edildi (Şekil 2 ve 3).

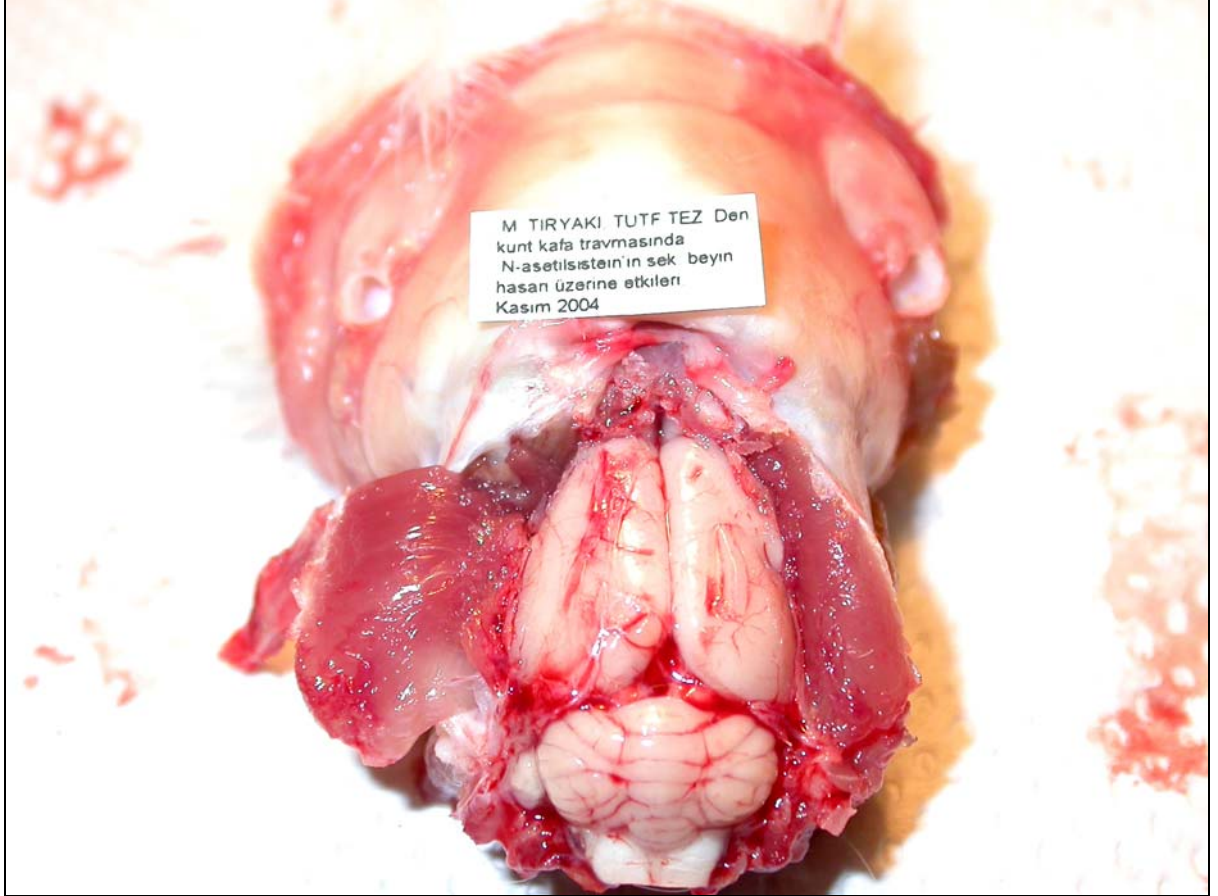
### **Deneyin Yapılışı**

Grup 1: Bu grupta kafa travması oluşturulmadı. Anesteziden uyanan denekler kafeslerine alındı.

A ve B altgruplarında (Grup 1A ve Grup 1B) sırasıyla 2. ve 12. saat sonunda anestezi altında dekapitasyon uygulanarak denekler sakrifiye edildiler. Beyinleri hasar verilmeden hızlı bir şekilde çıkarılarak, interhemisferik fissür boyunca, sağ ve sol hemisferlerine ayrıldılar (Şekil 4). Sağ hemisferden frontal ve oksipital poller ayrılarak 0.5 x 0.5 cm'lik nöral doku örneği alındı (Şekil 5). Bu doku iki parçaya ayrılarak, biri biokimyasal inceleme için – 70° C derin dondurucuda ve diğeri ise formaldehit solüsyonuna konarak patolojik inceleme için saklandı.

Grup 2: Anestezi sonrası serbest ağırlık düşürme temeline göre işleyen travma düzeneği ile sağ tarafta künt kafa travması oluşturuldu. Travma sonrası, A ve B altgruplarında (Grup 2A ve Grup 2B) sırasıyla 2. ve 12. saat sonunda anestezi altında dekapitasyon uygulanarak denekler sakrifiye edildiler. Travma sonrası A ve B altgruplarında (Grup 2A ve Grup 2B) yukarıda Grup 1 için tanımlanan yöntemle göre nöral doku örnekleri elde edildi.

Grup 3: Bu gruptaki ratlara travmadan 15 dk sonra N-asetilsistein (%2 Asist amp., Hüsnu Arsan) 150 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Travma sonrası A ve B altgruplarında (Grup 3A ve Grup 3B) yukarıda Grup 1 için tanımlanan yönteme göre nöral doku örnekleri elde edildi.



**Şekil 4. Rat deneğinde dekapitasyon sonrası kranyumun  ılması ve her iki beyin hemisferinin görünümü.**



**Şekil 5. Rat beyninin sağ hemisferinden incelemeler için doku alınması.**

### **Biyokimyasal İnceleme**

Nöral doku örneklerindeki MDA ölçümü Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Ana Bilim Dalı'nda gerçekleştirildi. -70°C' de dondurulmuş olan doku örnekleri, oda sıcaklığında %0.9 NaCl solusyonu ile iyice irrigé edildiler ve %1.5'luk KCl kullanılarak 1/10 oranında homojenize edildiler. ( Heidolph Instruments GmbH 8 Co.K6 Schwabach, Germany DIAX 900 Homogenizer ) Ardından santrifüje edilen örneklerdeki lipid peroksit düzeyi Ohkawa ve ark. (52) tanımladığı tiobarbitürik asit (TBA) yöntemi kullanılarak belirlendi. 0.2 ml 10 kat dilüe edilmiş 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 tiobarbitürik asit ve 0.6 ml distile su ile karıştırıldı. Karışım 95 °C' deki sıcak su banyosunda 1 saat tutuldu. Musluk suyu ile soğutulduktan sonra üzerine 1 ml distile su ve 5 ml butanol/piridin (15:1) eklenerek vorteksle 1 dakika karıştırıldı. Organik faz 4000 devir/dk da 10 dakika santrifüje edilerek ayrıldı. Absorbanslar homojenat içermeyen ayıraç körüne karşı 532 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Shimadzu UV-1208, Japan) okundu. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

