

**T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD HASARINDA
QUETIAPINE' İN TEDAVİDEKİ ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. MURAT HAMİT AYTAZ

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AYDIN PAŞAOĞLU**

ANKARA - 2007

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve ihtisasım süresince bilgisi, tecrübesi ve desteğiyle bana her konuda destek olan tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Aydın Paşaoğlu' na teşekkürlerimi sunarım. Yine tez çalışmam esnasında histopatolojik incelemeleri titizlikle yapan Hacettepe Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Figen Kaymaz' a ve her konuda maddi, manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam ve ağabeyim Doç. Dr. Memduh Kaymaz' a teşekkür ederim.

Uzun ve zorlu uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde büyük emekleri olan başta anabilim dalı başkanım Sayın Prof. Dr. Şükrü Aykol' a, Sayın Prof. Dr. Necdet Çeviker' e, Sayın Prof. Dr. Kemali Baykaner' e ve Sayın Prof. Dr. Toygun Orbay' a teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman, her konuda bana destek olup, tecrübelerini benden esirgemeyen hocalarım ve ağabeylerim Sayın Doç. Dr. Fikret Doğulu, Yrd. Doç. Dr. Gökhan Kurt ve Uzm. Dr. Hakan Emmez' e teşekkürlerimi sunarım. Başta tüm uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve birçok zorluğa birlikte göğüs gerdiğimiz sevgili dostum Dr. Ertan Ergün olmak üzere tüm doktor, hemşire ve personel arkadaşlarıma, tezimi hazırlarken yaptığı değerli çalışmalarını benimle paylaşan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi A.D.' ndan sevgili Doç. Dr. Hülya Gültekin ve Uzman Dr. Hasan Ulusoy' a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Son olarak, yine bu zorlu eğitim dönemi boyunca hep yanımda olan, her zaman destekleyen ve bana katlanan fedakâr eşim Sayın Dr. Ülkü AYTAR' a, sevgili anne ve babama saygı ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Murat Hamit AYTAR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İnsan Spinal Anatomisi	4
2.1.1. Vertebral Kolon	4
2.1.2. Medulla Spinalis ve Zarları	9
2.2. Spinal Kord Travması.....	13
2.2.1. Tarihçe	13
2.2.2. Spinal Kord Hasarlanması ve Fizyopatolojisi	15
2.3. Apoptozis	21
2.4. Serotoninerjik Yolaklar ve Apoptozis	43
2.4.1. Serotonin.....	43
2.4.2. Sentez, Biyotransformasyon ve Eliminasyon.....	44
2.4.3 Serotonin Reseptörleri	51
2.4.4. Sinyal Transdüksiyonu ve Hücrel Yolaklar	60
2.5. Quetiapine (Serequel®).....	61
3. MATERYAL ve YÖNTEM	64
3.1. Cerrahi Teknik	64
3.2. Doku Takibi	66
3.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	67

4. BULGULAR	71
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	80
6. TARTIŞMA.....	83
7. SONUÇ	87
8. ÖZET	88
9. SUMMARY	89
10. KAYNAKLAR.....	90

KISALTMALAR

5-HIAA	:	5-Hidroksi Indol Asetik Asit
5-HT	:	5- hidroksitriptamin (serotonin)
AIDS	:	Acquired immune deficiency syndrome (edinsel immün defekt sendromu)
Apaf-1	:	Apoptotic protease activating factor
APUD	:	Amin Prekürsör Uptake Dekarboksilaz Kök Hücre
ATP	:	Adenozin trifosfat
BOS	:	Beyin Omurilik Sıvısı
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
EGF	:	Epidermal Büyüme Faktör
ELISA	:	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
EPS	:	Ekstrapiramidal sistem
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü
G�S	:	Gastrointestinal sistem
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
IBDM	:	�nsuline bağımlı diabetes mellitus
IL	:	Interlökin
IFN	:	�nterferon
Kaspaz	:	(Caspase): cystein dependent aspartate spesific proteases
MAO	:	Monoamin Oksidaz
MDMA	:	3,4-Methylenedioxymethamphetamine (Extacy)
NK1R	:	Nörokinin 1 reseptörü
NMDA	:	N-metil D aspartat

NO	:	Nitrik oksit
NPY	:	Nöropeptid Y
NSAI	:	Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar
PBS	:	Phosphate buffered saline (fosfat tampon solusyonu)
PDGF	:	Platellet Kökenli Büyüme Faktörü
PMNL	:	Polimorfonükleer lökosit
PS	:	Fosfotidil serin
QTc	:	düzeltilmiş QT intervalı
SSRI	:	Serotonin Spesifik Reuptake(Gerialım) İnhibitörü
SSS	:	Santral Sinir Sistemi
Tdt	:	Terminal deoksinucleotidil transferas
TGF	:	Dönüşüm Yaptırıcı Büyüme Faktörü
TNF	:	Tümör Nekroze Eden Faktör
TNFR	:	Tümör Nekroze Eden Faktör Reseptörü
TPH	:	Triptofan hidroksilaz
TUNEL	:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP end labeling
VMH	:	Ventromediyal Hipotalamik Çekirdek

ŞEKİLLER VE RESİMLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. Nekroz ve apoptoziste görülen ultrastrüktürel değişiklikler dizisi (Wyllie ve ark. 1988).....	24
Şekil 2. p53 gen aracılı apoptozis	31
Şekil 3. Ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozisin şematik görünümü (Keane RW, 2001)	32
Resim 1. Deneysel spinal kord travması oluşturulması (kipleme yöntemi)	65
Resim 2. TUNEL yöntemiyle hazırlanan spinal kord kesiti örneği (x50).....	69
Resim 3. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış spinal kord kesiti örneği (x50)	70
Resim 4. Kordda ödem, nöronlarda büzüşmeler(kırmızı oklar) ve hemorajik alanlar(sarı ok) izlenmekte (K-I, HEx200).....	73
Resim 5. 7 günlük kontrol grubunda da yaygın ödem ve doku bütünlüğündeki bozukluk göze çarpmakta. Yine gri cevherde nöronlardaki büzüşme(kırmızı oklar) de yine dikkat çekmekte (K-II, HEx200).....	74
Resim 6. Deney grubu HE preparatlarında ödemin nispeten az oluşu ve gri cevherde doku bütünlüğünün korunduğu görülmektedir (D-II, HEx200)	75
Resim 7. 1 günlük kontrol grubunda doku bütünlüğünün bozulduğu sahada ilk gün içinde ortaya çıkan apoptag pozitif hücreler kahverengi renkte görülebilmektedir (K-I, TUNELx200)	76

- Resim 8.** 7 günlük kontrol grubunda doku bütünlüğünün bozulduğu kordda çok sayıda kahverengi renkte boyanmış apoptag pozitif hücre izlenmekte (K-II, TUNELx200)..... 77
- Resim 9.** 1 günlük deney grubunda az sayıda apoptag pozitif hücre(ok) seçilmekte (D-I, TUNELx100)..... 78
- Resim 10.** 7 günlük deney grubunda apoptag pozitif hücre sayısının az oluşu dikkat çekmekte. Yine gri cevherdeki(mavi ok) hücre sayısı beyaz cevhere(sarı ok) göre daha az olarak izlenmekte. Travmanın yoğun olduğu bölgede(kırmızı ok) pozitif hücre sayısı kontrol grubundan az olmakla birlikte komşu sahalardan daha fazla sayıda izlenmekte(D-II, TUNELx100)..... 79

TABLOLAR DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar	25
Tablo 2. Fas reseptörü aracılı apoptotik mekanizma	29
Tablo 3. Bir gün yaşatılan ilaç grubunda (D-I) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları	71
Tablo 4. Bir gün yaşatılan kontrol grubunda (K-I) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları.....	71
Tablo 5. 7 gün yaşatılan kontrol grubunda (K-II) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları.....	72
Tablo 6. 7 gün yaşatılan ilaç grubunda (D-II) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları	72
Tablo 7. İstatistiksel Analiz Sonuçları	80

GRAFİKLER DİZİNİ**Sayfa**

Grafik 1. Hücre ile grup etkileşimini gösterir grafik (1. Gün).....	81
Grafik 2. Hücre ile grup etkileşimini gösterir grafik (7. Gün).....	82

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Spinal kord merkezi sinir sisteminin serebrum ve serebellumla birlikte diğer önemli bileşeni olup kraniyal merkezlerle periferik sinirleri / organları birbirine bağlayan önemli yolları barındıran bir köprü gibi konumlanmıştır. Hayati önemi ve hassasiyetine uygun bir kemik koruyucu, vertebra tarafınca çevrelenmiş olarak vücutta yer alır. Spinal kord her ne kadar koruma altında gibi görünse de gelişen teknoloji ve dinamik bir hayatın getirdiği birçok zorlayıcı dış etkenle her an karşı karşıya kalabilmekte ve bunların hatırı sayılır bir kısmı da spinal kordda ciddi travma yaratabilmektedirler.

Spinal kord travmatik hasarlanması çok ciddi sorunları beraberinde getirebilecek yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden travmalardan birisi olarak sıkça karşılaşılan bir sorundur. Vücut hareketlerine, ani ivmelenmelere dinamik olarak cevap veren vertebral kolon ciddi bir travmayla kontrol dışı bir harekete maruz kalarak koruduğu spinal kordun direkt hasarlayıcısı da olabilmektedir. Günümüz kazalarının büyük çoğunluğunu motorlu araç kazaları ve iş kazalarının oluşturduğu düşünüldüğünde omurganın ve haliyle spinal kordun ne kadar büyük bir risk altında olacağı görülebilecektir. Bu durumda son derece hassas bir yapıya sahip olan spinal kordun travmayı en az hasarla atlatabilmesi ve ileriye dönük korunması amaçlı birçok medikal ve/veya cerrahi tedavi prensibi bulunmuştur, denenmektedir ve de denenecektir.

Spinal kordda oluşacak hasarı anlamak ve onunla mücadele etmek için anatomisini, fizyolojisini ve hasarlanma olaylarındaki patofizyolojiyi çok iyi bilmek gerektiği açıktır. Spinal kord travmasında primer ve sekonder hasarlanma mekanizmaları devreye girmektedir. Akut travmada kordda oluşan destruksiyon ve primer hasarlanmayla mücadele etmek adına hala fazla bir tedavi seçeneği yoktur. Bu amaçla kalsiyum kanal blokerleri, opiat

antagonistleri, sistemik glukokortikoidler, sistemik kan basıncının artırılması, antioksidanlar, naloxane gibi birçok yol denenmiş olmakla birlikte erken hasarlanma mekanizmalarına karşı yüksek doz metil-prednizolondan ve immobilizasyondan başka etkin, rutin uygulamada kendine yer edinmiş bir tedavi seçeneği oluşturulamamıştır.

Sekonder hasarlanmayla mücadele ise mevcut sağlıklı nöronları maksimum şekilde korumak, fonksiyonel iyileşmeyi sağlamak ve kayıpların geri kazanımını üst düzeyde sağlayabilmek adına daha önemli gibi görünmektedir. Gerçekten de spinal travma fizyopatolojisi daha iyi anlaşıldıkça tedavi seçenekleri de daha iyi planlanabilmekte ve birçok araştırmanın konusu olmaktadır.

Santral sinir sisteminde serotonin (5-hidroksitriptamin) önemli nörotransmitterlerden birisi olup serotonin reseptör ailesi yedi alt gruba ayrılmıştır (5-HT₁₋₇). Bu reseptör alt grupları arasında 5-HT₂ reseptör ailesi de önemli bir yere sahiptir. Serebral ve spinal birçok çalışmanın konusu ve hedefi olmuştur.

