

Spinal kord travma modelinde aminoguanidin ile N-Asetilsistein'in ayrı ayrı ve birlikte nöroprotektif etkilerinin incelenmesi

Özkan TEHLİ (*), Nail Çağlar TEMİZ (*), Mehmet İlker ÖZER (*), Serhat PUSAT (*), Alpaslan KIRIK (*), Mehmet Kadri DANEYEMEZ(*), Halil İbrahim SEÇER (**), Engin GÖNÜL(***)

ÖZET

Çalışmada omurilik yaralanmasından sonra verilen N-Asetilsistein ve Aminoguanidin'in nöroprotektif etkinliği klinik ve laboratuvar olarak incelenmiştir. Ratlar; kontrol grubu, travma grubu, Aminoguanidin grubu, N-Asetilsistein grubu, Aminoguanidin+N-Asetilsistein grubu olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Tüm ratlara Torakal 9 veya Torakal10 lamineasına total laminektomi yapıldı. Kontrol grubu dışındaki gruplara ağırlık düşürme modeli ile spinal travma oluşturuldu. Travma grubuna; günde 2 kez 1mL %0.9'luk NaCl çözeltisi, Aminoguanidin grubuna; günde 2 kez 100 mg/kg, N-Asetilsistein grubuna; günde 2 kez 100 mg/kg 5 gün boyunca uygulandı. Aminoguanidin+N-Asetilsistein grubuna; her iki ilaç aynı pozolojide 5 gün boyunca uygulandı. Tüm ratlar 1. 3. ve 5.gün Tarlov'un tanımladığı nörolojik muayene derecelendirmesi ile Rivlin ve Tator'un tanımladığı eğik düzlem dereceleri ile klinik olarak değerlendirildi. Ratlardan 6. günde travma bölgesini içeren omurilik alındı. Dokulardan malondialdehit düzeyi, superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz aktivitesi bakıldı. Bulguların analizi SPSS 15.0 programıyla yapılmış kontrol grubuna göre Aminoguanidin, N-Asetilsistein, Aminoguanidin+N-Asetilsistein gruplarında klinik nörolojik muayene ve eğik düzlem derecelendirmesinde artış ile malondialdehit düzeyi, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinde istatistiksel anlamlı düşme görüldü. Sonuç olarak Aminoguanidin ve N-Asetilsistein ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkinliği olduğu fakat birlikte kullanıldıklarında additif etkinlik göstermedikleri söylenebilir

Anahtar Kelimeler: N-Asetilsistein, Aminoguanidin, Spinal kord travması

SUMMARY

The Investigation of Neuroprotective Effects of Aminoguanidin and N-Acetylcystein administration alone and combination in Spinal Cord Trauma model

In this study the neuroprotective efficacy of N-Acetylcystein and Aminoguanidin administered after spinal cord injury was examined regarding clinical and laboratory outcome. Rats were divided into 5 groups: Control group, trauma group, Aminoguanidin group, N-Acetylcystein group, and Aminoguanidin+N-Acetylcystein group. Total laminectomy of thoracal 9th or 10th vertebrae was performed on all rats. Spinal trauma was formed by weight drop model for all groups except the control group. 1 ml of 0.9% NaCl solution was administered twice daily to control group. 100 mg/kg Aminoguanidin and N-Acetylcystein was given twice daily for 5 days to own group. Both drugs were administered to Aminoguanidin+N-Acetylcystein group in the same dose. Neurological examination results were graded according to Tarlov's chart and all the rats were clinically assessed by Rivlin and Tator's inclined plane degrees. Traumatized spinal cord segments were obtained. Malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase activity of these tissue specimens were measured. Results revealed an increase in the inclined plane degrees and neurological examination grading along with statistically significant decrease in Malondialdehyde level, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in Aminoguanidin, N-Acetylcystein and Aminoguanidin+N-Acetylcystein groups as compared to control group. We propose, Aminoguanidin and N-Acetylcystein can show neuroprotection when used in combination or alone but there is no additive effect of combined use.

Key words: Aminoguanidin, N-Acetylcystein, Spinal cord trauma

Giriş

Omurilik yaralanmaları nöroşirürji pratiğinde sık görülen ve her zaman önemini koruyan bir konudur. Travmatik medulla spinalis yaralanmalarının en yaygın nedenleri sıklık sırasına göre; motorlu araç kazaları (yaklaşık % 50), düşmeler, ateşli silah yaralanmaları veya kesici-delici aletlerle oluşmuş penetran yaralanmalar ve spor kazalarıdır.

En sık servikal bölge ve dorsolomber bileşke bölgesindeki spinal kord etkilenmektedir (1-4). Ülkemizde yılda ortalama 1600-2000 akut spinal kord yaralanması olgusu bildirilmektedir (5) Olguların % 64-80'i erkektir ve % 61'i 16-30 yaşları arasındadır. Olguların yaklaşık yarısı nörolojik açıdan komplet hasara sahiptir. Komplet hasarın %54'u kuadripleji ve %46'sı parapleji şeklindedir. Bu olguların hastanede kalış süreleri ve rehabilitasyonları uzun süreli ve tekrarlayıcıdır. Tedavi sonrası hayat kalitesi, sosyal ve ekonomik hayata dönüş ise düşüktür (4,6). Bu hastaların yaşam boyu süren tedavi ve bakım masrafları, işgücü ve gelir kayıpları ile yaşadıkları sosyal ve psikolojik problemler göz önüne alındığında hastayı, ailesini ve ülke ekonomisini etkileyen ciddi bir sağlık problemi oluşturduğu açıktır (7). Hastaların % 61'inin 16-30 yaşlar arasında olması, sorunun ciddiyetini daha da arttırmaktadır (4).