### **Histopatolojik İnceleme**

Histopatolojik inceleme için ayrılan doku parçaları %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Örnekler daha sonra parafin ile bloklandı, 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve Hemotoksilen-eosin (H&E) ile boyandı. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda ışık mikroskobu (Nikon Optiphot II, Japan) ile X400 büyütme altında incelendi. Standart oküler grid kullanılarak her milimetrekaireye düşen sağlam ve hasarlanmış olan nöronlar belirlendi. Hemotoksilen-eozin ile boyanmış olan kesitlerde nöronların yoğunluğu ve dağılımı değerlendirildi. Doku kesitleri ışık mikroskobu altında incelendi, nöronların sayısı rastgele seçilen alanlarda, ışık mikroskobu kullanılarak sayıldı (eyepiece ·10, objective ·40, total alan uzunluğu 0.225 mm). Nöron yoğunluğu milimetreye düşen nöron sayısı olarak hesaplandı. Beyin dokusundaki nöron dağılımını kaydetmek için doku kompartmanları kullanıldı.

### **İmmünohistokimyasal İnceleme**

İmmünohistokimyasal inceleme Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Spesifik tavşan poliklonal anti-caspase-3 antikoru (Cat. # RB-1197-P, Neomarkers, USA) 1:50 dilüsyonda uygulandı. Yöntem aşağıdaki basamaklardan oluştu: (a) endojen peroksidaz aktivitesi 30 dakika boyunca distile suda 3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile inhibe edildi; (b) kesitler 30 dakika boyunca musluk suyu ile ve 10 dakika boyunca distile su ile yıkandı; (c) antikorların nonspesifik bağlanması PBS'li 1:4 dilüsyonda normal keçi serumu ile inkübe edilerek bloke edildi (DAKO X 0907, Carpinteria, CA); (d) kesitler PBS de 3 dakika yıkandı; (e) kesitler biotinylated anti-mouse IgG ile inkübe edildi (DAKO LSAB 2 Kit); (f) kesitler PBS de 3 dakika yıkandı; (g) kesitler ABC kompleksi ile inkübe edildi (DAKO LSAB 2 Kit); (h) kesitler PBS de 3 dakika yıkandı; (i) peroksidaz substrat olarak diaminobenzidin ile tespit edildi; (j) kesitler 10 dakika boyunca musluk suyu ile yıkandı ve daha sonra dehidrate edildi; (k) nükleus hematoksilen ile boyandı ve (l) kesitler DAKO'ya yerleştirildi.

### **İstatistiksel Analiz**

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.

## **BULGULAR**

### **Biyokimyasal Bulgular**

MDA değerleri Tablo 1’ de gösterilmiştir. Kapalı kafa travması (Grup 2) MDA düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdı ( $p<0,05$ ). Travmadan 15 dk. sonra tek doz NAC (150 mg/kg) verilmesinin MDA düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görüldü ( $p<0,05$ ). Altgruplar ele alındığında, 2. ve 12. saatlerdeki beyin dokusu MDA düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 2).

### **Histolojik Bulgular**

Kontrol grubunda (Grup 1), beyin dokusundaki nöronların morfolojisi normaldi. Kapalı kafa travması grubunda (Grup 2) hemotoksilen-eosin ile boyanan histolojik doku kesitlerinde oluşan en belirgin bulgu ağır dejeneratif değişiklikler, büzüşmüş sitoplazma, nöronlarda belirgin koyu piknotik nukleus ve aynı zamanda doku demini gösteren vakuolizasyondur. NAC ile tedavi edilen rat beyinlerinde (Grup 3), travmatik değişikliklerin yoğunluğu travma grubundan daha az bulundu. Koyu boyanmış nukleus ve büzüşmüş sinir hücreleri NAC ile tedavi edilen travmatize rat beyinlerinde gözlenmedi. Bu grupta, sitoplazmadaki ve özellikle hücrelerin nukleuslarındaki dejeneratif değişiklikler sadece travma oluşturulan gruptan daha azdı. Kapalı kafa travması uygulanan grubun frontal beyin dokusundaki nöron sayısı, kontrol grubundan ve travma + NAC tedavisi verilen gruptan istatistik olarak anlamlı oranda daha düşük bulundu ( $p<0,05$ ). Altgruplarda 2. ve 12. saatlerde morfolojik bir farklılık saptanmadı (Tablo 3).

**Tablo 1. Tüm grup (Grup 1, 2 ve 3) ve altgruplarda (Altgrup A ve B) Malonildialdehid (nm/mg protein) düzeylerinin ortalama (alt değer - üst değer) ve standart sapma değerleri.**

| <b>Grup 1 (Kontrol)</b>      | <b>Altgrup A (2. saat)</b> | <b>Altgrup B (12. saat)</b> |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 1                            | 3,50                       | 4,18                        |
| 2                            | 4,52                       | 3,26                        |
| 3                            | 4,27                       | 3,98                        |
| 4                            | 3,28                       | 3,18                        |
| 5                            | 4,13                       | 2,63                        |
| 6                            | 3,19                       | 2,51                        |
|                              | <b>3,82 (3,19 - 4,52)</b>  | <b>3,29 (2,51 - 4,18)</b>   |
|                              | <b>± 0,56</b>              | <b>± 0,68</b>               |
| <b>Grup 2 (Travma)</b>       |                            |                             |
| 1                            | 4,50                       | 4,68                        |
| 2                            | 5,11                       | 4,48                        |
| 3                            | 5,44                       | 3,83                        |
| 4                            | 5,09                       | 4,96                        |
| 5                            | 5,64                       | 4,21                        |
| 6                            | 5,34                       | 4,00                        |
|                              | <b>5,19 (4,50 - 5,64)</b>  | <b>4,36 (3,83 - 4,96)</b>   |
|                              | <b>± 0,39</b>              | <b>± 0,42</b>               |
| <b>Grup 3 (Travma + NAC)</b> |                            |                             |
| 1                            | 3,77                       | 2,19                        |
| 2                            | 4,12                       | 3,44                        |
| 3                            | 3,12                       | 2,40                        |
| 4                            | 4,27                       | 3,95                        |
| 5                            | 3,20                       | 3,35                        |
| 6                            | 3,79                       | 2,17                        |
|                              | <b>3,71 (3,12 - 4,27)</b>  | <b>2,92 (2,17 - 3,95)</b>   |
|                              | <b>± 0,46</b>              | <b>± 0,76</b>               |