Quetiapine (Serequel©, Astra Zeneca) dibenzotiyazepin türevi bir atipik antipsikotik ajan olup serotonin 5-HT₂ reseptörlerine yüksek, dopamin D₂ reseptörlerine ise daha düşük bağlanma afinitesi gösteren bir bloker ajandır. 5-HT₂ reseptör blokajının diğer organlarda, özellikle kardiyak incelemelerde iskemi – reperfüzyon yolağında önemli koruyucu etkinliğinin, özellikle de apoptozisi önleyici etkisinin olduğu ortaya konulmuş, hatta diskopatilere bağlı nörojenik ağrının kontrolünde de rol oynadığı vurgulanmıştır. Bilindiği üzere apoptozis, spinal kord zedelenmesinde sekonder travma safhasındaki en önemli mekanizmalardan birisidir ve bu yolu bloke etmek adına da birçok ajan deneysel çalışmaların konusu olmuştur. Bu bağlamda 5-HT₂ reseptör bloker etkinliği yüksek, EPS yan etkileri gibi ciddi yan etkiler yönünden daha güvenilir bir atipik antipsikotik olan, hatta travmaya maruz

kalan hastaların posttravmatik dönem rehabilitasyonlarında önemli sorun oluşturan ajitasyon, agresyon ve depresyon tablolarının da tedavisinde kullanımını destekleyen çalışmalar olan bir ajan olarak “quetiapinin” daha önce hakkında hiçbir yayınlanmış çalışmanın olmadığı spinal travmada koruyucu bir etkisinin olup olmadığı araştırılacaktır. Spinal travmaların ciddi multisistem travmanın bir parçası olabildiği, spinal travmaya sekonder geçici/kalıcı parezi ve pleji varlığının hastaların duygu durumunu ne kadar olumsuz etkilediği düşünüldüğünde quetiapinin spinal travmada koruyucu bir özelliği gösterilebilirse bu tür travma hastalarında quetiapin ile çok yönlü ve önemli fayda sağlanabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsan Spinal Anatomisi

Spinal anatomiye çok iyi bilmenin, spinal travmayı iyi anlamak ve onunla doğru mücadele etmek ve hatta daha iyi tedavi prensipleri geliştirmek için şart olduğu açıktır. Bu nedenle spinal kolonun önce anatomisinden bahsetmek yerinde olacaktır(103).

2.1.1. Vertebral Kolon

Vertebral kolon; boyun, sırt ve bel bölgesi iskeletini oluşturan üst üste yerleşmiş 33 adet omurun oluşturduğu bir yapı olarak ortasında oluşturduğu spinal kanal ile medulla spinalise, çıkan sinirlere, bunları besleyen damarlar ve saran meninkslere bir koruyucu kafes gibi fonksiyon görür. Vertebral kolon; kraniyum, kaburgalar, sternum, koks ve sakrum gibi vücut orta hat kemiklerinin eklemleşmesiyle oluşan skeleton aksiyale' nin en büyük kısmını oluşturur. Erişkinde yaklaşık 72-75cm uzunluğa sahiptir ve bunun $\frac{1}{4}$ ' ünü de intervertebral diskler oluşturur.

Vertebral kolon çevrelediği medulla spinalisi ve çıkan sinirleri korur, vücut ağırlığını taşır, postür ve lokomasyonda önemli rol oynar. Hareket sadece ilk 24 vertebra arasında olur: 7 servikal, 12 torakal ve 5 lomber. Sakral 5 ve koksigeal 4 vertebra ise kaynaşarak tek kemik yapı oluştururlar. Vertebral kolon omurlar ve aralarındaki intervertebral diskler nedeniyle esnek bir yapıya sahiptir. Ayrıca bu ilk 24 omur arasında sinoviyal eklemleşmeler de mevcuttur. Vertebral kemerlerin eklem çıkıntıları arasında oluşan eklem yapısı faset eklemi olarak isimlendirilir. Faset eklemleri posterior stabilitenin önemli oluşturucusu olmakla birlikte vertebranın fleksiyon, ekstansiyon ve rotasyon hareketlerine de imkan tanır ve

vertebraların öne doğru kaymalarına da engel olurlar. Yine anterior ve posterior longitudinal ligamanlar vertebra korpuslarını kafa kaidesinden sakruma dek sararak fleksiyon ve ekstansiyonda stabiliteye katkıda bulunurlar.

Her bir vertebra önde yoğun kemik yapıya sahip olan gövde (korpus), arkada pediküller, laminalar ve spinöz çıkıntıların oluşturduğu kemer (arkus)' den oluşmuştur. Korpusun arka yüzü ile arkus ortada vertebral kanalı oluştururlar. Pediküllerin üst ve altlarındaki oluklar olan incisura vertebralis superior ve inferiorlar birleşerek de intervertebral foramenleri oluştururlar ki bu foramenlerden spinal sinir kökleri ve eşlik eden damarlar geçer.

Arkus üzerinde yer alan çıkıntılar olan spinöz ve transvers çıkıntılar ise derin sırt kasları için uygun tutunma yerleridir. Yine bu yapılar kaldıraç kolu görevi yaparak kasların omurları hareket ettirmesinde yardımcı rol de üstlenirler.

Vertebral kolon dinamiğini incelerken eklemlerini tanımlamak da çok önemli olacaktır, bunlar:

- Omur gövdeleri (korpus) arasındaki eklemler
- Omur kemerleri (arkus) arasındaki eklemler
- Atlas ile aksis arası eklemler
- Atlas ile oksipital kemik arası eklemler
- Omurlarla kaburgalar arası eklemler
- Sakrum ile os ilium arasındaki eklemlerdir

Bu eklem yapıları omurganın omurları arasında kısıtlı, omurganın tamamında ise oldukça esnek bir hareket serbestisi sağlamakla birlikte omurganın dış travmalara karşı

medulla spinalisi koruması adına etkin bir yapı oluştururlar. Ayrıca omurganın stabilitesinde önemli olan diğerk yapılara da göz atmak faydalı olacaktır.

2.1.1.a. Ligamentum longitudinale anterius

Bant şeklinde fibröz bir bağı olup vertebra korpuslarının ve intervertebral disklerin ön yüzlerini örter ve birbirlerine bağlar. Sakrumun pelvik yüzünden başlar, C1 vertebra tuberculum anterius' una ve foramen magnumun ön kısmında oksipital kemiğe tutunur. Vertebral kolonun hiperekstansiyonuna engel olan önemli yapılardan biridir.

2.1.1.b. Ligamentum longitudinale posterius

Anterior ligamentten daha dar ve daha zayıf bir bağıdır. Vertebra korpuslarının arka yüzleri boyunca vertebral kanal içinde seyreder. C2' den sakruma kadar vertebra korpuslarının ve intervertebral disklerin arka kısımlarına sıkıca tutunur. Hiperfleksiyonun önlenmesinde yardımcıdır. Disklerin herniasyonuna da engel olmaya çalışır. Posterior ligament ağrıyı ileten sinir uçları yönünden de oldukça zengindir. Bu ligaman C2 seviyesinde sonlanınca yukarıya güçlü bir bağ olan **membrana tectoria** olarak devam eder. Membrana tectoria foramen magnumdan geçip kafatası tabanının merkezi kısmına tutunarak sonlanır.

2.1.1.c. Faset eklemler (*Articulatio zygapophysealis*)

Komşu vertebraların artiküler prosesleri arasında oluşan plana tipi eklemlerdir. Gevşek bir capsula articularis ile çevrelenirler. Laminalar, transvers ve spinal çıkıntılar arasında uzanan aksesuar bağlar bu eklemlerin stabilizasyonuna yardımcı olurlar.

Faset eklemeleri vertebralar arası kayma hareketlerine izin verirler. Servikal ve lumbal bölgelerde bu eklemler bir miktar yük de taşırlar, intervertebral disklere inen yükü paylaşırlar. Faset eklemlerin innervasyonu spinal sinirlerin arka dallarının ramus medialislerinden ayrılan eklem dallarıyla olur. Her bir dal iki eklemi innerve eder yani her bir eklem hem kendi seviyesinden hem de bir üst seviyeden olmak üzere iki siniri vardır.

2.1.1.d. Ligamentum flavum

Komşu vertebra arkuslarını birbirine bağlayan sarı renkli elastik bağlardır. Her iki vertebra laminaları arasında neredeyse vertikal biçimde yerleşip vertebral kanalın posterior yüzünün de bir komponentini oluşturmuş olurlar. Yukardan aşağıya inildikçe kalınlığı artar. Laminaların birbirinden ayrılmasına izin vermez ve bu şekilde ani fleksiyona izin vermeyerek disklerin zedelenmesini önler. Güçlü ve elastik yapıya sahip olan ligamentum flavum vertebral kolonun normal eğriliklerinin korunmasına ve fleksiyondan doğrulmaya yardımcı olur.

2.1.1.e. Ligamentum İnterspinale

Her bir spinal prosesin tamamına tutunup diğer spinöz proseslere bağlar. Gücsüz ve neredeyse membranöz bir bağ yapıdadır.

2.1.1.f. Ligamentum Supraspinale

Kordon şeklinde bir bağ olup fibröz, güçlü bir bağdır. C7 vertebradan itibaren sakruma kadar tüm spinöz proseslerin tepeleri arasında uzanan bağdır. Boyunda ise yukarıya doğru geniş, güçlü bir bağ olan **ligamentum nuchae** olarak devam eder.

2.1.1.g. Ligamentum Nuchae

İnterspinal ve supraspinal ligamentlerden farklı bir yapıya sahiptir. Kalınlaşmış fibroelastik liflerin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Eksternal oksipital protuberans ve foramen magnumun arka kenarından başlayıp servikal vertebralar spinöz proseslerinde sonlanır. C3 – C5 arası spinöz proseslerin kısa olması nedeniyle bu ligament kemik yerine geçer ve kaslar için tutunma yeri oluşturur.

2.1.1.h. Columna Vertebralis' in Damarları

Vertebralar komşu segmental damarların dallarıyla beslenirler. Bu **rami spinalesler**:

- Boyunda a. vertebralis ve a. cervicalis ascendens
- Torakalde aa. intercostales posteriores

- Abdomende a. subcostalis ve aa. lumbales
- Pelviste a. iliolumbalis, aa. sacrales laterales ve a. sacralis mediana' nın dallarıdır

Rami spinalesler foramen intervertebralelere girip çoğunlukla spinal sinirlerin dorsal köklerine (rami dorsalis), ventral köklerine (rami ventralis) ve onların kılıflarına dağılan terminal radiküler arterlere dağılırlar. A. radikülarislerin bazıları a. medullaris segmentalis olarak medulla spinalisin arterleriyle anastomoz yaparlar.

Vena spinalisler vertebral kolon boyunca vertebral kanalın hem içinde (**plexus venosus vertebralis internus**) hem de dışında (**plexus venosus vertebralis externus**) venöz plexuslar oluştururlar. Büyük ve kıvrıntılı **vv. basivertebrales** ise corpus vertebranın içindedir ve yüzeyindeki (çoğunlukla posteriorda) deliklerden çıkıp plexuslara açılırlar. **Vena intervertebralisler** foramen intervertebraleler içinde spinal sinirlere eşlik ederler.

2.1.2. Medulla Spinalis ve Zarları

2.1.2.a. Medulla Spinalis

Beyin ve gövde arasında sinir iletim yolu ve majör refleks merkezi olan medulla spinalis vertebral kanal içinde oturmuş, ön ve arkada hafifçe yassılaştırmış silindirik bir yapıdır. Medulla oblongatanın devamı olarak başlar. Foramen magnumda başlayıp erişkinde yaklaşık L2 vertebra hizasına kadar devam eden yaklaşık 42 – 45cm uzunlukta bir yapı olup alt ucu olan conus medullaris ile sonlanır. Ekstremitelerin innervasyonu amaçlı 2 bölgede genişleme gösterir:

Intumescentia cervicalis: C3 – T1 segmentleri arasındır. Ventral dalların çoğu üst ekstremiteleri innerve etmek üzere **pleksus brachialis**’ i oluştururlar.

Intumescentia lumbosacralis: T11 – L1 segmentleri arasında yer alır. Ventral dallar alt ekstremiteleri innerve etmek üzere pleksus lumbalis ve pleksus sakralisi oluştururlar. Intumescentia lumbosacralis ve conus medullarisden başlayan spinal sinir kökleri **cauda equina**’ yı oluştururlar. Bu demet de **cisterna lumbalis** (subaraknoid boşluk) içinde kaudale devam eder. Konusun distalinde bulunan ve cauda equinayı içeren subaraknoid boşluğun bu genişlemesine **cisterna lumbalis** denir. Bu yapı L2 seviyesinden S2 seviyesine kadar uzanır.