Travmanın şiddeti ve oluş şekline bağlı olarak ortaya çıkan omurilik yaralanmasına birincil yaralanma denir. Birincil yaralanmadan sonraki saatler ve günler içerisinde bir dizi fizyopatolojik sürece bağlı olarak gelişen medulla spinalis yaralanmasına ise ikincil yaralanma denir (8). Yaralanmadan sonra başlayan bu ikincil hasar döneminin durdurulması ya da yavaşlatılması klinik tedavinin asıl amacıdır (9). Omurilik yaralanmaları üzerine yapılan birçok araştırmalar olmasına rağmen ne yazık ki halen kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve aynı zamanda evrensel bir tedavi protokolü geliştirilebilmiş değildir (10,11,4).

Bu çalışmada ratlarda ağırlık düşürme modeli ile oluşturulan omurilik yaralanmasından sonra verilen N-Asetilsistein (NAS) ve Aminoguanidin (AG)'in nöroprotektif etkinliği klinik ve laboratuvar olarak ayrı ayrı ve birlikte araştırılmıştır.

Gereç-Yöntem

Çalışmamızda Etik Kurulu Onayı ile 35 adet erişkin 200-320 gram ağırlığında Sprague-Dawley türü ratlar kullanılmıştır. İlaç dozları NASCIS 2 ve NASCIS 3 çalışmalarına göre belirlenmiştir (23). Bu ratlar rastgele seçilerek 5 gruba ayrılmış olup her grupta 7 adet rat kullanılmıştır:

I. Grup (Sham operated kontrol grubu):

Bu gruptaki ratlara mikroskop altında tek seviye total lami-

* Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Beyin ve Sinir Cerrahisi AD

** Akay Hastanesi ANKARA

*** TOBB Hastanesi ANKARA

Ayrı basım isteği: Mehmet İlker ÖZER
Mustafa Kemal Mahallesi Barış Sitesi 2103 Sokak No:7
Çankaya / ANKARA
4077.gatt@gmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 02.04.2015 • Kabul Tarihi: 03.06.2015 • Çevrim içi Basım Tarihi: 30 Haziran 2015

nektomi (torakal 9 veya 10) yapıldıktan sonra travma oluşturulmadan katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı.

II. Grup (travma grubu):

Bu gruptaki ratlara I. grupta tarif edildiği şekilde laminektomi yapıldıktan sonra ağırlık düşürme tekniği ile 50 g-cm.lik spinal kord travması oluşturuldu. Daha sonra katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı ve 1 mL %0.9 luk NaCl çözeltisi 5 gün boyunca günde 2 kez intraperitoneal olarak verildi.

III. Grup (tedavi grubu; AG) :

Bu gruptaki ratlara II. grupta tarif edildiği şekilde spinal kord travması oluşturuldu. Daha sonra intra peritoneal olarak travma sonrası 1. saatte başlanarak günde 2 kez (Sigma, 100 mg/kg 1 ml salin çözeltisinde) olmak üzere aminoguanidin 5 gün boyunca uygulandı.

IV. Grup (tedavi grubu;NAS):

Bu gruptaki ratlara II. grupta tarif edildiği şekilde spinal kord travması oluşturuldu. Daha sonra intra peritoneal olarak travma sonrası 1. saatte başlanarak günde 2 kez (Sigma, 100 mg/kg 1 ml salin çözeltisinde) olmak üzere NAS 5 gün boyunca uygulandı.

V. Grup (tedavi grubu; AG+NAS):

Bu gruptaki ratlara II. grupta tarif edildiği şekilde spinal kord travması oluşturuldu. Daha sonra intra peritoneal olarak travma sonrası 1. saatte başlanarak günde 2 kez grup III ve IV ile aynı pozolojiden olmak üzere AG+NAS 5 gün boyunca uygulandı.

Ravlon ve Tator'un çalışmalarında olduğu gibi ratlar 6. günde (travmadan 5 gün sonra) yüksek doz anestezi ile sakrifiye edildi (7,13). T9 veya T10'a yapılan total laminektomi bir alt ve üst seviyeyi içerecek şekilde genişletildi ve yaklaşık 1cm'lik travmatik alanı da içerecek şekilde örnekler alındı. Alınan örneklerden doku Malondialdehit (MDA) düzeyi, doku superoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ve doku glutatyon peroksidad (SeGSH-Px) aktivitesi ölçüldü. Analizler 30 gün içinde tamamlandı.

Ratların klinik motor muayeneleri subjektif ve objektif olarak 24.saatte, 3. ve 5. günlerde değerlendirildi. Klinik Motor Muayene Skorlaması subjektif olarak Tarlov (12) tarafından tanımlanan şekilde değerlendirildi.(Tablo I) Objektif değerlendirme, Rivlin ve Tator (13) tarafından tanımlandığı şekilde yapıldı. Hayvan eğik bir düzlem üzerine yatay olarak yerleştirilerek, bu eğik düzlemin yatay düzlemle olan açısı gittikçe artırılarak hayvanın 5 sn boyunca düşmede durabildiği en yüksek derece, o hayvanın eğik düzlem derecesi olarak saptandı.