**Tablo 2. Frontal beyin dokusunda tüm grup ve altgruplarda malonildialdehid (nm/mg protein) düzeyleri.**

| Grup                  | MDA (2. saat) | MDA (12. saat) |
|-----------------------|---------------|----------------|
| Grup 1 (Kontrol)      | 3.82 ± 0.56   | 3.29 ± 0.68    |
| Grup 2 (Travma)       | 5.19 ± 0.39*  | 4.36 ± 0.42*   |
| Grup 3 (Travma + NAC) | 3.71 ± 0.46   | 2.92 ± 0.76    |

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir. \* Grup 1 ve Grup 3' e kıyasla (p < 0.05) (MDA: Malonildialdehid)

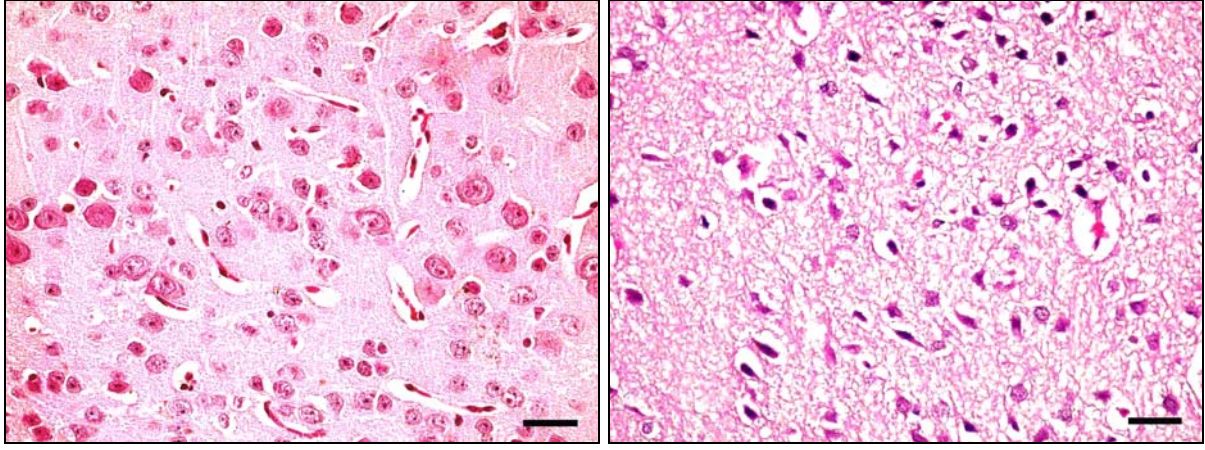
**Tablo 3. Grupların (sayı/mm) cinsinden, 2. ve 12. saatlerdeki nöron sayıları.**

| Grup                  | Beyin doku (2. saat) | Beyin doku (12. saat) |
|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Grup 1 (Kontrol)      | 75.63 ± 6.43         | 76.31 ± 6.81          |
| Grup 2 (Travma)       | 48.26 ± 4.38*        | 50.38 ± 4.34*         |
| Grup 3 (Travma + NAC) | 67.17 ± 5.93         | 68.12 ± 5.48          |

\* Grup 1 ve Grup 3' e kıyasla (p < 0.05)

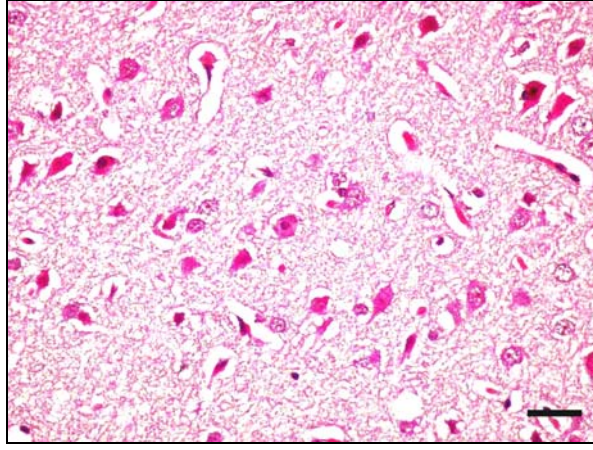
### **İmmunohistokimyasal Bulgular**

Caspase-3 immunohistokimya incelemesinde travmadan sonra apoptotik kortikal nöronlar gösterildi. Nöronların caspase-3 immunreaktifliği kontrol grubunda (Grup 1) belirgin değildi. Caspase-3 immunreaktifliğinin travmadan sonra 2 ve 12. saatlerde nöronlarında arttığı görüldü. NAC uygulanan grupta (Grup 3) travmadan sonra dejenere olmuş nöronların immunreaktivitelerinin belirgin bir şekilde azaldığı görüldü (Şekil 7 a, b ve c).