Medulla spinalise 31 spinal sinir çifti bağlanır. Bu çiftlerin 8’ i servikal, 12’ si torakal, 5’ i lumbal, 5’ i sakral ve 1’ i koksigeal spinal sinirlerdir. Medulla spinalise önde radix anterior, arkada radix posterior diye isimlendirilen köklerle bağlanırlar ve bu kökler forameni foramina intervertebralisler aracılığıyla terk ederler.

Spinal sinirlerin dorsal kökleri afferent (duyu) liflerini, ventral kökler ise iskelet kaslarına giden çok sayıda efferent (motor) liflerini ve çok sayıda presinaptik otonom lifleri içerirler. Ventral kökleri oluşturan somatik aksonların hücre gövdeleri medulla spinalis cornu anterior’ unda bulunurken dorsal kökleri oluşturan aksonların hücre gövdeleri medulla spinalisin dışında, dorsal köklerin distal ucundaki dorsal kök ganglionlarında yani **ganglion spinale**’ dedirler. Dorsal ve ventral kökler vertebral kanaldan çıkış noktasında birleşirler ve **spinal sinirleri** oluştururlar.

Her bir spinal sinir hemen **primer ramus dorsalis** ve **primer ramus ventralis**’ lere ayrılırlar. Dorsal dallar deri sırt kaslarını innerve ederlerken ventral dallar ekstremiteler ve gövdenin geri kalanını innerve ederler.

Embriyoda medulla spinalis ile vertebral kanalın boyu eşittir. Fetal periyod boyunca kanal medulla spinalisten daha hızlı gelişir ve doğumda medulla spinalisin alt ucu (conus medullaris) L2–3 düzeyindedir ve doğumu takip eden aylar içinde erişkindeki seviyesi olan L1–2 seviyesine kadar çıkar. Conus medullarisin alt ucundan **filum terminale** başlar, sinir lifleriyle birlikte kaudale ilerleyerek dural keseyi de S2 seviyesinde terk ettikten sonra koksiks dorsumuna yapışarak sonlanır. Filum terminale, embriyonun kuyruğunda bulunan medulla spinalisin kaudal bölümünün artakalan kalıntısıdır.

2.1.2.b. Medulla Spinalisi Çevreleyen Zarlar

Medulla spinalis, sinir kökleri ve cauda equina' nın lifleri de kraniyaldeki gibi duramater, araknoid mater ve piamater tarafınca çevrelenir ve korunurlar.

2.1.2.b.1. Duramater Spinalis

En dış zar tabaka olup foramen magnumda kraniyal duramaterin devamı olarak başlayıp **S2** seviyesine dek uzanan dural keseyi oluşturacak şekilde konumlanmıştır. Duramater, **dural kök kılıflarını** oluşturmak üzere sinir kökleri ve foramen intervertebrale boyunca devamlılık gösterip foramen intervertebralelerin periostlarına yapışır ve spinal sinirlerin epinöryumlarına karışarak sonlanırlar.

2.1.2.b.2. Araknoid mater spinalis

Medulla spinalisi, spinal sinir köklerini ve gangliyon spinaleyi çevreleyen, BOS ile dolu subaraknoid alanı oluşturan, ince, avasküler bir membrandır. Duramatere yapışık değildir ancak alttaki BOS' un basıncı yüzünden duramater iç yüzüne tutunur. Yani normalde subdural boşluk diye bir yapı spinal kanalda söz konusu değildir. Subaraknoid aralıkta yine piamater tutunan **trabeculae arachnoideae** denilen ince iplikçikler bulunur.

2.1.2.b.3. Piamater spinalis

En içte yer alan, yassı epitelyum hücrelerinden oluşmuş, medulla spinalisi sıkıca saran tabakasıdır. Medulla spinalisin damarları ve spinal sinir köklerini de sıkıca sarar. Piamater conus meduularisin altında filum terminale olarak devam eder.

2.1.2.b.4. Ligamentum denticulatum

Medulla spinalis, dural kese içinde her iki yanından testere dişi biçimli ligamentum denticulatumlar aracılığıyla asılmıştır. Bu ligamentler dorsal ve ventral köklerin tam ortasından piamaterden dışarı uzanıp dural kesenin iç yüzüne yapışırlar. 20 – 22 adet ligamentum denticulatum vardır. Bunların en üst bölümü foramen magnum içinde oksipital duraya yapışır. En alt bölümü ise T12 – L1 sinir kökleri arasında uzanır. M. spinalisi kanal içinde asan ve destekleyen önemli bir yapıdır.

2.2. SPİNAL KORD TRAVMASI

2.2.1. Tarihçe

Spinal kord yaralanmaları, tanımlanması ve mücadelesi çok eskilere, binlerce yıl öncesine dayanan bir tarihe sahip olup bunu kanıtlayan ilk yazılı belge M.Ö. 3000–2500 yılları arasında yazılmış olan ve 1930 yılında Bearsted’ in tercüme ettiği Edwin Smith papirusudur. Bu papirusta eski mısırlı cerrahlar spinal kord yaralanmalı bir olguda motor, total his ve idrar kontrolü kaybı olduğu ve tedavisinin olmadığından bahsetmektedirler. Yunanlı filozof Hipokrat (M.Ö. 460–377) vertebra dislokasyonuna eşlik eden ekstremitelerdeki paralizileri hakkında geniş bilgiler vermiş ve paraplejiyi tariflemiştir. Galen (M.S. 120–200) kordda longitudinal kesilerin fonksiyon üzerine etkilerinin olmadığı, buna karşın transvers kesilerin bu seviyenin altında parapleji oluşturduğunu göstermiştir. Bu sayede Hipokrat’ ın omurilik yaralanmalarında lezyon seviyesinin altında motor ve duyu kaybı olduğu konusundaki hipotezini yaptığı anatomik ve nörofizyolojik çalışmalarla doğrulamıştır. M.S. 625–690 yıllarında yaşamış olan Paul of Aegina omuriliğe bası yapan kırıkların tedavisinde ilk kez laminektomi yapan hekimdir(Son. 1890 yılında Schmaus spinal kord travması üzerine en eski deneysel çalışmalardan birini yapmış ve bu çalışmada tavşan spinal kordunun travmatik hasara histopatolojik cevabını tanımlamıştır. Allen 1911 yılında yüksekten omurilik üzerine ağırlık düşürerek, deneysel omurilik yaralanması oluşturmuştur. Tarlov 1953’ de epidural aralıkta balon şişirerek omurilik yaralanması yaratmıştır. Tator 1978’ de omuriliği ekstradural olarak anevrizma klibiyle komprese etmiş, klip kapanma gücü ve kompresyon süresi ile omurilik yaralanma şiddeti arasında ilişki bulmuştur. Stokes ve Reider 1990’ da omuriliğe yapılacak darbenin şiddetini ve hızını önceden belirleyip darbe sonunda ön görülen travmanın olup olmadığını denetleyen elektromekanik bir cihaz geliştirmişlerdir. Medulla spinaliste travma oluşturan modellerinin bu kadar çok teknikle uygulanması bazı

karışıklıklara neden olmuştur. Bu nedenle Chung daha standart, daha ideal hayvan modeli oluşturulması adına bazı kriterler önermiş, Collins de buna atıfta bulunarak spinal kord travması ve tedavi metodlarını yeniden gözden geçirmiştir(77,105).

Bahsedilen bu kriterler;

1. Oluşturulacak travma, doku hasarı ya da nöronal disfonksiyon, hayvandan hayvana değişmez şekilde yaratılabilmeli, travma sonrası değerlendirilecek parametrelerdeki varyasyonlar kabul edilebilir sınırlarda olmalı, preklinik çalışma başlamadan önce bu sınırlar belirlenmelidir.
2. Hayvan modelindeki kaçınılmaz yan etkiler (cerrahi yaralanma, anestezi ajanlarının etkisi, metabolik ve hemodinamik değişiklikler) en aza indirgenmeli, çalışma başlamadan olası etkiler tanımlanmalıdır.
3. Çalışmanın sonuçları tekrarlanabilir ve sayısal hale getirilebilir olmalıdır.

2.2.2. Spinal Kord Hasarlanması ve Fizyopatolojisi

Son birkaç yüzyıl boyunca spinal travmanın patofizyolojisini anlamak ve sorunla mücadele etmek adına gelişen görüntüleme tekniklerinin de büyük katkısıyla çok önemli başarılar elde edilmiştir. Bu sayede oluşan spinal travmanın tam olarak ne tipte olduğu, nereyi ve nasıl etkilediği daha iyi tanımlanabilir ve tedavi zamanlaması ve seçenekleri de daha iyi planlanabilir olmuştur. Spinal kordda ciddi hasar oluşturan travmaların çoğunluğu fiziksel kesiden çok kompresyon ve kontüzyon şeklinde hasarlanmalar oluştururlar. Spinal kord hasarı hakim olarak genç erkeklerin hastalığı olarak karşımıza çıkmakta olup ortalama yaş 25' dir.

Travmanın yeri genellikle anotomik hasarlanma seviyesiyle uyumlu olmakla birlikte her zaman hasarlanan kemik seviyesiyle hasarlanan kord seviyesi aynı olmaya da bilir. Üst spinal seviyelerde hasarlanma daha ciddi olmakla birlikte kısmi nörodefisit varlığı her seviyede karşımıza çıkabilmektedir. Ayrıca bilinmektedir ki mekanik strese gri ve beyaz cevher farklı cevap verir. Gri cevher hasara daha hassas görünmektedir. Nörotravma total veya parsiyel olabilir. Spinal travma izole de olabilir, multisistem travmanın bir parçası da. Hasta yönetiminde bu durum multisistem travmalı hastalarda çok önemlidir. Genellikle ilave acil torasik, abdominal veya kafa travmaları varlığı mevcut spinal travmanın gözden kaçması veya geç tanınmasına yol açabilmektedir. Geliştirilen travma sınıflandırma prensipleri de klinisyenlerin spinal travmanın şiddetini değerlendirmesi, instabilitenin derecesini belirlemesi ve tedavi şeklini planlaması adına da önemli katkılar sağlamıştır. Sürekli geliştirilmekte olan ve yüksek maliyetli sistemler olan spinal fiksasyon sistemleri de beraberinde hem hasta hem de toplum yararı adına doğru hasta ve doğru tedavi şekli belirleme gerekliliğini öne çıkarmıştır. Böylece geliştirilen skalalarla hastaların ciddi operasyonlara ve internal fiksasyon sistemlerine mi yoksa sadece konservatif tedavi seçeneklerine mi uygun olduğu da belirlenmektedir(91, 128, 129).

Spinal kord hasarı oldukça uzun bir zaman öncesinden bu güne (Allen 1911) primer ve sekonder hasarlanma olarak iki önemli kısım altında değerlendirilir(133). Travma anında travma sahasındaki dokuların kompresyon, distraksiyon, laserasyon gibi mekanizmalarla nekroz ve fonksiyon kaybıyla sonuçlanan fiziksel hasarlanmaları olayı **primer hasar**, bundan sonraki saatler ve günler ve hatta haftalar içinde gelişen bir takım patofizyolojik, hemodinamik ve biyokimyasal mekanizmalarla devam eden, artan doku kaybı dönemi de **sekonder hasar** olarak isimlendirilir(91, 125). Yapılan çalışmalarda travmanın tipinin yanı sıra primer hasardan çok sekonder doku hasarlanmasının daha gürültülü seyrettiği

bildirilmiştir. Primer hasarlanmayı o an önleyebilecek fazla bir şey olmamasına rağmen sekonder hasarlanma evresinde nöronları koruyabilecek tedavi sistemleri söz konusu olabilir. Bu nedenle son dönemde yapılan deneysel çalışmalarda bu sekonder yaralanmanın önüne geçebilecek medikal tedaviler üzerinde durulmaya başlanmıştır(80, 125, 134). Hasarlanma mekanizmalarına daha ayrıntılı bakılacak olursa;

Primer hasarlanma akut faza da karşılık gelecek şekilde primer mekanik travmaya fizyolojik ve hücrel cevabı içeren faz olup; çarpma, kompresyon, distraksiyon, laserasyon gibi mekanizmalar sonucu kordda oluşan hasarlanmadır. Travma sahasında 15 dakika içinde ince kapiller damarların ayrılması ve ince duvarlı venlerin yırtılmasıyla ekstrasellüler ve periaksonal boşluklarda progressif noktasal kanamalar ortaya çıkar. Hemorajik sahanın büyüklüğü zorlanmanın etkisiyle bağlantılıdır ve en belirgin olarak da gri cevher ile posterior kolonların ventral yüzeylerinin sınırında 2 – 4 saat içinde görülür. Primer hasarlanmayı takiben ve girift bir şekilde sekonder hasarlanma mekanizmaları hemen devreye girerler. Hemorajik nekrozun gelişimi ve yayılımına interstisyel ödem de eşlik eder. Bu ilk ödem nonproteinöz bir ödem olmakla birlikte zaman içinde hasarlanan damar-kord bariyeri varlığı ve elektrolit denge bozuklukları sayesinde protein ekstrasvazasyonu ile birlikte vazojenik ödem görülür. Ciddi kapalı spinal travma varlığında ödem ve hemorajik nekroz 4 saat içinde belirgin yayılım gösterir ve bu tablo 18 saate kadar ulaşır(125).