Tablo I. Klinik Motor Muayene Skorlaması

1. Hareket yok.
2. Arka bacaklarında minimal istemli hareket var, arka ayakları üzerinde duramıyor.
3. Ayakta durabiliyor, ancak yürüyemiyor.
4. Yürüyebiliyor, ancak arka bacaklarında bir miktar spastisite ve inkoordinasyon var.
5. Normal motor hareket.

Elde edilen veriler SPSS 15.0 istatistik paket programıyla analiz edilmiştir.

Verilerin analizinde çoklu gruplararası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. İstatistik olarak anlamlı çıkan sonuçların gruplar arası ikili karşılaştırmalarında Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çoklu grup içi karşılaştırmalarda Friedman testi kullanılmıştır. İstatistik olarak anlamlı çıkan sonuçların grup içi ikili karşılaştırmalarında Bonferoni düzeltmeli Wilcoxon testi kullanılmıştır. $P<0,05$ düzeyi istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir. Değişkenlerin tanımlanmasında ortalama standart sapma, ortanca, sayı ve yüzde kullanılmıştır. $P<0,05$ düzeyi istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Klinik Nörolojik Muayene Bulguları:

Peroperatif dönemde hiçbir rat ölmedi ve travma sonrası paraplejik olmayan rat gözlenmedi. 24. saatte, 3. günde ve 5. günde elde edilen muayene skorları tablo I ve grafik 1'de gösterilmiştir..Sonuç olarak gruplar arasında nörolojik muayene skorlarına bakıldığında 1.,3. ve 5. günler arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur.($P<0.001$)

Farkın kaynağını bulmak için yapılan ikili karşılaştırmalarda Grup 2 (travma grubu) ile grup 3 (AG uygulanan grup) arasında nörolojik muayene bulguları yönünden 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün $P=1$, 3.gün $P=1$) 5. günde ise anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.001$).

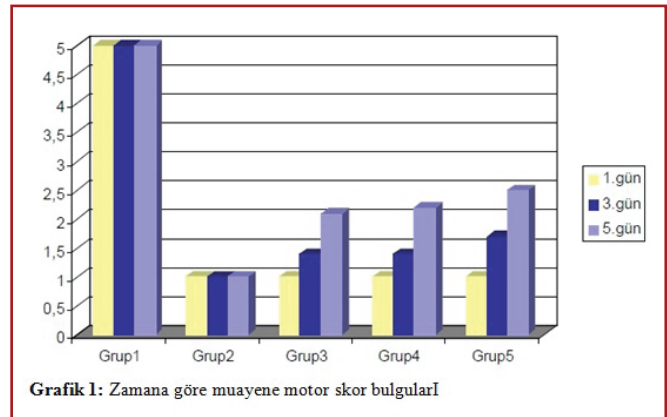
Grup 2 ile grup 4 (NAS uygulanan grup) arasında nörolojik muayene bulguları yönünden, 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün $P=1$, 3.gün $P=1$) 5.günde ise anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.01$).

Grup 2 ile grup 5 (AG+NAS uygulanan grup) arasında nörolojik muayene bulguları yönünden 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün $P=1$, 3.gün $P=0.07$) 5. günde ise anlamlı fark bulunmuştur ($P<0.01$).

Grup 3, grup 4 ve grup 5 arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır($p=1$)

Her bir grubun 1., 3. ve 5. gün arası muayene skorlarına bakıldığında ; Grup 1 (kontrol grubu) ve grup 2 de istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla $p=1$, $p=1$).

Grup 3, grup 4 ve grup 5 de istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur.(sırasıyla $p=0.001$, $p=0.01$, $p=0.01$). Grup 3 de 1. ve 3. gün, 3. ve 5. gün arasında fark yokken ($p=0.24$, $p=0.075$), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuş-

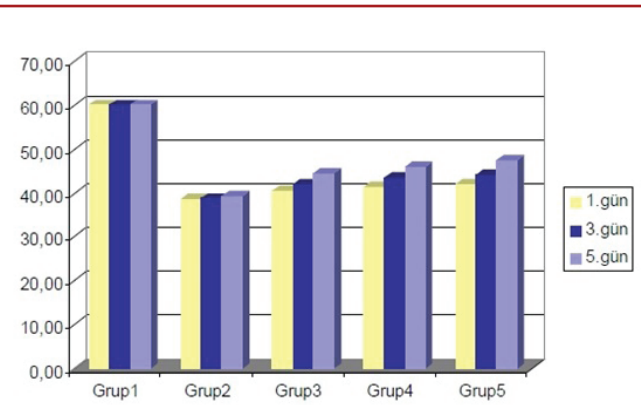


tur (p=0.033). Grup 4 de 1. ve 3. gün, 3. ve 5.gün arasında fark yokken (p=0.081, p=0.051), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.042). Grup 5 de 1. ve 3. gün, 3. ve 5. gün arasında fark yokken (p=0.081, p=0.051), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.045).

Gruplardaki 1. 3.ve 5. günlerdeki eğik düzlem dereceleri tablo II ve grafik 2'de gösterilmiştir.