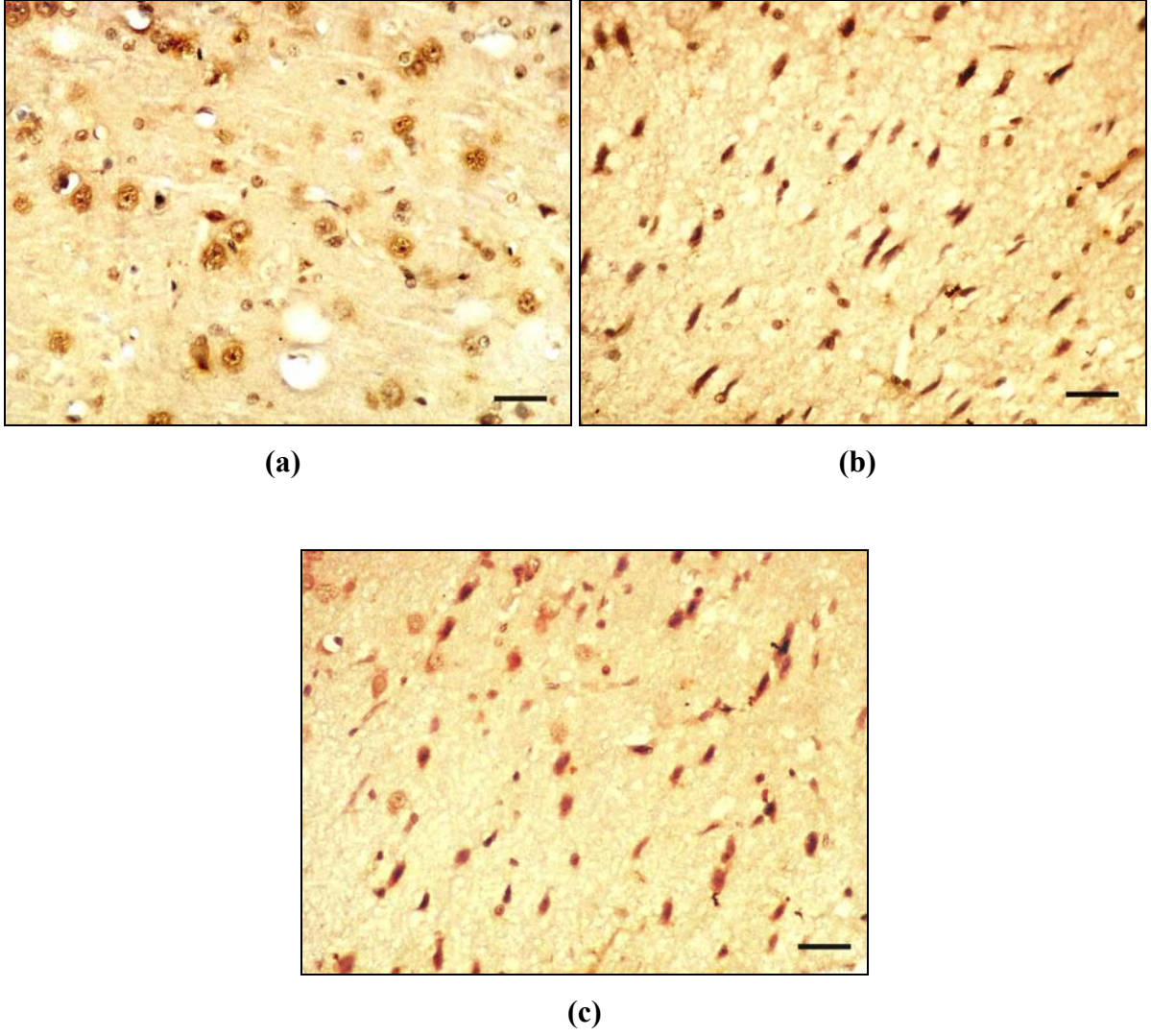
(a)

(b)



(c)

**Şekil 6. (a) Kontrol grubunda (Grup 1) doku histolojisi. (b) Travma grubunda (Grup 2) nöronlarda dejeneratif değişiklikler görülmekte ( koyu piknotik nukleus, ödem sonucu vakuolleşme). (c) Tedavi grubunda (Grup 3) travmatik dejeneratif değişikliklerin Grup 2'ye göre daha az belirgin olduğu görülmekte. Hematoksilen-eosin (H&E); Scala çizgisi=35µm.**



**Şekil 7. (a) Kontrol grubunda (Grup 1) nöronların caspase-3 immünoresaksiyonlarının belirgin olmadıkları görülmekte. (b) Travma grubunda (Grup 2) nöronlarda travma sonrası dönmede caspase-3 immünoaktivite artışı belirgin olarak görülmekte. (c) Tedavi grubunda (Grup 3) NAC tedavisinin travma sonrası dejenere olan nöronların immünoaktivitesini belirgin olarak azalttığı görülmekte. İmmünoperoksidaz, H&E counterstain; Scala çizgisi=35μm.**

## TARTIŞMA

Güçlü bir antioksidan, glutatyon prekürsörü,  $O_2$  ve  $H_2O_2$  düzeylerini düşüren bir serbest radikal temizleyicisi olan NAC'ın oksidatif stresi ve inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir (53-58). Glutatyonun dokuları iskemik yaralanmadan koruyucu olduğu iyi bilinmektedir (54,40,59). Beyin ve omurilik yaralanmalarında oksidatif stresin etkilerini inceleyen Juurlink ve Paterson, NAC gibi sistein prekürsörleri verilip azalmış glutatyon düzeyleri sağlanarak oksidatif stresin minimuma düşürülebileceğini rapor etmişlerdir (60).

NAC'ın antioksidan etkinliği, koruyucu ve/veya tedavi edici etkisi birçok deneysel hayvan çalışmasında bildirilmiştir (54,57,59-71). Bu çalışmaların çoğunlukla tamamı sinir sisteminin ve diğer sistemlerin iskemi ve iskemi-reperfüzyon durumlarını incelemektedir. Örneğin, Jayalakshmi ve ark. (57), invitro hipokampal hücre kültürlerinde, NAC'ın reaktif oksijen ürünü inhibisyonu ile hipoksiye bağlı oksidatif strese karşı korunan nöron oranının arttığını göstermişlerdir. Benzer şekilde Sekhon ve ark. (67), NAC verilmesinin beyin iskemisi rat modellerinde iskemiye azalttığını ve reperfüzyonu arttırdığını bildirmişlerdir. Yine, Khan ve ark. (72), deneysel rat inme modelinde, iskemi başlangıcından sonra NAC verilmesinin beyni serbest radikal hasarından, ve apoptozisden koruduğunu göstermişlerdir. Bu koruma artmış glutatyon düzeyi ve azalmış apoptotik hücre ölümü ile ilişkilidir. Bu modelde, hızla ve reperfüzyon sonrası 6 saat aralarla uygulanan çok düşük (50mg/kg) ve yüksek (500mg/kg) dozlarda NAC'ın koruma sağlamadığı görülmüştür. Buna karşılık, en yüksek koruyucu dozların 150 ve 250 mg/kg arasında olduğu belirlenmiştir. Bizim sonuçlarımız da, Khan ve ark.'nın NAC'ın etkinliği ve önerdikleri koruyucu NAC dozları ile ilgili sonuçları ile genel olarak uyumludur.