Spinal kord yaralanmasında erken dönemde görülen en önemli değişiklik hücre membran geçirgenliğinin ve iyon pompasının bozulmasıdır. Bunun sonucunda kalsiyum hücre içine girer ve potasyum hücre dışına çıkar. Membran geçirgenliğinde artış olması, sodyumun su ile birlikte hücre içine girmesine ve sonuçta ödem gelişmesine olanak sağlar. Kalsiyumun normal nöronal fonksiyonu ayarlama rolü olduğu gibi hücre ölümü ve yaralanmasında da önemli rolü bulunmaktadır. Potasyum ekstrasellüler mesafede travmadan 2–3 saat sonrasına

kadar yüksek seviyelerde bulunurken, kalsiyum intrasellüler mesafede uzun süre yüksek konsantrasyonda bulunabilmektedir. Travma sonrası hücre içinde kalsiyum düzeyi yaklaşık 45 dakika içinde önemli derecede yükselir ve 8 saat içinde maksimum düzeye ulaşır ve travmadan 1 hafta sonrasına kadar yüksek düzeyde kalmaya devam eder. Kalsiyumun bu düzeylere çıkmasında ve korunmasında voltaja bağlı kalsiyum kanallarının açılmasının yanı sıra, yaralanma sonrası salınımı artan glutamat ve aspartat gibi nörotransmitterlerin MDA reseptörlerini kullanarak kalsiyum kanallarını açması yardımcı olur. Hücre içi yüksek kalsiyum ödeme yol açmasının yanı sıra, aynı zamanda proteolitik ve fosfolipaz enzimlerin aktivasyonu yoluyla hücre iskeletinin ve hücre zarının parçalanmasına neden olur(38, 46, 90, 94, 125, 136).

Travmanın ilk 24 saatinde spinal kord damarlarındaki hasar; damar ayrılması, vasküler endotelyal şişme ve bunlara ilaveten küçük intramedüller damarların, venüllerin ve kapiller sistemin tromboz ve fibrinoid nekrozla obliterasyonu şeklinde belirgin olarak ortaya çıkmaktadır. Progresif post-travmatik iskemi tablosu da bu vasküler hasarlanma olaylarıyla birlikte ilk 24 saat boyunca devam edecektir(8, 25, 127).

Histolojik olarak; ilk 2–4 saatte nöral yapılardaki hasarlanma; aksonal, myelin ve periaksonal şişme, myelinde ayrılma ve fragmentasyonlar, aksonal uçlarda tahribat, nöronlarda kromatolizis ve ölüm şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Bu durum da vakuolizasyonun eşlik ettiği likefaksiyon nekrozuyla sonuçlanacaktır. Akut hasarlanmaya hücrel cevap PMNL invazyonu olup ilk birkaç saat içinde pik yapar. Primer safhadaki ilk saatlerin PMNL istilasının yerini günler sürecektir mononükleer lenfositler, plazmositler ve makrofajlar istilası alacaktır. 24 saatin sonunda, ortadaki hemorajik nekroz sahasının etrafındaki intakt beyaz cevheri boyunca bir lökosit halkası görülebilir. Primer fazın sonrasında devam eden likefaksiyon nekrozu ve ilişkili mikrosirküler değişikliklerle birlikte

içini hücrel artıklar, kan veya sıvı içeriğın doldurduğu santral kistik bir yapı 3–4 gün içinde görülür hale gelir. 48 saatin sonunda hemorajik nekroz ve reaktif ödemin transvers yayılımı tamamlanmıştır ancak kraniyale ve kaudale yayılım travma sonrası 6 güne kadar devam edebilir(25).

Birçok çalışmada mikrogliyal hücrelerin aktive oldukları ve proliferere oldukları deneysel olarak spinal kord travmasında gösterilmiş olup mikroglialın bu proliferasyonu proinflatuvar sitokinler ve nörotoksik moleküllerin (IL-1, IL-6, TNF α vb.) üretimiyle sonuçlanacak ve başlangıç hasarlanma sahasında sekonder hasarlanmanın oluşumu ve yayılımına neden olacaktır (63, 140, 142, 144, 145).

Travmanın geç döneminde primer hasarlanma bölgesinde primer olarak mikroglia hücrelerince oluşturulan aselüller skar doku formasyonu, komşu inen ve çıkan traktuslarda wallerian dejenerasyon ve posttravmatik vaskülopati görülür. Bu skar odağı hassas bir reaktif astrositik gliozisle de çevrelenir. Kord bu alanda makroskopik olarak atrofik ve sklerotik görünür. Spinal kordun yerini skar doku veya BOS ile dolu kistik kaviteler alacaktır. Bu kavitelerin varlığı iyileşme safhalarında aksonal rejenerasyonun önünde de bir engel teşkil edecektir(22). Bu gibi kavitelerin yarattığı sorunu engellemek adına aksonlar arası bağlantı amaçlı köprü görevi üstlenecek materyaller; örneğın periferik sinir geft (37), fetal spinal kord dokusu (21), schwann hücreleri(141) ve kök hücreler(108) deneysel olarak kullanılmıştır ve hala üzerlerinde çalışılmaktadır. Bu skar doku ve kistik kaviteler 5 yıl ve hatta daha uzun bir süre kalabilir(22).

Spinal kord travmasının ardından hücreler saatler ve günler boyu ölmeye devam ederler. Bu hücre ölümlerinden sorumlu ajanlardan bir grup da nitrik oksid ve peroksinitrit yani reaktif nitrojen türevleridir. Bu maddeler proteinlere, DNA' ya ve membran

fosfolipitlerine zarar vererek hücrelerin ölümüne neden olurlar. Bununla birlikte peroksinitritin apoptotik hücre ölümünde de rolü olduğu gösterilmiştir. Deneysel olarak da kord travma sahasında NO, peroksinitrit ve oksijen konsantrasyonlarının yüksek olduğu gösterilmiştir ve antioksidanların bu mekanizmaları ve dolayısıyla apoptozisi de önlediği gösterilmiştir(14, 15). Kordda hasarlanma alanında beyaz cevherdeki astrositler ve oligodendrositlerin yaklaşık %50' sinin travmayı takip eden 24 saat içinde öldükleri yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Astrositlerdeki kayıp anormal iyonik hemostaza yol açacaktır(58, 148). Takip eden haftalar boyu çevreleyen sahadaki glial hücreler apoptotik mekanizmalarla ölmeye devam ederler(19). Başlangıçtaki kayıplara rağmen travmanın kronik döneminde rezidü beyaz cevherde oligodendrosit yoğunluğu kontrol seviyelerine geri dönmektedir ve astrosit yoğunluğu da kimi sahalarda normal, kimi sahalarda normale yakın olarak izlenebilmektedir. Glial repopulasyonun nedeni komşu bölgelerden hücre göçü olabilir. Buna alternatif olarak veya ilaveten lokal progenitörler bölünebilir ve hasarlı spinal kordda makrogliaı oluşturabilirler(119).

Normal erişkin spinal kordu prekürsör hücreleri içerir(148). Spinal kord travmasını takiben aksonal hasarlanma ve aşırı demiyelinizasyonun nedeni sadece aksonların değil oligodendrositlerin de ciddi zarar görmeleri, kayıplarıdır. Bilindiği üzere aksonal demiyelinizasyon spinal kord travmasının belirgin patolojik özelliklerindendir. Travmayı takiben çeşitli büyüme faktörlerinin seviyesinde artışla birlikte yeni oligodendrositleri oluşturan mitotik aktivite artışı da izlenebilmektedir ki yapılan bazı çalışmalarda travmayı takiben 4. günde sahada oligodendrosit prekürsör hücreleri artışı gösterilmiştir(76). Oligodendrositlerin deneysel çalışmalarda veya hastalıkla ilişkili demiyelinizan hastalıklarda remiyelinizasyon yeteneği olduğu gösterilmiştir. Hatta bu bağlamda oligodendrosit prekürsör hücre transplantasyonu da deneysel olarak denenmiş ve transplante edilen sahada

demiyelinizasyonun düzeldiği de gösterilmiştir(65). Bu nedenle spinal kord hasarlanması tedavisi adına spinal kök hücre transplantasyonu çalışmaları büyük bir hızla birçok merkez tarafınca devam ettirilmektedir ve ilerde spinal kord travmasına ait hasarlanmanın tedavisinde çok önemli bir tedavi modalitesi kök hücre teknolojisi olacak gibi gözükmetedir(29, 85, 93, 112, 135).

Önceden de bahsedildiği üzere apoptosis sekonder spinal kord hasarlanmasında önemli mekanizmalardan birisidir(14, 15, 18, 132). Ratlarda spinal kord travma modellerinde artmış apoptosis ve caspase-3 aktivitesi gösterilmiştir (106, 36). Mikroglia ve oligodendrosit hücrelerindeki apoptotik ölümler beraberinde posttravmatik dönem iyileşme safhasında uygunsuz, bozuk myelinizasyonu ve bozuk aksonal transmisyonu da beraberinde getirecektir(124). Skt sonrası apoptotik hücre ölümlerine katkıda bulunan birçok yolak bulunmuştur. Bunlar; glutamat reseptör aktivasyonu, artmış hücre içi kalsiyum ve calpain(136), TNF-alfa(144, 145) veya hücre siklus düzenleyicilerinin ekspresyonunda değişiklikler(40) olarak sayılabilir. Yine Nesic ve arkadaşları 2001 yılındaki deneysel çalışmalarında proinflamatuvar sitokin IL-1 ekspresyonunda artış olduğunu ve bunun sonucu olarak IL-1 reseptörlerinin ve takiben de apoptosisin aktive olduğunu göstermişlerdir(106). Bu yolakların birkaçı veya hepsi hasarlı spinal kordda proapoptotik etkilerini apoptosis için anahtar regülatör olan Bcl-2 α protein ailesini düzenleyerek gösterebilirler. Deneysel spinal kord travması çalışmalarında ilk 24 saat içinde potansiyel proapoptotik transkripsiyonal değişiklikler bulunmuştur. Proapoptotik Bcl proteinleri (Bax, Bak ve Bid) sitokrom c salınımını indüklerken antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL mitokondri dış membranına tutunduklarında sitokrom c salınımını önlerler. Skt proapoptotik Bax artışına ve antiapoptotik Bcl-2, Bcl-w ve Bcl-xL mRNA azalmasına yol açmaktadır(107, 114, 136).

Yine bu mekanizmaların ışığında apoptozisi önlemek ve kordda oluşacak sekonder hasardan mümkün olduğunca nöronları ve gliayı korumak adına 17-beta östrodiol gibi, eritropoetin gibi bazı ajanlar da denenmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır(5).

Bu aşamada deneysel araştırmamızın temelini oluşturan ve sekonder hücre ölümünde temel mekanizmalardan birisi olan apoptozisi daha ayrıntılı tanımlamak uygun olacaktır.