Tablo II. Zamana göre motor muayene skor bulguları

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
1.gün	5±0	1±0	1±0	1±0	1±0
2.gün	5±0	1±0	1.4±0.5	1.4±0.5	1.7±0.4
3.gün	5±0	1±0	2.1±0.3	2.2±0.4	2.5±0.5



Grafik 2: Eğik düzlem bulguları

Gruplar arasında nörolojik eğik düzlem skorlarına bakıldığında 1. 3. ve 5. günler arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (P<0.001). Farkın kaynağını bulmak için yapılan ikili karşılaştırmalarda; Grup 2 ile grup 3 arasında nörolojik eğik düzlem skorları bulguları yönünden 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün P=0.22, 3.gün P=0.06). 1. ve 5.günde ise anlamlı fark bulunmuştur (P=0.03). Grup 2 ile grup 4 arasında nörolojik eğik düzlem skorları bulguları yönünden 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün P=0.16, 3.gün P=0.06). 1. ve 5.günde ise anlamlı fark bulunmuştur (P=0.02).

Grup 2 ile grup 5 arasında nörolojik eğik düzlem skorlarına bulguları yönünden 1. ve 3. günde istatistik olarak anlamlı fark bulunmazken (1.gün P=0.08, 3.gün P=0.07). 1. ve 5.günde ise anlamlı fark bulunmuştur (P=0.02). Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistik olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=1).

Her bir grubun 1. 3. ve 5. gün arası eğik düzlem skorlarına bakıldığında; Grup 1 ve grup 2 de istatistik olarak anlamlı fark bulunamamıştır (sırasıyla p=1, p=0.165). Grup 3, grup 4 ve grup 5 de istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p=0.001, p=0.01, p=0.01). Grup 3 de 1. ve 3. gün, 3.ve 5. gün arasında fark yokken (p=0.18, p=0.054), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.048). Grup 4 de 1. ve 3. gün, 3. ve 5. gün arasında fark yokken (p=0.081,

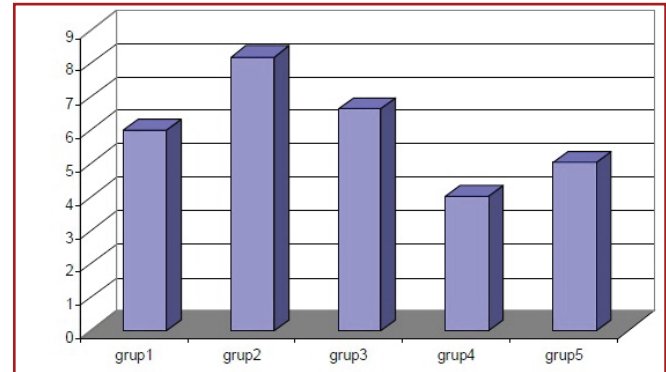
Tablo III. Eğik düzlem bulguları

	Grup I (ort+ss)	Grup II	Grup III	Grup IV	Grup V
1.gün	60.1±1.5	38.7±1.3	40.5±1.1	41.5±1.1	42.1±1.5
3.gün	60.1±1.5	38.8±1.0	42.1±1.9	43.5±2.2	44.1±2.4
5.gün	60.1±1.5	39.2±1.7	44.4±2.0	46±2.3	47.4±2.6

p=0.051), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.048). Grup 5 de 1. ve 3. gün, 3. ve 5. gün arasında fark yokken (p=0.081, p=0.051), 1. ve 5. gün arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.042).

MDA Değerleri :

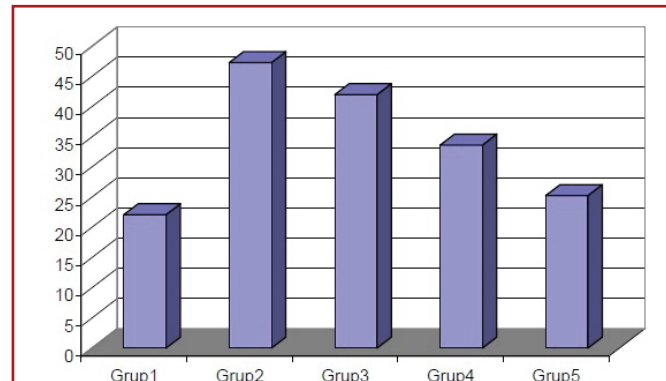
6. günde ölçülen MDA değerleri grup1 de 6.00+/-1.20, grup 2'de 8.19 +/-1.85, grup3 de 6.63+/- 0.27, grup4 te 4.01+/- 2.06, grup5 te 5.03+/-0.43 olarak bulunmuştur. (Grafik 3). Sonuç olarak, Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.025). Grup 2 ile grup 3 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.035). Grup 2 ile grup 4 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.006). Grup 2 ile grup 5 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.002).



Grafik 3: MDA düzeyleri

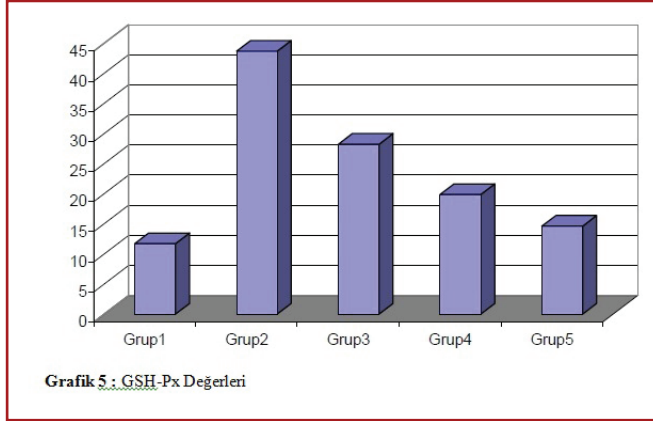
SOD Değerleri :

6. günde ölçülen SOD değerleri grup 1 de 22.08+/-10.18, grup 2'de 47.27+/-6.10, grup 3 de 41.95+/-13.21, grup 4'te 33.62+/-12.68, grup 5'te 25.23+/-12.83 olarak bulunmuştur. (Grafik 4)



Grafik 4 : SOD değerleri

Sonuç olarak, Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.048$). Grup 2 ile grup 3 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.035$). Grup 2 ile grup 4 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.009$). Grup 2 ile grup 5 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.002$).