Buna karşılık, iskemi ve iskemi-reperfüzyon modellerinin tersine, nörotravma öncesi ve sonrası NAC tedavisinin etkinliği ile ilgili deneysel çalışmalar çok az sayıdadır. Az sayıda olan çalışmanın sonuçları da çelişkilidir. Böylece, beyin ve omuriliğin travmatik hasarında NAC'ın pozitif veya negatif etkisi tam olarak değerlendirilememiştir. Kaynar ve ark. (73) deneysel omurilik travma modelinde, travmadan hemen sonra verilen tek bir intraperitoneal dozun (163mg/kg) etkisini MDA düzeyini ölçerek araştırmışlar ve yaralanmadan bir saat sonraki erken dönemde lipid membranının peroksidasyonu üzerine NAC'ın etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmalarının negatif sonucunu, olasılıkla şu şekilde açıklamışlardır: NAC'ın sulfidril gruplarının oksidasyonu için mevcut bulunan  $Fe^{3+}$  miktarı; NAC verilme metodu ve yetersiz doz; ve lipid peroksidasyonu için diğer muhtemel yolların mevcudiyeti. Her ne kadar, metodolojik farklılık olsada, temelde benzer bir çalışma olarak, bizim pozitif sonuçlarımız Kaynar ve ark.'nın sonuçları ile uyumlu değildir. Olasılıkla, yaralanma sonrası hemen verilen tek bir NAC dozuyla ilk bir saat içerisinde belirlenen MDA düzeylerinin NAC tedavisi sırasındaki gerçek biyokimyasal olayları yansıtmayabileceği düşünülebilir. Farklılık olarak, bizim çalışmamızda, NAC travmadan 15 dk. sonra verildi. Sonuçlar 2. ve 12. saatlerde değerlendirildi. Ayrıca immunhistokimyasal olarak da sonuçlar doğrulandı. Zamanlama konusunda düşünüldüğünde, acil şartlarında, serebral ve/veya omurilik hasarlı hastalarda, NAC'ın tedavideki muhtemel kullanımı düşünüldüğünde, ilk 15 dk. uygulamasının gerçek acil koşullarını daha iyi şekilde simüle ettiğimizi düşünmekteyiz. Bir başka deneysel nörotravma çalışmasında, kobaylarda kontrollü kortikal travma sonrası gelişen posttravmatik değişikliklerde NAC'ın faydalı etkileri Thomale ve ark. (74) tarafından da doğrulanmamıştır. Bu çalışmada, travma sonrası 2 ve 4. saatlerde 163 mg/kg NAC uygulanmasını takiben 24 saat sonra posttravmatik perfüzyon, beyin ödemi gelişimi veya kontüzyon hacmi üzerine önemli bir pozitif etki saptanmamıştır. Buna rağmen, NAC tedavisi sonrası kontüzyon volümünde istatistiksel anlamlı olmayan azalma eğilimi, hücresel düzeyde nöronal koruyucu etkilerini belirlemek için ileri incelemelerin gerekli olduğunu ortaya koymuştur (74). Bizim sonuçlarımız Thomale ve ark.'nın nöronal korunma ile ilgili sonuçlarını desteklemektedir. Bizim çalışmamızda, kafa travması grubunda histolojik kesitlerin en belirgin bulguları; ağır dejenerasyon değişikliklerini, büzüşmüş sitoplazma ve ileri derecede koyu piknotik nükleusları içermektedir. Koyu boyanmış nükleus ve büzüşmüş sinir hücreleri temelde NAC ile tedavi edilmiş kapalı kafa travması oluşturulmuş ratlarda mevcut değildi. Bu grupta, sitoplazmadaki ve özellikle hücre nükleusundaki dejeneratif değişikliklerin şiddeti kapalı kafa travması oluşturulan gruptan daha azdı. Travma grubunun beyin dokusundaki nöronların sayısı da kontrol ve travma+NAC tedavisi alan gruplardan daha

düşüktü. Bizim sonuçlarımız, nöronal korunmada NAC'ın pozitif etkilerini ortaya koyma bağlamında Thomale ve ark.'nın sonuçlarını destekler nitelikteydi.

Diğer taraftan, Ellis ve ark.(75) sıvı-perfüzyon hasarını takiben serebrovasküler cevabı düzenlemede NAC'ın etkili olduğunu bildirmişlerdir. Xiong ve ark (76). kortikal yaralanmada mitokondrial disfonksiyona karşı NAC'ın etkili olduğunu göstermişlerdir. Yi and Hazell travma modelinde NAC'ın etkisini çalışmışlar; oksidatif stresi düşündüren hemoksigenaz-1 (HO-1) kafa travmasını takiben hasarlanmış serebral korteksin glial hücrelerinde aktive olduğunu, ve yaralanmadan 5 dk. sonra NAC verilmesinin HO-1 indüksiyonunda belirgin azalmaya neden olduğu sonucuna varmışlardır (77). Çalışmamızın sonuçları travmatik beyin hasarında NAC'ın etkisini inceleyen bu deneysel çalışmalar ile genel anlamda uyumludur.

NAC'ın posttravmatik beyin ödemi oluşumu üzerine etkilerinin detaylı çalışılmamış olmasına rağmen, Cuzzocrea ve ark. (66), serebral iskemi ve reperfüzyon hasarını takiben NAC'ın kortikal ve hipokampal bölgelerde beyin ödemi gelişimini azalttığını göstermişlerdir. Buna karşılık, Thomale ve ark. (74) NAC'ın posttravmatik ödem gelişimi üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Son bir deneysel çalışmada, Unterberg ve ark. (78) kontrollü kortikal yaralanma sonrası gelişen beyin ödeminin sitojenik ödem gelişimi ön planda olmakla birlikte, sitojenik ve vazojenik natürde olduğunu bildirmişlerdir. Cuzzocrea ve ark. (66) iskemik reperfüzyon modelinde NAC'ın vazojenik ödem oluşumunu etkili bir şekilde azalttığını rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, travmatize beyin örneklerinin histolojik değerlendirmesi, yaralanmadan 2 ve 12 saat sonra beyin dokusu ödeminin belirgin olarak ortaya koymuş ve bu ödemin NAC verilmesinden sonra belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Travmatik beyin yaralanmasından sonra ödem üzerine NAC'ın olası pozitif etkilerini belirlemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Caspase-3 P20 subünitesine karşı antikolar ile, immunohistokimyasal boyama korteks ve hipokampustaki pozitif nöronların normalden çok olduğunu ve bunların 2. saatte arttığını, 1. ve 3. günler arasında en üst düzeye ulaşarak 7. günde sonlandığı gösterilmiştir (79). Caspase-3 immünboyama, travmatik beyin hasarı sonrası 24. saatte lezyonlu alanın etrafındaki nöronlarda gözlenmiş ve immünpozitif nöronların sayısı yaralanma sonrası 48. ve 72. saatlere kadar artmıştır. Profilaktik amaçlı veya yaralanma sonrası aminoguanidin tedavisi verilen alan ratlarda, beyindeki caspase-3 immünpozitif nöronların sayısı serum fizyolojik enjeksiyonu verilenlere göre artmış olduğu görülmüştür (80). Cernak ve ark. (81) diffüz yaralanma sonrası 4 saat kadar erken bir dönemde artmış caspase-3 protein ekspresyonunu göstermişlerdir. Böylece, diffüz travmatik beyin hasarından sonra apoptozisin erken aktive olduğu ve travma sonrası en azından 5 gün sürdüğü görülmektedir. Bazı caspase'lar

apoptozisle ilişkili olmayan bazı durumlarda da aktive olmakla birlikte, caspase-3 aktivitesi apoptoz için spesifik bir gösterge olarak kabul edilmektedir (82). Caspase-3 aktivitesinin deneysel çalışmalarda ve travmatik klinik beyin yaralanmasında olduğu gibi iskemik olaylar sonrası da arttığı gösterilmiştir (83,84). Deneysel fokal beyin travmasını takiben korteks ve hipokampusta apoptozis oluşumu, dört saat kadar erken bir dönemde artış gösteren ve travma sonrası en az üç gün kadar süren caspase-3 mRNA ekspresyonunun başlaması ile korele bulunmuştur (85). Bizim çalışmamızda, caspase-3 immünopozitivite travma sonrası 2. ve 12. saatlerde beyin dokusunun nöronlarında artmış olarak bulunmuştur. NAC tedavisinin, travma sonrası dejenere olan nöronlardaki immünoreaktiviteyi belirgin bir şekilde azalttığı gözlenmiştir. İmmünohistokimya sonuçlarımız yukarıda sözedilen kaynakların bulgularını destekler özelliktedir.