2.3. APOPTOZİS

Hücre ölümü, apoptozis ya da nekroz ile gerçekleşmektedir. Nekroz, dışarıdan gelen uyarılarla plazma membranında oluşan değişiklikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Nekrotik hücrenin şişmesi ve plazma membranının parçalanması sonucunda sitoplazmik içerik, doku aralığına geçmektedir. Hücrenin nekrotik artıkları, inflamatuvar hücreleri dokuya çekerek bu dokunun parçalanmasına yol açmakta ve bu inflamasyon olarak bilinen olaya neden olmaktadır.

Diğer önemli hücre ölümü ise programlı hücre ölümü, yani apoptozisdir. Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerinin, çevredeki komşu hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı bir hücre ölüm şekli olarak tanımlanabilmektedir. Apoptotik hücre ölümü, hücrenin kendi genetik yapısında kodlanmış program sonucu oluşmaktadır. Bu programda, çok kontrollü bir seri olay sonucunda biyokimyasal ve morfolojik olaylar oluşmaktadır. Bu olay, aynı zamanda hücrenin intiharı olarak da adlandırılmaktadır ve dokulardaki hücre sayısını kontrol altında tutmak için en önemli sistemlerden birini teşkil etmektedir. Hücrelerin büyük çoğunluğu, üzerlerinde bulunan ölüm reseptörleri sayesinde hücre dışı ölüm sinyallerini işleyerek hücre içi apoptotik mekanizmayı

aktive etmektedirler. Her ne kadar bu genetik olarak programlanmış olay intrinsik faktörler ile kontrol edilmekte ise de aynı zamanda dışarıdan gelen ekstrinsik sinyaller de bu intihar yolunu uyarabilmektedir(6, 13, 138).

Apoptozis terimi, ilk kez İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Apoptotik süreç ilerledikçe, DNA'nın internükleozomal bölgelerinden 180–200 baz çifti veya bunun katları olacak tarzda kırılmalar gösterdiği ve kırılan bu DNA parçalarının agaroz jel elektrofrezinde merdiven görüntüsü oluşturduğu ifade edilmektedir. Bu bulgu apoptozisin ilk biyokimyasal kanıtı olarak literatüre geçmiş ve özellikle bu tarihten itibaren apoptozisle ilgili yapılan çalışmaların sayısında hızlı bir artış olduğu gözlenmiştir(13, 45, 138).

Apoptozis, yaşamın ayrılmaz bir parçası olup, hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda görülmektedir(12). Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetus implantasyonu, organogenez ve gelişim süreci boyunca apoptoz çok önemli rol oynamaktadır. Erişkinde menstruel siklusta endometriyum hücrelerinin yıkımı, menapozda follikül hücrelerinin atrezisi, laktasyonun bitimini takiben meme bezlerinin rejenerasyonunda yine apoptozis yer almaktadır. Deri ve GİS hücreleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarının azaltılmasında yine apoptozis rol almaktadır(30, 31, 79, 101, 111, 134).

Her saniye yaklaşık bir milyon hücre apoptozis ile vücuttan uzaklaştırılmakta ve bunların yerine yenileri yapılmaktadır. Yapım (mitozis) ve yıkım (apoptozis) arasında kontrollü bir denge vardır. Söz konusu olan bu dengenin apoptozis lehine veya aleyhine bozulması, birçok önemli hastalığın patogeneze katkıda bulunmaktadır(47, 120, 130). Apoptozis-mitozis arasındaki denge apoptozis lehine bozulursa, yani aşırı hızlanmış bir

apoptozis söz konusu olursa: AIDS, nörodejeneratif hastalıklar, IBDM ve miyokard infarktüsü gibi hastalıklar oluşmaktadır. Eğer denge mitozis yönüne kayarsa, yani apoptozis olması gerekenden daha az gerçekleşirse, bu durumda kanser meydana gelmektedir(1, 16, 45, 51, 67, 123).

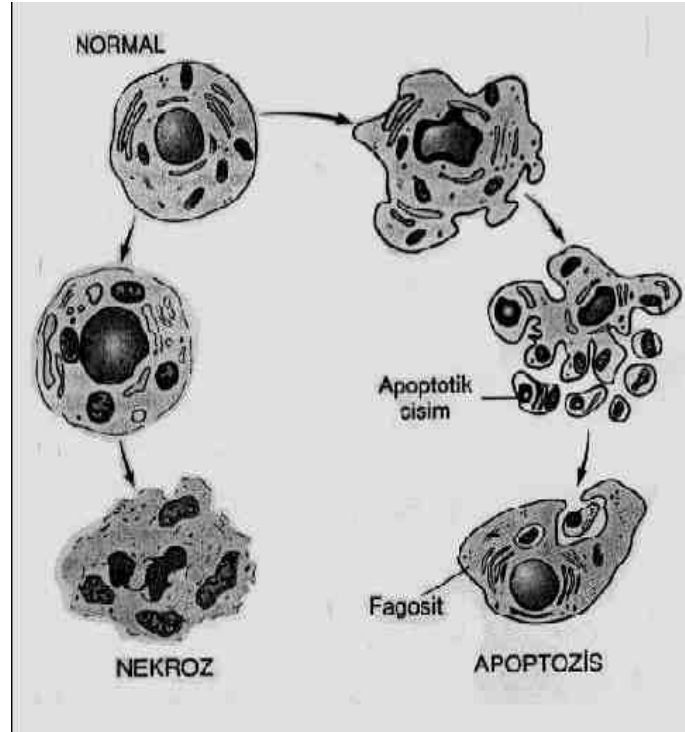
2.3.1. Nekroz ve Apoptozis Arasındaki Farklar

Apoptozis daha iyi anlamak için bir başka ölüm şekli olan nekroz ile kıyaslayarak incelemek daha doğru olacaktır(Tablo 1). Toksinler, şiddetli hipoksi, iskemi ve hipertermi gibi etkenler nekroza neden olurken; azalmış büyüme faktörü, hücre yaşlanması, hücre hasarı, düşük doz sitotoksik ilaçlar, hafif düzeyde travma, hipoksi ve iyonize radyasyon gibi etkenler ise apoptozise neden olmaktadır(11, 12, 139).

Morfolojik değişiklikler açısından apoptozis ve nekroz arasında önemli farklar bulunmaktadır. Nekroz patolojik bir ölüm şekli olmasına karşın, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilmektedir. Diğer bir ifadeyle, apoptozis, hem sağlıklıta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apoptozis, normal hücre döngüsünde rol alan bir hücre ölüm şekli olduğundan, lenfositlerin timustaki klonal seleksiyonunda ve inflamatuvar reaksiyon sonrasında ortamdan uzaklaştırılmasında, embriyonik gelişim sırasında, menstruasyon sırasında uterus duvarında gerçekleşen epitel doku dökülmesinde gözlenebilmektedir(12, 11, 79, 134, 139).

Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girişine bağlı olarak hücre şişmektedir. Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilip hücre yüzeyindeki mikrovillüsler ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkmakta, hücre yüzeyi yuvarlaklaşmakta ve apoptotik hücre nekrotik hücrenin tam tersine küçülmektedir (cell shrinkage)(11, 139).

Nekrozda membran, nekrotik süreç ilerledikçe parçalanmakta ve hücre içinden dışına doğru hücre içi materyalinin çıkışı gerçekleşmektedir. Oysa apoptozis sırasında membranda böyle bir durum söz konusu değildir; membranda küçük tomurcuklanmalar (blebbing) oluşmaktadır. Nekrozda kromatin hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzer olup, apoptotik hücrenin kromatininin ise nükleus membranının hemen altında yoğunlaştığı gözlenmektedir. Nekrotik hücre lizise uğramakta, oysa apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotic bodies) parçalanmaktadır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplı olup değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi yapılar içermektedirler. Nekrozda, hücre içeriği dış ortama salındığından inflamasyon reaksiyonu uyarılmakta, ancak apoptozisde apoptotik hücreler veya cisimcikler komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmamaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Nekroz ve apoptoziste görülen ultrastrüktürel değişiklikler dizisi (Wyllie ve ark. 1988)

Tablo I. Nekroz ve apoptozis arasındaki farklar

	<u>NEKROZ</u>	<u>APOPTOZİS</u>
Neden	Toksinler Şiddetli hipoksi İskemi Hipertermi vs.	Büyüme faktörü eksikliği Hücre yaşlanması Hücre hasarı Radyasyon vs.
Morfolojik Değişiklikler	Patolojik şartlarda gözlenir. Hücre şişer. Membran parçalanır. Kromatin nükleusun her yerinde yaygındır. Mitokondriyal değişiklik (+) Nekrotik hücre lizise uğrar. İnflamasyon (+)	Hem fizyolojik hem patolojik şartlarda gözlenir. Hücre büzüşür. Membranda tomurcuklanmalar oluşur. Kromatin nükleer membranın hemen altında yoğunlaşır. Mitokondriyal değişiklik (-) Apoptotik hücre membranla kaplı, içerisinde nükleus ve organelleri içeren apoptotik cisimciklere parçalanır. İnflamasyon (-)
Biyokimyasal Değişiklikler	ATP gerekmez (Pasif işlem) +4 C°'de gerçekleşir. DNA rastgele parçalanır.	ATP gerekir (Aktif işlem) +4 C°'de gerçekleşemez. DNA 180–200 baz çifti veya katları olacak şekilde kırılır ve bu DNA parçaları agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü verir. Fosfotidil serin translokasyonu (+) Apoptotik cisimcikler makrofajlarca fagosite edilirler.

Apoptozisin en önemli özgül yönünü, DNA'nın internükleozomal bölgelerinden 180–200 baz çifti veya bunun katları olacak tarzda kırılması oluşturmaktadır. Bu durum, agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Nekrozda ise DNA rastgele parçalanmaktadır(13, 47, 138).

Apoptotik süreç ilerledikçe, membranın iç yüzeyinde bulunan fosfatidil serinler membranın dış yüzeyine transloke olmaktadır. Dış yüzeye transloke olan fosfatidil serinler, özel boyalar yardımı ile (örn.annexin V) görünür hale getirilmekte ve apoptotik hücrenin normal hücreden ayrımı gerçekleştirilmektedir. Pasif bir işlem olan nekrozda ATP gerekli olmamakta, aktif bir işlem olan apoptozis de yüksek ATP seviyeleri gerekmektedir(4, 13, 35, 44, 47, 70, 82, 86, 89, 97, 122, 138). Hücre içi ATP seviyesi hücrenin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön vermektedir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir. Eğer mitokondri ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamamakta ve nekroz ile ölmektedir(99).

2.3.2.Apoptozis Mekanizmasında Yer Alan Moleküller

Apoptozisin mekanizmasında rol aldığı düşünülen aracı moleküller bulunmaktadır. Bunlardan ilkinin Bcl-2 gen ailesi oluşturmaktadır. Bcl-2 gen ailesi (B hücre lenfosit/lösemi-2), pro-apoptotik (Bax, Bid, Bim, Bad, Bak vs.) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) olmak üzere çok sayıda üye içermektedir. Hücrenin yaşayabilirlik durumu, bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin oranına bağlı olarak gerçekleşmektedir. Pro-apoptotik olanlar apoptozisi indüklemekte, anti-apoptotik olanlar ise apoptozisi baskılamaktadırlar. Bcl-2 gen ailesi üyelerinin yapısında merkezi konumda hidrofobik bir α heliks ve bunu çevreleyen 5 tane amfipatik α heliks bulunmaktadır. Bcl-2 gen ailesi üyeleri, yapılarında bulunan BH1,

BH2, BH3 domainleri bulunmakta, anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi de yer almaktadır. Bu bölgenin apoptozisin diğer hücresel yollarla ilişki kurmasında gerekli olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi üyelerinin, pek çok kanser türünde aşırı miktarda eksprese olduğunu da göstermektedir(4, 13, 20, 47, 50, 82, 120, 150).