GSH-Px Değerleri :

6. günde ölçülen GSH-Px değerleri grup1 de 11.70 ± 1.81 grup 2'de 43.68 ± 6.37 , grup 3 de 28.22 ± 2.06 , grup 4 te 19.87 ± 1.71 , grup 5 te 14.61 ± 1.87 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, Grup 1 ve Grup 2 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.002$). Grup 2 ile grup 3 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.002$). Grup 2 ile grup 4 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.002$). Grup 2 ile grup 5 arasında istatistik olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.001$).

Tartışma

Akut omurilik yaralanması; toplumda görülme sıklığının yüksekliği, fiziksel, psikososyal ve ekonomik açıdan oluşturduğu hasarın büyüklüğü ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün olmaması nedeniyle günümüzde önemini sürdürmektedir. Bununla birlikte özellikle travma sonrası oluşan nöral hasarın azaltılması ve motor fonksiyonların korunmasına yönelik moleküler ve hücresel düzeyde laboratuvar ve klinik çalışmalar devam etmektedir (14).

Geliştirilmeye çalışılan etkin farmakolojik tedavi yöntemleri travma sonrası gelişen süreçlerin patofizyolojisinin iyi anlaşılması gerekliliğini açıkça ortaya koymaktadır. Yaralanma sonrasında ilk birkaç gün içinde omurilikte oluşan lezyonun patolojik görüntüsündeki dramatik değişiklikler klinik ve deneysel gözlemlerin en önemli noktasını oluştururlar (15).

İlk olarak 1911 yılında Allen, köpeklerde oluşturduğu kontüzyon tipi omurilik hasarı sonrası uygulanan myelotomi ve posttravmatik hematomyelinin kaldırılmasının, nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını göstermesi daha önce bu konu ile ilgili yapılan deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasını sağlamış ve aynı zamanda ikincil hasar konseptininde öncülüğünü yapmıştır. (7,16,17). Spinal kord travması sonrası oluşan birincil yaralanmalar doku bütünlüğünün bozulmasına, aksonların haraplanmasına, kan damarlarının yaralanmasına, ödeme ve hücre membranının parçalanmasına neden olur.

Birincil yaralanmadan sonraki saatler ve günler içerisinde gelişen ikincil yaralanma ise iskemi, iyon geçisi, serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyonu gibi bir dizi fizyopatolojik süreci içermektedir. (18-20). Serbest radikaller dış yörüngelerinde fazladan (çiftlenmemiş) bir elektron bulunduran kuvvetli reaktif moleküllerdir. Bu elektron başka biyolojik moleküllere kolayca aktararak oksidasyona yol açar. Serbest radikaller normal koşullarda mitokondride oluşurlar. Normalde antioksidan sistemler ile serbest radikallerin zararlı etkileri engellenir (20). Ancak travma sonrası dokularda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır. Oluşan serbest radikaller, lipidler, proteinler, nükleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitler oluştururlar ve bunun sonucunda da daha fazla serbest radikal oluşumu olur (19). Ayrıca serbest oksijen radikallerinin yaptığı endotel hasarına bağlı olarak kan-omurilik bariyeri bozulur. Bunun sonucunda yaralanma bölgesine zararlı maddelerin birikimi olur. SSS'de SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin az olduğundan SSS serbest radikal hasarına yatkındır (20). 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 (19,20).