Sonuç olarak, bu deneysel çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarımız kafa travmasından 15 dk. sonra tek bir doz şeklinde NAC verilmesinin, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesi ve serebral hasarlanmada nöronal korunma üzerine etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular ile, NAC'in en etkili koruyucu ve tedavi dozunu ve en uygun uygulama zamanlamasını belirlemek için daha ileri çalışmalara gereksinim olduğunu düşünmekteyiz.

## SONUÇ

Bu deneysel çalışmada, travmatik beyin hasarı sonrası, serbest radikallerin artışının tetiklediği, sekonder hasarı önlemeye yönelik olarak, antioksidan etkisi bilinen ve insanda bir çok hastalık tedavisinde kullanılan N-asetilsistein'in (NAC) etkisi deneysel künt kafa travması modelinde araştırıldı. NAC'ın, glutatyon prekürsörü, antioksidan ve serbest radikal temizleyicisi olarak yararlı etkileri, santral sinir sistemi iskemi ve iskemi/reperfüzyon modelleriyle ortaya konulmuştur. Ancak NAC'ın santral sinir sistemi travmasındaki etkileri daha az incelenmiştir.

Çalışmamızda NAC'ın etkisi; Nöral dokuda lipid peroksidasyonunun iyi bir göstergesi olan MDA düzeyine olan etkisinin biyokimyasal tayini, nöral dokuda ortaya çıkan histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler ile belirlendi.

1. MDA düzeyine etkisi: Künt kafa travmasının, kontrollerle kıyaslandığında, doku MDA düzeylerini yükselttiği ve travmadan 15 dk. sonra tek doz NAC (150 mg/kg) uygulanmasının, artmış MDA düzeylerini anlamlı oranda düşürerek koruyucu etki gösterdiği belirlendi.

2. Histopatolojik değişiklikler: Travmaya maruz kalan nöronların ileri derecede koyulaştığı ve piknotik nukleuslarında dejenerasyon geliştiği; tedavi edilen grupta nöronların morfolojisinin oldukça iyi korunduğu belirlendi. Sadece travmaya maruz kalan grupta nöron sayısı, hem kontrol grubundan hem de NAC tedavisi uygulanan gruptan anlamlı derecede daha düşük bulundu.

3. İmmunohistokimyasal değişiklikler: Travma sonrası ortaya çıkan caspase-3 immunoreaktivite artışının, NAC tedavisini takiben belirgin olarak azaldığı görüldü.

Bu sonuçlar ile, NAC' ın ratlarda oluşturulan deneysel kafa travması sonrası ortaya çıkan sekonder beyin hasarının önlenmesinde etkili olabileceği sonucuna varıldı.

## ÖZET

N-asetilsistein' in, glutasyon prekürsörü, antioksidan ve serebest radikal temizleyicisi olarak yararlı etkileri, santral sinir sistemi iskemi ve iskemi/reperfüzyon modelleriyle ortaya konmuştur. Ancak N-asetilsistein'in santral sinir sistemi travmasındaki etkileri daha az anlaşılmıştır. Bu çalışmada, ratlarda oluşturulan deneysel künt kafa travması modeliyle N-asetilsistein'in sekonder hasar üzerine tedavi edici etkisi incelenmeye çalışılmıştır.

Otuz altı erkek Sprague–Dawley rat, her bir grupta 12 rat olacak şekilde rastgele üç gruba ayrıldı: Grup 1 (kontrol), Grup 2 (travma), ve Grup 3 (travma + N-asetilsistein tedavisi). Grup 2 ve 3' de, koronal sütürün hemen önünde ve sağ hemisferde bir noktaya gelecek şekilde kafatasına 7 cm yükseklikten bir travma uygulandı. Ratlar, travmadan sonra 2. saatte (Altgrup 1A, 2A ve 3A) ve 12. saatte (Altgrup 1B, 2B ve 3B) sakrifiye edildi. Beyin dokusu biyokimyasal ve histopatolojik inceleme için çıkarıldı. Künt kafa travması kontrollerle kıyaslandığında doku malonildialdehid düzeylerini önemli oranda yükseltti ( $p < 0.05$ ). Travmadan sonra tek doz N-asetilsistein (150 mg/kg) uygulanması, atmış malonildialdehid düzeylerini önemli oranda düşürerek koruyucu etki gösterdi ( $p < 0.05$ ).

Histopatolojik çalışma sonuçları sadece travmaya maruz kalan grupta, nöronların ileri derecede koyulaştığını ve piknotik nukleusta dejenerasyon geliştiğini gösterdi. N-asetilsistein ile tedavi edilen grupta nöronların morfolojisi oldukça iyi korundu. Sadece travmaya maruz kalan grupta nöron sayısı, hem kontrol grubundan hem de travma ile birlikte N-asetilsistein tedavisi uygulanan gruptan ciddi derecede daha düşük bulundu. Sonuçlar, N-asetilsistein tedavisinin travmaya bağlı oksidatif beyin dokusu hasarından korunma için faydalı olabileceğini ortaya koydu.

**Anahtar sözcükler:** Beyin dokusu, malonildialdehid , caspase-3, kafa travması, rat, N-asetilsistein

## **THE EFFECT OF N-ACETYLCYSTEINE ON SECONDARY DAMAGE IN EXPERIMENTAL CLOSED HEAD INJURY SUMMARY**

The beneficial effect of N-acetylcysteine as a precursor of glutathione, an antioxidant, and a free radical scavenger on nervous system ischemia and ischemia/reperfusion models has been well documented. However, the effect of N-acetylcysteine on nervous system trauma remains less understood. In this study, we aimed to investigate the therapeutic efficacy of N-acetylcysteine with an experimental closed head trauma model in rats.