Apoptotik mekanizmada rol alan bir diğer aracı molekül ailesini ise kaspazlar oluşturmaktadır. Kaspaz (caspase= cystein dependent aspartate–specific proteases) adı, enzimin katalitik aktivesinden gelmektedir. C, sistein proteaz aktivitesinden, aspase ise proteinlerin içindeki aspartik asitten sonraki kısımları parçalamasından dolayı verilmiştir. Kaspazlar, inaktif öncü moleküller olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir(47, 70, 122).

Kaspazlar, apoptotik süreçte birbirlerini aktifleyerek şelale tarzında reaksiyon dizisine neden olurlar. Kaspazların bazıları, başlatıcı kaspaz (kaspaz 2, 8, 9 ve 10), bazıları da efektör kaspazlar (kaspaz 3, 6, 7) olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, ölüm sinyallerini efektör kaspazlara iletirler. Efektör kaspazlar ise ilgili hücre iskelet proteini aktin, DNA tamirinde rol alan poli ADP riboz polimeraz gibi proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Kaspazlar indirekt olarak Ca^{+2} bağımlı endonükleazları aktive ederek DNA'da 180–200 ve katları olacak şekilde baz çiftine ayrılmasına yani fragmentasyonların oluşmasına neden olmaktadır(6, 26, 48, 150).

2.3.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptotik mekanizmaları, araştırma sonuçlarından ortaya çıkan teoriler olarak değerlendirmek daha doğru olacaktır çünkü hala birçok mekanizma tam olarak

aydınlatılamamıştır. Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular, apoptozisin gelişim sürecinde, gelen sinyalin hücre içi veya hücre dışı oluşuna göre değişen iki yolun etkili olduğunu düşündürmektedir(6, 12, 122, 150):

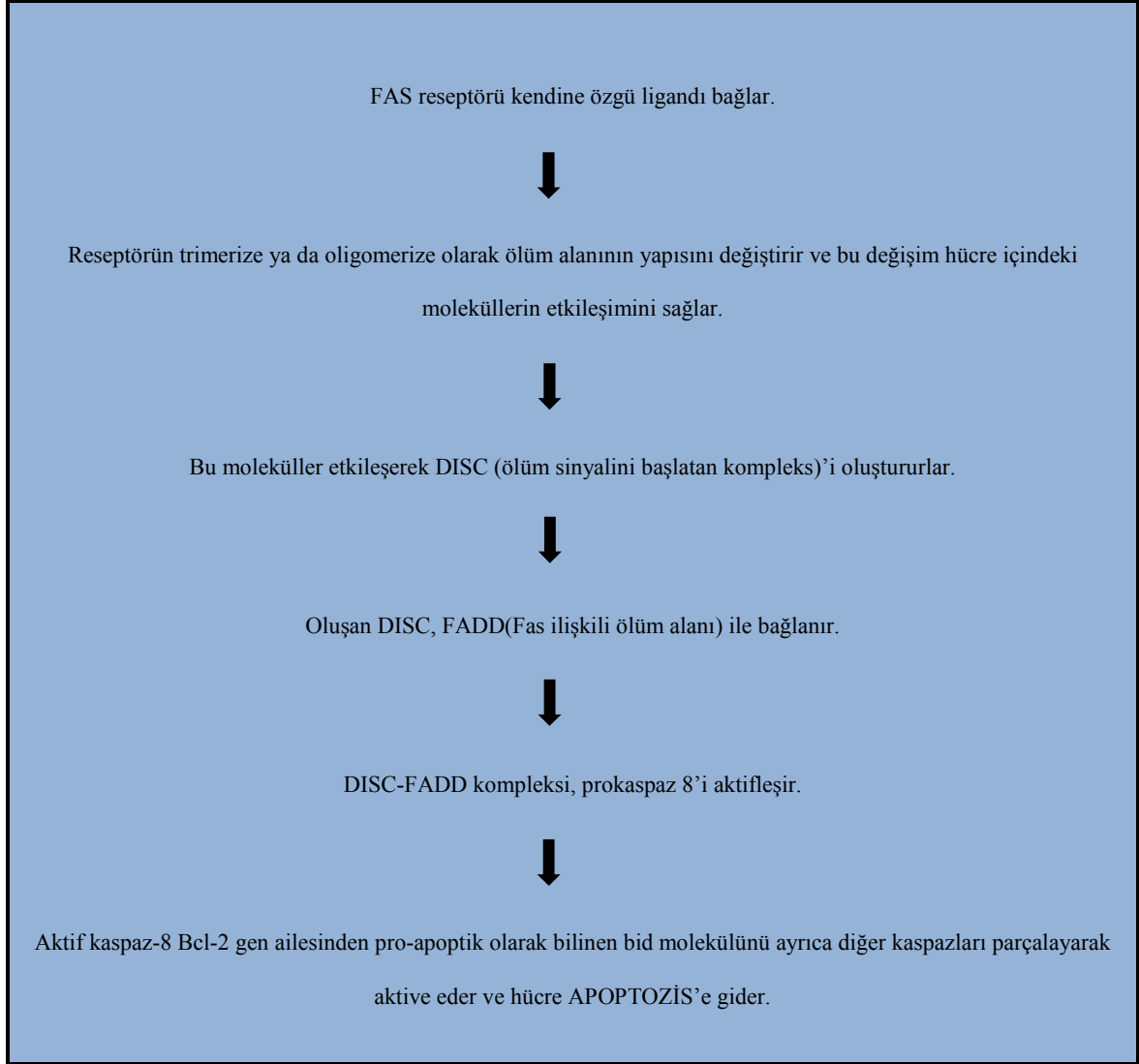
1. Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis (hücre dışı kaynaklı sinyal)
2. Mitokondri aracılı apoptozis (hücre içi kaynaklı sinyal)

2.3.3.a. Ölüm reseptörleri aracılı apoptozis

Hipoksi, hipertermi, radyasyon vs. gibi hücre dışı sinyaller, plazma membranındaki ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptotik süreci başlatmaktadırlar. Apoptoziste rol alan membran proteinleri içinde en önemli grubu TNFR (tumor necrosis factor receptor) ailesi oluşturmaktadır. TNFR ailesi içerisinde apoptozis oluşturan reseptörlerin en önemlileri FAS (CD-95) ve TNFR-1' dir. Son yıllarda DR-3, DR-4 ve DR-5 gibi başka ölüm reseptörleri de tanımlanmıştır. Ölüm reseptörlerinin, sisteinden zengin hücre dışı alanları ve sitoplazmanın iç kısmında homolog ölüm alanları (death domain) bulunmaktadır. Ölüm reseptörleri kendilerine özgü ligandı bağladıkları zaman, sitoplazmanın iç kısmında bulunan parçaları apoptotik mekanizmayı uyarır ve hücre dışı alandan gelen uyarı ölüm alanları ile hücre içine iletilmiş olur(56, 57, 71, 72, 88,131, 150). (Şekil 2)

2.3.3.b. FAS (CD-95) reseptörü aracılı mekanizma

FAS reseptörü 3 bölümden oluşmaktadır. Hücre dışı, membranöz ve hücre. Bu ölüm reseptörü, kendine özgü ligandı bağladığı zaman reseptörün ölüm alanı kısmı, apoptotik mekanizmayı uyarır ve hücre dışı alandan gelen uyarı hücre içine iletilmiş olur(72). (Tablo 2)

Tablo 2. Fas reseptörü aracılı apoptotik mekanizma

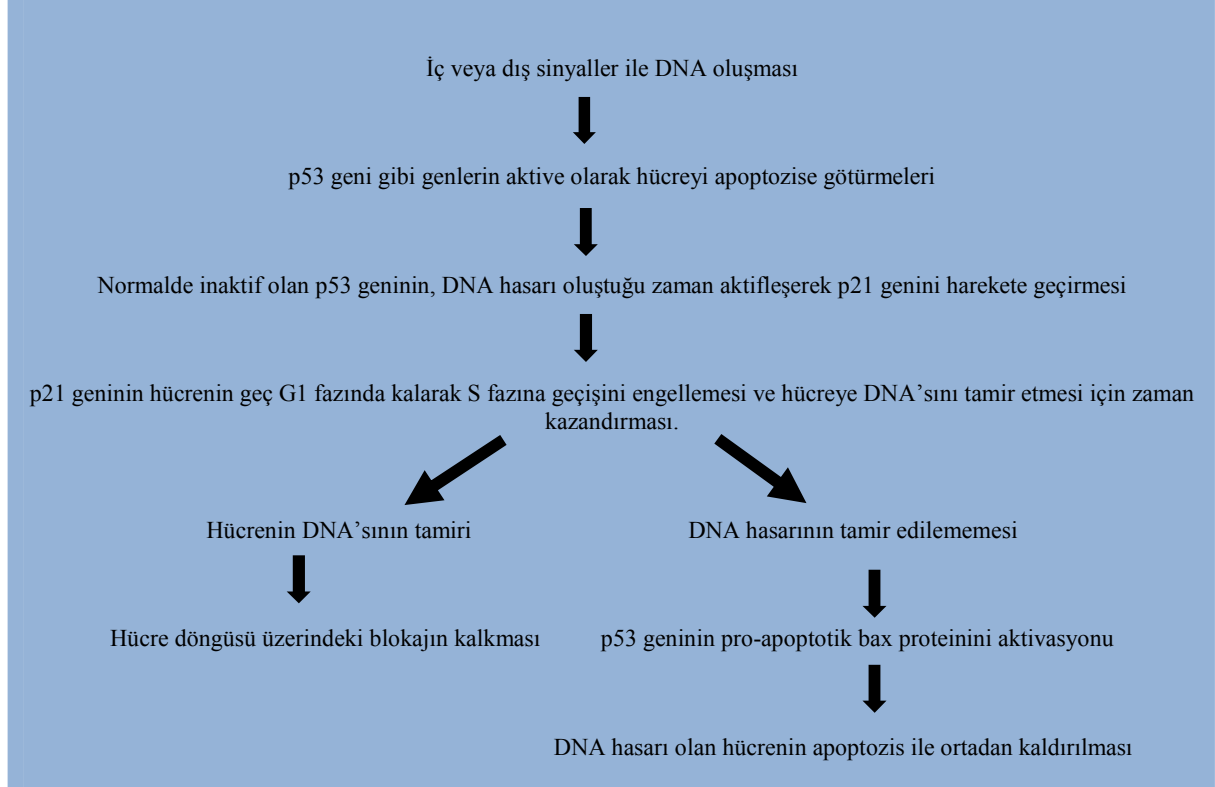
2.3.3.c. Mitokondri aracılı apoptozis

Hücre içinden kaynaklanan sinyallerde mitokondri önemli rol oynamaktadır. DNA hasarı, pH'da düşme, hücre döngü bozuklukları hücre içi kaynaklı sinyalleri oluşturmaktadır. Mitokondri dış zarının geçirgenlik artışı, hücre içi sinyaller ve bazı proteinler (Bcl-2 gen

ailesi) ayarlamaktadır. Bcl-2 gen ailesi üyelerinden pro-apoptotik olarak bilinen bax proteini, sitozolde bulunmakta ve apoptotik uyarı alınmasını takiben mitokondri membranına bağlanmaktadır. Burada küçük delikçiklerin oluşumunu indüklenerek seçimli iyon geçirgenliği bozulmakta ve sitokrom-c ile apoptosis indükleyici factor mitokondriden sitoplazmaya salınmaktadır. Sitoplazmaya salınan sitokrom-c, sitoplazmik bir protein olan Apaf-1' e bağlanmakta ve yapıya ATP' nin ve prokaspaz 9' un eklenmesiyle apoptozom adlı kompleks oluşmaktadır. Daha sonra prokaspaz 9, aktif kaspaz 9' a dönüşerek efektör kaspazlardan prokaspaz 3' ü aktiflemekte ve hücre apoptozise gitmektedir. Sitokrom-c' nin, mitokondriden sitozole salınımı, apoptozisin geriye dönemeyen bir döneme girdiğinin göstergesi olarak görülmektedir(47, 70, 96, 97, 98, 150). (Şekil 2)