Merkez sinir sistemi (MSS) askorbat, glutatyon ve alfa-tokoferol gibi antioksidan mekanizmalara yüksek oranda sahiptir. Travma sonrası dokuda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır ve oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler, nükleik asitler ile reaksiyona girerek doku hasarına neden olur (21). Serbest radikal tutucular pek çok omurilik yaralanması modelinde denenmiştir. Ancak bunlardan sadece sentetik steroid metilprednizolonun klinik uygulamaya geçebilmiştir. Ancak şu da belirtilmelidir ki, pek çok araştırmacı tarafından metilprednizolon kullanımını tartışmaktadır (22,23). Deneysel çalışmalar diğer antioksidanlarında ümit verici olduklarını göstermektedir. Siklosporin-A (24), EPC-K1 (25), vitamin E ve selenyum (26) serbest radikal tutucu özellikleri nedeniyle omurilik yaralanmasında etkin bulunmuştur. Kaptanoğlu ve ark. melatonin, meksiletin, eritropoetin, difenilhidantoin, tiopental ve propofolun omurilik yaralanması sonrası lipid peroksidasyonunu önlediği, ultrastrüktürel ve klinik koruma yaptığını göstermişlerdir (27-30). GSH öncülü olan ve özellikle OH ve H₂O₂ gibi serbest radikalleri temizleyerek güçlü bir antioksidan olan NAS'ın beyin iskemi reperfüzyon modellerinde yararlı etkisi iyi bir şekilde doküman edilmiştir. Etüş ve arkadaşları da NAS'ın deneysel olarak oluşturulmuş infantil hidrosefali ratlarda, serebral lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir (31). Hiçdönmez ve arkadaşları 2006'da yaptıkları çalışmada; kapalı kafa travma modelinde NAS'ın tek doz uygulamasının travmanın hızlandırdığı oksidatif beyin doku hasarını önlemekte etkili olabileceğini bildirmişlerdir (32). Bizim çalışmamızda, NAS'ın nöroprotektif etkilerinin araştırılması amacıyla NAS ağırlık düşürme modeli ile oluşturulan spinal travma sonrasında Grup IV' e günde 2 kez 100 mg/kg intraperitoneal olarak 5 gün boyunca uygulandı. Etkinin değerlendirilebilmesi amacıyla; postoperatif 6. gün omurilik örnekleri alındı biyokimyasal parametre olarak omurilik MDA düzeyleri ile omurilik CuZn-SOD ve SeGSH-Px aktivitesi, klinik iyileşmenin değerlendirilebilmesi için eğik düzlem testi ve motor fonksiyon skorlarına bakıldı. Literatürde Barut ve ark.'nın yaptıkları spinal kord travması sonrası lipid

peroksidasyon ölçüm çalışmasında, MDA düzeylerine erken dönemde (travmadan 1dk. , 15 dk. , 1,2 ve 4 saat sonra) bakarak MDA düzeyinin 15 dk. sonra artmaya başladığını, 1. saatte maksimuma ulaştığını ve daha sonra düşüş gösterdiğini göstermişlerdir (33). Travma sonrası NAS uygulamanın MDA düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü kontrol düzeyinde altında bir değere indirdiği saptanmıştır. Kaynar ve arkadaşları; omurilikte oluşturulan travmadan 1 saat sonra nimodipin ve NAS'ın etkinliğini doku lipid peroksidasyon düzeyini ölçerek değerlendirmişlerdir. Ölçülen MDA sonuçlarına göre tek doz uygulanan NAS'ın deneysel omurilik travmalarında lipid membranlarındaki peroksidasyona etkisinin olmadığını göstermişlerdir (34). Bizim çalışmamızda ise Kaynar ve arkadaşlarından (34) farklı bir doz ve pozoloji uygulandı ve bunun MDA düzeylerini düşürdüğünü gördük. Sonuç olarak NAS'ın ilk kez spinal travma modelinde lipid peroksidasyonu azalttığını gördük ve bu yolla da nöroprotektif etki gösterebildiğini değerlendirdik.

Biyokimyasal değerlendirme parametrelerinden diğeri; çalışma sonunda tüm grupların spinal kordlarında CuZn-SOD ve SeGSH-Px aktivitesinin ölçümüydü. SOD enzimi, superoksit detoksifikasyonunda anahtar bir enzimdir ve O₂·⁻yi H₂O₂'e dönüştürür. Bu detoksifikasyon iki ucu keskin kılıç gibidir (35). Bir taraftan O₂·⁻i yıkarak detoksifiye etmekte öbür taraftan yine güçlü oksidan olan H₂O₂ üretmektedir. H₂O₂ 'de katalaz ve GSH-Px enzimi tarafından detoksifiye edilir. Travma sonrasında SOD düzeyleri travmaya cevap olarak yükselmektedir (35). Çalışmamızda travma sonrası 6. günde CuZn- SOD ve SeGSH-Px enzim aktivitesinin düzeyinin literatürle uyumlu olarak istatistik olarak anlamlı yüksek olduğu saptandı. NAS uygulanan grupta ise CuZn- SOD ve SeGSH-Px enzim aktivitesinin istatistik olarak anlamlı düşük düzeylerde olduğunu gördük. Enzim aktivitelerindeki bu düşmenin güçlü bir antioksidan olan NAS'ın bu etkiyi ortamdaki serbest radikalleri temizlemesinden kaynaklandığını düşündük.

İkincil hasarın ilerlemesinde önemli diğer bir mekanizma travma sonrası meydana gelen oksijen türevi olmayan serbest radikallerin başında gelen nitrik oksit sentezinin artmasıdır. NO, birçok fizyolojik fonksiyonunun yanı sıra patolojik durumlarda yüksek miktarlarda üretimi sonucu nörotoksik hale dönüşür ve bir serbest radikal olarak ikincil hasarın ilerlemesinde önemli rol oynar (36-38). NO sentezinde işlev gören 3 enzimden biri olan uNOS, sağlıklı dokularda bulunmazken, patolojik süreçlerde inflamatuvar mediatorler ve sitokinler tarafından uyarılarak aşırı nitrik oksit oluşumuna neden olur. Bu ise peroksinitrit oluşumu, protein hasarı, lipid peroksidasyonunda artış, hücresel enerji kaybı, mitokondrial solunumun durması ve DNA replikasyon inhibisyonu ile hücre ölümüne neden olur (36). Suzuki ve ark. (39) yaptıkları kompresyon tipi deneysel spinal kord travması çalışmasında, erken dönemde uNOS inhibisyonunun kronik fazda daha iyi fonksiyonel iyileşme sağladığını göstermişlerdir (39). NO, spinal kord hasarına cevap olarak artış göstermekte ve uNOS'ın farklı kaynaklardan oluşumuna bağlı olarak değişik zamanlarda yükselme gösterebilmektedir. Iadekola ve ark. serebral iskemi çalışmasında uNOS aktivitesindeki artışın travmadan 12 saat sonra başladığını, 96. saatte pik yaptığını ve 7. günde düştüğünü göstermişlerdir (39). Agrawal ve ark. ise travmatik beyin hasarı sonrası uNOS aktivitesinin 1. gün sonunda ortaya çıktığını, 7. günde maksimuma ulaştığını ve 14. Güne kadar aktivitesini sürdürdüğünü