Thirty-six adult male Sprague–Dawley rats were randomly divided into three groups of 12 rats each: Group 1 (control), Group 2 (trauma-alone), and Group 3 (trauma+ N-acetylcysteine treatment). In Groups 2 and 3, a cranial impact was delivered to the skull from a height of 7 cm at a point just in front of the coronal suture and over the right hemisphere. Rats were sacrificed at 2 h (Subgroups 1A, 2A, and 3A) and 12 h (Subgroups 1B, 2B, and 3B) after the onset of injury. Brain tissues were removed for biochemical and histopathological investigation. The closed head trauma significantly increased tissue malondialdehyde levels ( $p < 0.05$ ) when compared with controls. The administration of a single dose of N-acetylcysteine (150 mg/kg) 15 min after the trauma has shown protective effect via decreasing significantly the elevated malondialdehyde levels ( $p < 0.05$ ).

The histopathological study revealed that in the trauma-alone group, the neurons became extensively dark and degenerated into picnotic nuclei. The morphology of neurons in the N-acetylcysteine treatment group was well protected. The number of neurons in the trauma-alone group was significantly less than that of both the control and trauma+ N-

acetylcysteine treatment groups. In conclusion, the N-acetylcysteine treatment might be beneficial in preventing trauma-induced oxidative brain tissue damage.

**Key words:** Brain tissue, malondialdehyde, caspase-3, head injury, rat, N-acetylcysteine

## KAYNAKLAR

1. Saveren M. Kafanın Travmatik Hasarları. Altınörs N, Baykaner K, Şekerci Z, Özyurt E, Caner H (Editörler). Temel Nöroşirürji I' de. Ankara. Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları; 1997. s.1-10.
2. Marshall LF. Head injury: recent past, present, and future. Neurosurgery 2000;47:546-61.
3. Özsüer H, Görgülü A, Kırış T, Çobanoğlu S. The effects of memantine on lipid peroxidation following closed-head trauma in rats. Neurosurg Rev 2005;28:143-7.
4. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. J Neurosurg 1992;77: 169-84.
5. Ikeda Y, Long DM. The Molecular basis of Brain Injury and Brain Edema: The role of oxygen free radicals. Neurosurgery 1990;27:1-11.
6. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksitleri ve organizmada peroksidan-antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. Klinik Gelişim 1988;66:423-30.
7. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. Stroke 1990;21(7): 1086-90.
8. Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrova J. Glutamate, calcium and free radicals as mediators of ischemic brain damage. Ann Thorac Surg 1995;59:1316-20.
9. Steinberg GK, George CP, DeLaPaz R, Shibata DK, Gross T. Dextromethorphan protects against cerebral injury following transient focal ischemia in rabbits. Stroke 1988;19:1112-8.

10. Gade GF, Becker DP, Miller JD, Dwan PS. Pathology and pathophysiology of head injury. In: Youmans JR (Ed.). Youman's Neurological Surgery. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1990. p.1965-017.
11. Ishige N, Pitts LH, Hashimoto T, Nishimura MC, Bartkowski HM. Effect of hypoxia on traumatic brain injury in rats. Part 1. Neurosurgery 1987;20:848-53.
12. Becker DP, Miller JD, Ward JD, Greenberg RP, Young HF, Sakalas R. The outcome from severe head injury with early diagnosis and intensive management. J Neurosurg 1977;47:491-02.
13. DeSalles AF, Kontos HA, Becker DP, Yang MS, Ward JD, Moulton R. Prognostic significance of ventricular CSF lactic acidosis in severe head injury. J Neurosurg 1986;65:615-24.
14. Muizelaar JP, Marmarou A, Ward JD, Kontos HA, Choi SC, Becker DP. Adverse effects of prolonged hyperventilation in patients with severe head injury: a randomized clinical trial. J Neurosurg 1991;75:731-9.
15. Yoshida K, Marmarou A. Effects of tromethamine and hyperventilation on brain injury in the cat. J Neurosurg 1991;74:87-96.
16. Jiang JY, Lyeth BG, Clifton GL, Jenkins LW, Hamm RJ, Hayes RL. Relationship between body and brain temperature in traumatically brain-injured rodents. J Neurosurg 1991;74:492-6.
17. Pomeranz S, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Alexander H, Stezoski W. The effect of resuscitative moderate hypothermia following epidural brain compression on cerebral damage in a canine outcome model. J Neurosurg 1993;79:241-51.
18. Tornheim PA, McLaurin RL. Acute changes in regional brain water content following experimental closed head injury. J Neurosurg 1981;55:407-13.
19. van den Brink WA, Marmarou A, Avezaat CJ. Trauma and Brain Oedema (I). Brain oedema in experimental closed head injury in the rat. Acta Neurochir 1990;51 Suppl:261-2.
20. Pollay M. Blood-brain Barrier; Cerebral edema. In: Wilkins RH, Rengachary SS (Eds): Neurosurgery. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 335-44.
21. Yoshino E, Yamaki T, Higuchi T, Horikawa Y, Hirakawa K. Acute brain edema in fatal head injury: analysis by dynamic CT scanning. J Neurosurg 1985;63:830-9.
22. Obrist WD, Langfitt TW, Jaggi JL, Cruz J, Gennarelli TA. Cerebral blood flow and metabolism in comatose patients with acute head injury: Relationship to intracranial hypertension. J Neurosurg 1984;61:241-53.
23. Nitta M, Tsutsui T, Ueda Y, Ladds A, Symon L. The effects of an extradural expanding lesion on regional intracranial pressure, blood flow, somatosensory

conduction and brain herniation: an experimental study in baboons. *Acta Neurochir* 1990;104:30-7.

24. Unterberg A, Kiening K, Schmiedek P, Lanksch W. Long-term observations of intracranial pressure after severe head injury: The phenomenon of secondary rise of intracranial pressure. *Neurosurgery* 1993;32:17-24.
25. Bouma GJ, Muizelaar JP, Bandoh K, Marmarou A. Blood pressure and intracranial pressure-volume dynamics in severe head injury: relationship with cerebral blood flow. *J Neurosurg* 1992;77:15-9.
26. Marmarou A, Holdaway R, Ward JD, Yoshida K, Choi SC, Muizelaar JP. Traumatic brain tissue acidosis: Experimental and clinical studies. *Acta Neurochir* 1993;57:160-4.
27. Bullock R, Kuroda Y, Teasdale GM, McCulloch J. Prevention of post-traumatic excitotoxic brain damage with NMDA antagonist drugs: A new strategy for the nineties. *Acta Neurochir* 1992; 55: 49-55.
28. Bullock R, Zauner A, Tsuji O, Woodward JJ, Young HF. Excitatory amino acid release after severe human head trauma: Effect of intracranial pressure and cerebral perfusion pressure changes. In: Nagai H, Kamiya K (Eds.). *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Symposium on ICP and Its Related Problems*. Berlin: Springer-Verlag; 1994. p.264-7.
29. Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986;19:105-11.
30. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1: 623-34.
31. Siesjö BK, Smith ML. The biochemical basis of ischemic brain lesions. *Arzneim-Forsch Drug Res* 1991;41(3A):288-92.
32. Bell MJ, Kochanek PM, Doughty LA, Carcillo JA, Adelson PD. Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children. *J Neurotrauma* 1997;14:451-7.
33. Rothwell NJ, Strijbos PJ. Cytokines neurodegeneration and repair. *Int J Dev Neurosci* 1995; 13: 179-85.
34. Rink A, Fung KM, Trojanowski QJ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh M. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am J Pathol* 1995;147:1575-83.
35. Huang PP, Esquenazi S, Le Roux PD. Cerebral cortical neuron apoptosis after mild excitotoxic injury in vitro: Different roles of mesencephalic and cortical astrocytes. *Neurosurgery* 1999;45:1413-22.