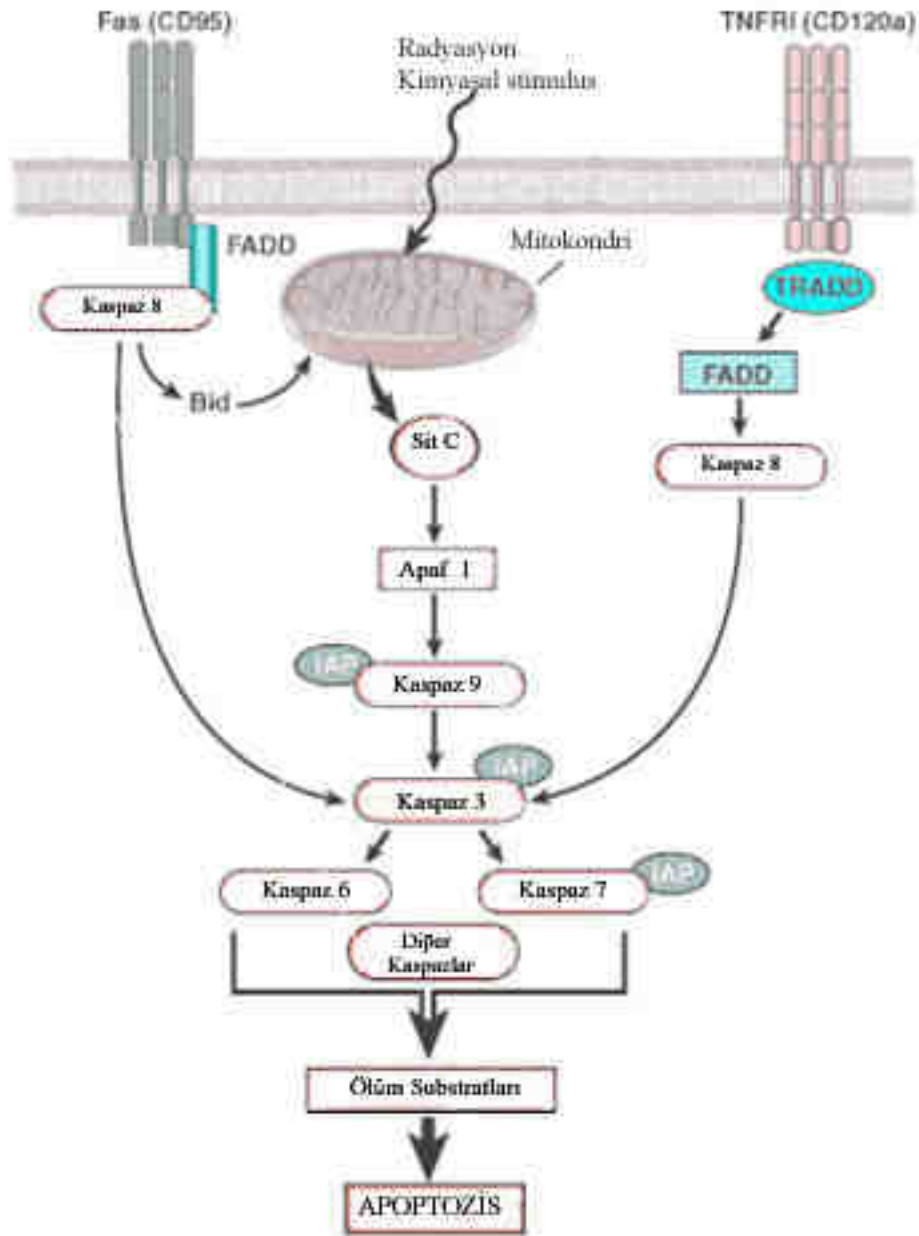
2.3.3.d. p53 gen aracılı apoptozis

İç ve/veya dış sinyaller ile DNA'da hasar oluştuğunda, bazı genler aktive olarak hücreyi apoptozise götürmektedir. Bunların en önemlisi p53 genidir. Normalde inaktif olan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirmektedir. p21 geni de hücrenin geç G1 fazında kalarak S fazına geçişini engelleyerek hücre döngüsünde blokaj yapmaktadır. Buradaki amaç, hücreye DNA' sını tamir edebilmesi için zaman kazandırmaktadır. Bu süre içerisinde, hücre DNA'sını tamir edebilir ise, hücre döngüsü üzerindeki blokaj kalkmaktadır. Eğer bu süre içerisinde, DNA hasarı tamir edilemez ise, p53 geni tekrar harekete geçerek, Bcl-2 gen ailesi üyelerinden pro-apoptotik olarak bilinen bax proteinini aktive etmekte ve hücreyi apoptozise götürerek DNA' sını hasarlı hücreyi ortadan kaldırmaktadır(17, 50, 109)(Şekil 3).



Şekil 2. p53 gen aracılı apoptozis

APOPTOZİS MEKANİZMALARI



Şekil 3. Ölüm reseptörleri aracılı ve mitokondri aracılı apoptozisin şematik görünümü (Keane RW, 2001)

2.3.4. Günümüzde Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi saptamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Oysa günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanısıra apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandığı görülmektedir. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştigi bulunmasıyla kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. Apoptozis'in belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etmektedir.

Fakat bu sınıflama çeşitli şekillerde yapılabilmektedir. Yani, yöntem türünden ziyade apoptozise özgü herhangi bir hücresel olayın/aktivitenin belirlenmesi esas alınarak değerlendirme yapılabilmektedir. Örneğin, apoptozis DNA fragmentasyonu esas alınarak saptanacaksa o zaman yukarıda sıralanan metodların bir veya birden fazlası kullanılabilir. Çünkü DNA fragmentasyonu histokimyasal olarak gösterilebileceği gibi, biyokimyasal olarak da, hatta ELISA ile de gösterilebilmektedir. Bu ayrımda önemli olan noktayı çalışılacak numunenin cinsi oluşturmaktadır. Hücre kültürü yapılarak elde edilen bir numune ise, biyokimyasal bir yöntem olan agaroz jel elektroforezi yapılabilmekte, eğer bir dokudaki DNA fragmentasyonları (apoptotik hücreler) araştırılıyorsa o zaman da

histokimyasal bir yöntem olan TUNEL yöntemi kullanılabilmektedir. TUNEL yöntemi DNA fragmentasyonlarının insitu olarak tanınmasını sağlamaktadır(27).

Apoptozis ile ilgili çalışmalar hızla artmasına karşın apoptozisi saptamak ve değerlendirmek pek kolay olmamaktadır(121). Özellikle tek bir hücrede apoptozis olayı saatler içinde geliştiğinden, apoptotik süreçteki hücreyi morfolojik olarak tanımlamak ve kantifiye etmek zor olmaktadır. Genellikle çalışmaların güvenilirliğini arttırmak için farklı yöntemlerin birkaçının bir arada kullanılması önerilmektedir. Apoptozisin saptanmasında kullanılan yöntemleri ana başlıklar halinde özetlemek gerekirse;

2.3.4.a. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

- ✓ Işık mikroskobu kullanımı
- ✓ Floresan mikroskobu-Lazerli konfokal mikroskobu kullanımı
- ✓ Elektron mikroskobu kullanımı
- ✓ Faz kontrast mikroskobu kullanımı

2.3.4.b. İmmunohistokimyasal Yöntemler

- ✓ Anneksin V yöntemi
- ✓ TUNEL yöntemi
- ✓ M30 yöntemi
- ✓ Kaspaz 3 yöntemi

2.3.4.c. Biyokimyasal Yöntemler

- ✓ Agaroze jel elektroforezi
- ✓ Western blotting yöntemi
- ✓ Flow sitometri

2.3.4.d. İmmunolojik Yöntemler

- ✓ ELISA
- ✓ Fluorimetrik yöntem

2.3.4.e. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

- ✓ DNA microarray

2.3.4.a. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

2.3.4.a.1. Işık Mikroskobu Kullanımı:

A. Hemotoksilen Boyama: Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanını hemotoksilen ile boyama oluşturmaktadır. Hemotoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metot olarak başlanması uygun olup ve çeşitli açılardan (örneğin ilk değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlamaktadır.

Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilmektedir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi

bir boyanma yapılmışsa kolayca gözlenebilmekte, fakat yine de deneyim gerektirmektedir. Çünkü bazı durumlarda mitotik hücreler ile apoptotik hücreler karıştırılabilmektedir. Hücre küçülmesi, sitoplazmik küçülme, kromatin kondanse olarak nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi gözlemlenebilen değişiklikler arasında yer almaktadır.

B. Giemsa Boyama: Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nukleus morfolojisi esas alınarak hücreler tanımlama yapılmaktadır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü bulunmamaktadır.

2.3.4.a.2. Floresan Mikroskobu-Lazerli Konfokal Mikroskobu Kullanımı:

Floresan maddelerin (örneğin Hoechst boyası, propidium iyodür) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şekli olarak karşımıza çıkmaktadır. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nukleusu görünür hale gelmektedir.

Floresan sistemler ışık mikroskobuna göre çok daha pahalı teknikler olarak bilinmektedir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırsa, canlı hücre ile ölü hücrenin ayırımına olanak tanımaktadırlar. Oysa hematoksilen ya da giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü hücreleri boyayabilen bir boya (örneğin Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örneğin propidium iyodür) beraber kullanılmaktadır. Bu boyama yöntemlerindeki prensip, canlılığın belirleyicisi olarak hücrenin plazma membranının intakt olup olmadığı temeline dayanmaktadır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü

bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlamaktadırlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanımlanabilmektedirler. Kuşkusuz, bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilen ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nukleus morfolojisine bakılarak yapılmaktadır. Kromatin kondansasyonu veya nukleus fragmentasyonu olan hücreler apoptotik hücreler olarak tespit edilmektedir.

2.3.4.a.3. Elektron Mikroskobu Kullanımı:

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem (gold standard) olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği yöntem olarak bilinmektedir. Üstelik mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nucleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilmektedir. Elektron mikroskobu çalışmalarında, nukleus fragmentasyonu net olarak izlenebilmekte, apoptotik hücrede normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir.

2.3.4.a.4. Faz Kontrast Mikroskobu Kullanımı:

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılmaktadır.

2.3.4.b. İmmünohistokimyasal Yöntemler

2.3.4.b.1. Anneksin V yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olmaktadır. Dış yüze transloke olan PS' ler, floresan bir madde (örn. F1TC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilmekte ve böylece apoptotik hücreler saptanmış olmaktadır.

2.3.4.b.2. TUNEL yöntemi:

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlamaktadır. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilmektedir.

2.3.4.b.3. M30 yöntemi:

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenmektedir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden epitelyal kaynaklı dokularda kullanılması mümkün olmaktadır.

2.3.4.b.4. Kaspaz-3 yöntemi:

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 belirlenebilmektedir. Apoptotik hücreleri bu metodla tespit edilebilmek için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3' ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir.

2.3.4.c. Biyokimyasal Yöntemler

2.3.4.c.1. Agaroj jel elektroforezi:

DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntem olarak bilinmektedir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen internukleozomal bölgelerden kırıldığı için merdiven görüntüsü ("ladder pattern") oluşmaktadır. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliği olup nekrozda görülmemektedir. Bu nedenle, apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biri olarak düşünülmektedir.

2.3.4.c.2. Western blotting yöntemi:

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkün olmaktadır. Sitokrom c' nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilmektedir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılmaktadır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c' nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılmaktadır.

2.3.4.c.3. Flow sitometri:

"Flow" sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkün olmakta ve böylece apoptotik hücreler belirlenebilmektedir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozisin saptanmasında kullanışlı bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. İki farklı şekilde uygulanmaktadır:

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodür kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemleri kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarı kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptosis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu (sub-G1 piki) tayin edilmektedir. İkincisinde, floresan mikroskopuyla uzun zaman alan sayma işlemi saniyeler içinde yapılarak sonuç alınmaktadır.

2.3.4.d. İmmunolojik Yöntemler

2.3.4.d.1. ELISA:

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunun tespiti, aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkün olmaktadır.

2.3.4.d.2. Fluorimetrik yöntem:

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntem olarak bilinmektedir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulmakta, ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilmektedir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanmaktadır.