göstermişlerdir. (40). Soy ve arkadaşları ilk kez spinal travma modelinde travmadan hemen sonra başlanıp 3 gün boyunca 2 kez 100mg/kg dozunda verilen AG'nin omurilikteki NO üretimini azaltarak lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermişlerdir (41). Bizim çalışmamızda da; spinal travma sonrası AG uygulamanın MDA düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü görüldü. Sonuçta; AG uygulaması, NO düzeyini özellikle uNOS inhibisyonuna bağlı olarak düşürerek NO'nun neden olduğu ikincil hasarın patolojilerinden spinal kord koruduğu ve böylece akut medulla spinalis yaralanmasında faydalı olabileceği saptandı. Çalışmamızda eğik düzlem derecelerinin değerlendirilmesinde travmanın bu değerleri düşürdüğü görüldü. İlk gün yapılan testlerde grup II, grup III, grup IV ve Grup V arasında anlamlı fark bulunamaması tüm gruplara eşit travma uygulandığının kanıtı olarak kabul edildi. Bu ise deneysel çalışmaların değerlendirilmesinde önemli bir kriter olan, başlangıç travma miktarının eşit olması gerekliliğine uygundu.

Spinal travma sonrası AG, NAS ve kombine kullanımının motor skorları ve eğik düzlem derecelerini anlamlı olarak yükselttiği ve bunun 5. günden itibaren istatistik olarak anlamlı boyuta ulaştığı görüldü. Deneysel omurilik yaralanmasında bugüne kadar AG ve NAS'ın ikisinin bir arada kullanıldığı bir çalışmaya literatürde rastlamadık. Birçok çalışmada uNOS inhibisyonu ile oksijen türevi olmayan bir serbest radikal olan NO düzeylerini düşürerek lipid peroksidasyonu önlediği bildirilen AG'nin ve güçlü bir oksijen türevi serbest radikal temizleyicisi olan NAS kombine kullanımının etkisini incelemek asıl amacımızdı. Kombine kullanımları doku MDA düzeylerini ve CuZn-SOD ve SeGSH-Px enzim aktivitesini düşürerek, objektif ve klinik iyileşme sağlayarak nöroprotektif etkinliğini gösterdik ancak bu etkinlik ayrı ayrı kullanıldıklarındaki etkinlikleri ile karşılaştırıldıklarında istatistik olarak anlamlı değildi ve additif etki göstermediler. Bu durum farklı serbest radikallere etkili maddeler olmaları ile açıklanabilir.

Sonuç:

Ağrılık düşürme ile oluşturulan spinal kord yaralanmaları biyokimyasal ve nörolojik muayene yöntemleri (Eğik düzlem ve Motor muayene) ile incelendi. Oksijen türevi serbest radikallere karşı kullanılan NAS ve oksijen türevi olmayan serbest radikallerin başında gelen NO'ya karşı kullanılan AG' nin ayrı ayrı ve birlikte nöroprotektif etkinliği araştırıldı.

Travmadan 1 saat sonra başlanan ve günde 2 doz (200 mg/kg) verilen NAS'ın ve AG'nin gerek MDA, SOD ve GPX değerlerini düşürdüğü gerekse nörolojik muayenelerinde anlamlı düzelme yaptığını tesbit edildi. AG ve NAS birlikte kullanımının MDA, SOD ve GPX değerlerini düşürerek ve nörolojik muayene-nede anlamlı düzelme yaptığı, AG ve NAS'ın birlikte kullanımının additif etki oluşturmadığı ve bu 3 grup arasında tedavi etkinliği olarak anlamlı bir fark olmadığı gösterildi.

Sonuç olarak; AG ve NAS ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkinliği olduğu fakat birlikte kullanıldıklarında additif etkinlik göstermedikleri söylenebilir.

Teşekkürler:

Bu çalışmada Spinal kord travma modelinde aminoguanidin ve nasetilsistein'in ayrı ayrı ve birlikte nöroprotektif etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde ilgi ve des-

teğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Engin GÖNÜL'e, çalışmalarındaki eşsiz katkılarından dolayı Doç. Dr. H. İbrahim SEÇER' e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince desteklerini esirgemeyen Eczacılık Bilimleri Merkezinden Doç. Dr. Ecz. Ahmet Aydın'a, Fizyoloji AD' dan Doç. Dr. Turgut TOPAL' a, Mikrocerrahi ve Araştırma Mrk. Görevlisi Dr. Vet. Hekim Elvin AKDAĞ ile Svl. Memur Murat KALEMCI' ye teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