36. Bartus RT, Elliott PH, Hayward NL, Dean RL, Harbeson S, Straup JA, Li Z, Powers JC. Calpain as a novel target for treating acute neurological disorders. *Neurol Res* 1995;17:249-58.
37. Siman R, Noszek JC, Kegerise C. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci* 1989;9:1579-90.
38. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine II: Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 1988;63:390-08.
39. Schmidley JW. Free Radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990; 21(7):1086-90.
40. Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988;63:381-9.
41. Siesjö BK. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann Emerg Med* 1993;22:959-69.
42. Teasdale GM, Graham DI. Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury. *Neurosurgery* 1998;43(4):723-37.
43. 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.
44. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother* 1988; 42(8):513-9.
45. Moldeus P, Cotgreave IA, Berggren M. Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. *Respiration* 1986; 50 Suppl 1:31-42.
46. van Zandwijk N. N-acetylcysteine for lung cancer prevention. *Chest* 1995; 107(5):1437-41.
47. 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.
48. Holdiness MR. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet* 1991; 20(2):123-34.
49. 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.
50. Vale JA, Proudfoot AT. Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Lancet* 1995; 346(8974):547-52.

51. Shapira Y, Shohami E, Sidi S, Soffer D, Freeman S, Cotev S. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic and neurologic properties. *Crit Care Med* 1988;16:258-65.
52. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-8.
53. Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant effect of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med* 1989; 6:593-7.
54. 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.
55. Krasowska A, Konat GW. Vulnerability of brain tissue to inflammatory oxidant, hypochlorous acid. *Brain Res* 2004;997:176-84.
56. 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.
57. 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;1046:97-04.
58. 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.
59. Ferrari G, Green LA. N-acetylcysteine (D- and L- stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J Neurosci* 1995;15:2857-66.
60. 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.
61. Demir S, İnal-Erden M. Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Clin Chim Acta*. 1998;275:127-35.
62. Çakir O, Erdem K, Oruç A, Kılınç N, Eren N. Neuroprotective effect of N-acetylcysteine and hypothermia on the spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Surg* 2003;11:375-79.
63. 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.
64. Hart AM, Terenghi G, Kellerth JO, Wiberg M. Sensory neuroprotection, mitochondrial preservation, and therapeutic potential of N-acetyl-cysteine after nerve injury. *Neuroscience* 2004;125:91-01.

65. Thomas Dickey D, Muldoon L L, Kraemer DF, Neuwelt EA. Protection against cisplatin-induced ototoxicity by N-acetylcysteine in a rat model. *Hear Res* 2004;193:25-30.
66. Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabro G, Cucinotta G, De Sarro A, Caputi AP. Effects of N-acetylcysteine in a rat model of ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000;47:537-48.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Kaynar MY, Erdinçler P, Tadayyon E, Belce A, Gümüştas K, Çıplak N. Effect of nimodipine and N-acetylcysteine on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Neurosurg Rev* 1998;21:260-4.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Yi JK, Hazell ASN-acetylcysteine attenuates early induction of heme oxygenase-1 following traumatic brain injury. *Brain Res* 2005;1033:13-9.

78. Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Pauser S, Vollmann W. Characterisation of brain edema following controlled cortical impact injury. *Acta Neurochir* 1997;70:106-8.
79. Yang X, Yang S, Zhang J, Xue L, Hu Z. Role of Caspase-3 in neuronal apoptosis after acute brain injury. *Chin J Traumatol* 2002;5:250-3.
80. Lu J, Mochhala S, Shirhan M, Ng KC, Teo AL, Tan MH, Moore XL, Wong MC, Ling EA. Neuroprotection by aminoguanidine after lateral fluid-percussive brain injury in rats: a combined magnetic resonance imaging, histopathologic and functional study. *Neuropharmacology* 2003;44:253-63.
81. Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, Vink R. Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci* 2002;9:565-72.
82. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:99-04.
83. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci* 1997;17:7415-24.
84. Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL, Graham SH. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 2000;74:740-53.
85. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999;6:1028-42.

**EKLER**

## EK I



T.C  
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ETİK KURUL KARARLARI

Oturum Sayısı : 12

Karar Tarihi : 09.09.04

1-Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu 09.09.2004 tarihinde “**Deneyisel Künt Kafa Travmasında N-aseltisistein’in Sekonder Beyin Hasarı üzerine etkileri**” adlı TÜTFEK-2004/093 protokol no.lu Araş.Gör.Dr.Mehmet TİRYAKI’nın deneysel tez çalışmasını incelemek üzere toplandı. Toplantıya Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK, Yrd.Doç.Dr.Ümit N.BAŞARAN izinli olmaları nedeniyle katılamadı ve diğer üyelerin katılımıyla çalışmanın incelenmesine geçildi.

Yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Nöroşirurji, Patoloji Anabilim Dallarında yapılacağı ve sorumlusunun Yrd.Doç.Dr.Tufan HİÇDÖNMEZ 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.

Prof.Dr.Ahmet ULUGÖL  
BAŞKAN  
(Farmakolog)

Prof.Dr.Ahmet TEZEL  
Klinisyen Üye  
İle Hastalıkları Uzmanı

Yrd.Doç.Dr.Ümit N. BAŞARAN  
Klinisyen Üye  
Çocuk Cerrahisi Uzmanı  
katılmadı

Yrd. Doç. Dr. Cengiz TUĞLU  
Klinisyen Üye  
Psikiyatri Uzmanı

Yrd. Doç. Dr. Şemsi ALTANER  
Üye  
Patalog

Yrd.Doç.Dr.Sevgi ESKİOCAK  
Biyokimya Uzmanı  
Katılmadı

Ecz.İmran OĞUZ  
Üye  
Eczacı

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

Tel ( 0-284) 235 76 41 (9 Hat) Fax: ( 0-284)2357652