1. Aguayo AJ: Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Advances in Cellular Neurobiology* 3, New York: Academic Pres: 215-234, 1982.
2. De La Torre JC: Spinal cord injury: review of basic and applied research. *Spine* 6: 315-335, 1981.
3. Demediuk P, Saunders RD, Clendenon NR, Means ED, Anderson DK, Horrocks LA: Changes in lipid metabolism in traumatized spinal cord. *Progg Brain Res* 63: 211-226, 1985.
4. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spina cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319-370, 1996.
5. Karamehmetoglu SS, Unal S, Karacan I, ve ark. :Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An epidemiological study. *Paraplegia* 33(8):469-71, 1995.
6. Sonntag VKH: History of degenerative and traumatic disease of the spine. In a history neurosurgery. Greenblatt SH (ed). *American association of Neurological Surgeons*, Washington, pp 355-371, 2.193, 1997.
7. Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 37: 291-302, 1991.
8. Popp AJ, Feustel P, Kimelberg HK in. Wilkins RH, Rengachary (ed). *Neurosurgery*. McGraw Hill, pp 2623-2637, 1996.
9. Ducker TB, Kindt GW, Kempe LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg* 35: 700-708, 1971.
10. Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian R: Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention *Current Opinion in Neurology*; 15: 713-720, 2002.
11. Fehlings MG: Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine* 26:S55, 2001.
12. Taoka Y, Okajima K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobio*156:341- 358, 1998.
13. Rivlin AS, Tator CH: Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. *J Neurosurg* 49: 844-853, 1978.
14. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacology*; 24(5):265-279, 2001.
15. Tator CH in. Wilkins RH, Rengachary SS (ed): *Neurosurgery*. McGraw- Hill, 2 nd edition; pp2847-2859, 1996.
16. Allen AR: Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study. *J Nerv Dis*; 41:141-147, 1914.
17. Amar AP, Levy ML: Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 44 (5)1027-1040, 1999.
18. Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF: Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36 : 683-690, 1998.
19. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P: Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 25: 1859-1866, 2000.
20. Popp AJ, Feustel P, Kimelberg HK in. Wilkins RH, Rengachary (ed). *Neurosurgery*. McGrawHill, pp 2623-2637, 1996.
21. Yamanaka, K., Kumura, E., Iwatsuki, K., et al :Increase in plasma nitric oxide end-products following rat cortical injury, *Neurosci. Lett.*, 194, s124-126, 1995.
22. Hurlbert RJ. Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standart of care. *J Neurosurg* (supp1):1993.
23. Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *J Trauma* 45:1088-1093, 1998
24. Craig CG, Tropepe V, Morshead CM, Reynolds BA, Weiss S, van der Kooy D.: In vivo growth factor expansion of endogenous subependymal neural precursor cell populations in the adult mouse brain. *J Neurosci* 16(8):2649-58, 1996
25. Freeman BA, Crapo JD: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*;47:412-426, 1982.
26. Anderson DK, Means ED. Iron induced lipid peroxidation in spinal cord: protection with mannitol and methylprednisolone. *J Free Radic Biol Med* 1:59-64, 1985.
27. Kaptanoğlu E, Caner H, Solaroglu I, Kilinc K: Mexiletine treatmentinduced inhibition of caspase-3 activation and improvement of behavioral recovery after spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 3:53-56, 2005.
28. Kaptanoğlu E, Beskonaklı E, Okutan O, Surucu S, Taskin Y: Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. *J Clin Neurosci* 10 (3):329-34, 2003.
29. Kaptanoğlu E, Beskonaklı E, Solaroğlu I, Kılinc A, Taskin Y: Magnesium sulphate treatment in experimental spinal cord injury: Emphasis on vascular changes and early clinical results. *Neurosurg Rev* 26:283-287, 2003.
30. Kaptanoğlu E, Tuncel M, Palaoğlu S, Konan A, Demirence E, Kılinc K: Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* (Spine 1) 93:77- 84, 2000.
31. Etus, V., Gazioğlu, N., Belce, A., n-acetylcystein reduces cerebral lipid peroxidation in a rat model of infantile hydrocephalus *J Neurolog Sci* 18,1,2001.

32. Hicdonmez, T., Kanter, M., Tiryaki, M., Parsak, T., Cobanoglu, S., Neuroprotective Effects of N-acetylcysteine on Experimental Closed Head Trauma in Rats, *Neurochem Res*, Volume 31, Number 4, pp. 473-481(9), April 2006.
33. Barut S, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, Cokneseli B, Kaya U: Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurgery Rev.* 16:53-59, 1993.
34. Kaynar, M., Y , Erdinçler P., Tadayyon E., Belce A., Giimustas K., and Ciplak, N., Effect of nimodipine and N-acetylcysteine on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury, *Neurosurg. Rev.*;21(4):260-264, 1998.
35. Halliwell, B.: Reactive species in living systems:Source Biochemistry, and role in human disease. *The Am J Med*, 91(3C): syf:14-22,1991.
36. Chabrier PE, Pallardy CD, Auget M: Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *CMLS*; 55:1029-1035, 1999.
37. Diaz –Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Rios C: Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neurosci Lett*; 319:129-132, 2002.
38. Wu W, Liuzzi FJ, Schinco FP, Depto AS, Li Y, Mong JA: Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience*; 61(4):719-726, 1994.
39. Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C: Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiol Scand*; 168:21-25,2000.
40. Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD: Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery*; 43(6):1427-1436, 1998.
41. Soy, O., et al. 2004. Time-level relationship for nitric oxide and the protective effects of aminoguanidine in experimental spinal cord injury, *Acta Neurochir (Wien)* 146: 1329–1336, 2004.