2.3.4.e. Moleküler Biyoloji Yöntemleri:

2.3.4.e.1. DNA microarray:

DNA "microarray" teknolojisinin henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntem olduğu ifade edilmektedir. Fakat yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA' larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır.

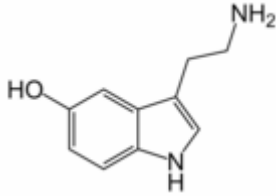
2.3.5. Apoptozisin Yarını

Oldukça yeni bir kavram olan apoptozis yaşamın sürdürülmesinde temel mekanizma olarak görülmektedir ve bu yüzden etiyolojisini tam olarak açıklayamadığımız pek çok hastalığın aydınlatılmasında ve belki de tedavisinde ileride anahtar rol oynayabilecektir. Apoptozisin rol oynama potansiyeli olan konular arasında;

1. Malignite patogenezi ve etyolojisinin tanımlanması,
2. Kanseri gelişecek kişilerin önceden saptanması,
3. Kanseri tedavisi,
 - a) Gen tedavisi, apoptozisi aktive eden kemoterapi, hormon tedavisi
 - b) Tümörün tedaviye vereceği yanıtın saptanması (apoptozis indeksi, apoptoziste etkin genlerin saptanması)
4. Hücre yaşlanması ve dolayısıyla yaşlanmanın önlenmesi,
5. Dejeneratif ve otoimmün hastalıklar ve astım tedavisinde yeni yöntemlerin geliştirilmesi,
6. AIDS' de apoptozisin önlenmesiyle immün baskılama sağlanması sayılabilir

2.4. SEROTONİNERJİK YOLAKLAR VE APOPTOSİS

2.4.1. Serotonin



Serotoninin (5-hidroksitriptamin) saptanmasından önce, kan pıhtılaşmaya bırakıldığında pıhtıdan vazokonstriktör bir maddenin serbestleştiği bilinmekteydi. Bu maddeye serum tonik faktör anlamında **serotonin** adı verilmiştir. Bağımsız bir çalışmada, 1937 yılında, Vittorio Erspamer ve arkadaşları ince barsak mukozasında bir düz kas uyarınının varlığı göstermiştir ve bu madde **enteramin** olarak isimlendirilmiştir. 1951’ de 5-HT’ in sentezi, 5-hidroksitriptofanın serotonin ve enteraminin metaboliti olduğunu göstermeye imkân sağlamıştır. Böylece ikisinin aynı madde olduğu anlaşılmıştır. Filogenetik olarak serotoninin antik çağlara kadar uzandığı, serotonine yüksek affiniteli olan 5-HT₁ reseptör tipinin ise 750 milyon yıldır var olduğu speküle edilmiştir(61, 113).

Serotonin pineal bezde melanosit stimüle edici bir hormon olan melatoninin prekürsörü olarak görev yapar. Memelilerde vücut serotonininin %90’ ından fazlası gastrointestinal sistemdeki enterokromafin hücrelerde bulunmaktadır. Kandaki serotonin, noradrenerjik ve serotoninerjik sinir uçlarının veziküllerindekine benzer şekilde bir aktif taşıyıcı mekanizma aracılığıyla amini konsantre etme yeteneği olan trombositlerde bulunur. Serotonin sentezleyen ve depolayan triptaminerjik (serotoninerjik) nöronların hücre gövdelerini içeren beyin sapı raphe çekirdeklerinde de bulunur. Serotonin; kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, solunum sistemi ve sinir sistemi üzerine birçok önemli etkisi

mevcuttur. Serotonin ilaç olarak kullanılmaz, ancak sinirsel up-take blokerleri (SSRI), serotonin salıcıları, agonist ve antagonistleri, çok çeşitli hastalığın tedavisinde kullanılmaktadırlar(61).

2.4.2. Sentez, Biyotransformasyon ve Eliminasyon

5-HT, serotonerjik sinir uçlarında ve trombosit hariç diğer hücrelerde sentez edilir. 5-HT biyosentezi, diyetle alınan L-triptofan amino asidinden başlar. 5 numaralı karbon, triptofan hidroksilazla (TPH) hidroksillenerek 5-hidroksitriptofan oluşur. Hız kısıtlayıcı enzim olan TPH'nin iki izoformu, TPH1 ve TPH2, sırasıyla periferde ve serotonerjik sinirlerde tanımlanmıştır. Her iki izoform da fenil alanin hidroksilaz ve tirozin hidroksilaz gibi, aromatik amino asid gen familyasına aittir. Bazı çalışmalarda, antisosyal kişilik bozukluğu, alkolizm, bipolar bozukluk, major depresyon ve intihara eğilim gibi psikiyatrik hastalıklarla TPH1 gen varyasyonlarının ilişkili olduğu iddia edilmiştir(95).

5-hidroksitriptofan beyinde belirlenemez, hızlı bir şekilde, vücutta yaygın olarak bulunan aromatik L-amino asid dekarboksilaz ile dekarboksillenerek 5-hidroksitriptamine dönüşür ve kendine özgü sitoplazmik veziküllerde depolanır. Serotonin enterokromaffin hücrelerden ve serotonerjik sinir uçlarından parsiyel ekzositozla salıverilir. Sinaptik aralıktan 5-HT' e yüksek affiniteli taşıyıcı ile sinir ucuna geri alınmak suretiyle etkisi sonlandırılır (az bir kısmı da difüzyon, ektranöronal up-take ve biyotransformasyona uğrar). SSRI ilaçların ve bazı trisiklik antidepresan ve nörotoksik bileşiklerin hedef yeri olan bu taşıyıcı, 5-HTT veya SERT olarak isimlendirilir. Yetişkin beyinde raphe sinirlerinde 5-HTT ekspresyonu yapılmaktadır. Yapısal 5-HTT gen varyasyonlarının anksiyete bozukluğu, madde bağımlılığı,

yeme bozukluğu, otizm, şizofreni ve bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğuna dair veriler mevcuttur(60, 95).

Serotonin esas olarak hücrelerde iki basamakta, mitokondriyel MAO A ve MAO B ile metabolize edilerek 5-hidroksiindolasetik aside (5-HİAA) yıkılır. MAO A izoformu özellikle 5-HT ve noradrenalin, MAO B ise öncelikle dopamini yıkar. Her iki izoform da mitokondrilerin dış yüzünde bulunur. Trombositlerde bulunan form, MAO B izoformudur. İlk basamakta, serotonin MAO ile noradrenalin ve dopamin gibi hücre tipine spesifik şekilde oksidatif deaminasyonla 5-hidroksiindolasetaldehide, takiben aldehid dehidrojenazla 5-HİAA'ye yıkılır. 5-hidroksiindolasetaldehidin önemsiz miktarları ise alternatif bir yol olan aldehid redüktazla, alkol 5-hidroksitriptofole indirgenir. 5-HİAA'nın beyinden aktif transportla atılımı, nonspesifik aktif transport inhibitörü probeneside duyarlıdır. Normal kişilerde 5-HİAA'nın idrarla atılan miktarı 2–10 mg/gündür, bu miktar karsinoid sendromlu hastalarda çok yükselir(68).

5-HT'nin metabolizmasındaki diğer minör yollar, *O*- ve *N*-metilasyondur. 5-HT, *N*-metilasyonla bir endojen psikotropik madde olan 5-hidroksi-*N,N*-dimetiltriptamine (bufotenin) dönüşür. Diğer metillenmiş indolaminler olan, *N,N*-dimetiltriptamin ve 5-metoksi-*N,N*-dimetiltriptamin daha aktif halusinojenik ajanlardır ve muhtemelen endojen psikomimetiklerdir(68). Serotonin, pineal bezde melatonin prekürsörü olarak işlev görür, önce 5-HT-*N*-asetilazla *N*-asetil-5-HT'e, daha sonra hidroksiindol *O*-metiltransferazla melatonine dönüşür. Besinlerle alınan triptofanın az bir kısmı niasine dönüşür. Serotonin özellikle enterokromaffin hücrelerde, trombositlerde ve santral sinir sisteminde (SSS) yoğun olmak üzere birçok dokuda bulunur(61).

2.4.2.a. Enterokromaffin hücreler: Serotonin'in yaklaşık %90'ı, mide ve barsak duvarındaki (duodenumda yoğun olmak üzere) mukoza hücreleri arasına dağılmış olan enterokromaffin hücrelerde sentez edilir ve depolanır. Dolaşımdaki serotoninin esas kaynağı olan enterokromaffin hücreler, histolojik ve embriyolojik açıdan APUD hücrelerinin bir tipidir ve embriyolojik olarak nöral krista veya nöroektodermden kaynaklanırlar. Bu hücrelerde vazodilatör peptid, P Maddesi ve diğer kininler de sentezlenmektedir. Yemek yeme ya da hipertonik sıvı uygulanmasıyla oluşan mekanik gerilim ve vagus stimülasyonu sonucu enterokromaffin hücrelerden 5-HT salınımı olur. Salıverilen 5-HT primer afferent sinir uçlarını uyararak peristaltik refleksi başlatır ve barsak dolaşımı ve tonusunu düzenler. Böylece, mekanik ve kimyasal uyarılara cevap veren bu hücreler, 5-HT aracılığıyla gastrointestinal işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Barsak dolaşımından portal vene geçen serotonin, karaciğerde MAO-A tarafından büyük ölçüde metabolize edilir. Geriye kalan 5-HT, akciğer kapillerlerinin endotel hücreleri tarafından alınarak, MAO'la hızlı bir şekilde yıkılır. Serotonin enterokromaffin hücreleri dışında, enterik sinir sistemindeki bazı sinirlerde de bulunur. Bu sistemi oluşturan myenterik plexus ve submukozal plexustaki sinirlerin bir kısmı serotonerjik sinirlerdir. Bu hücrelerden kaynaklanan tümöre **karsinoid tümör** denir. Bu tümörde primer odak genellikle gastrointestinal sistemdedir. Karsinoid tümörlü hastalarda 5-HT sentez ve salınımı aşırı derecede artmıştır. Bu hücrelerden, 5-HT dışında histamin, P maddesi ve çeşitli vazoaaktif maddeler de salıverilir. Salıverilen bu maddeler, nöbetler tarzında gelen; yüzde kızarma, hipo- veya hipertansiyon, bronkospazm, kolik ve diyare gibi belirtilere neden olurlar. Bu hastalarda çok büyük miktarlarda serotonin sentezlenmesinden dolayı, niyasin ve triptofan eksiklik belirtileri de görülür. Tedavide 5-HT antagonistleri yararlıdır. Dumping sendromu' nun etyolojisinden de bu hücrelerden aşırı miktarda salgılanan serotonin ve diğer vazoaaktif maddeler sorumlu tutulmaktadır.

Gastrektomi yapılmış hastalarda yemek sonrası nöbetler halinde gelen; vazomotor deri bulguları, diyare ve hipotansiyonla karakterize bir tablodur. Tedavisinde serotonin antagonistlerinden yararlanılmaktadır(61).

2.4.2.b. Trombositler: Çekirdeksiz hücreler olan trombositler serotonin sentezleyemezler, Na^{+} a bağımlı aktif transportla dolaşımdan alarak sekretuar granüllerde depo ederler. Serotonin trombositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve bu hücrelerin homeostazisinde önemli rol oynar. Bu hücreler, özellikle konsantrasyonun nispeten yüksek olduğu intestinal dolaşımdan geçerken serotonin uptake' i yaparlar. Trombositler, hasarlanmış endotelle temas ettiklerinde, serotoninle birlikte, tromboksan A_2 , ADP ve trombin gibi endojen vazoaktif maddeler de salıverirler. Salıverilen serotonin lokal vazokonstriksiyon oluşturarak ve trombosit agregasyonuna neden olarak kanamanın durmasına yardımcı olur(116).

2.4.2.c. Santral Sinir Sistemi: Serotonerjik sinirler esas olarak beyin kökünde, 9 çekirdekten oluşan raphe sisteminde bulunurlar. Raphe sisteminden çıkan yoğun projeksiyonlar hipokampus, hipotalamus ve limbik sistem gibi çeşitli beyin bölgelerine, serebellum, medulla ve omuriliğe yayılır. Raphe retiküler sinirlerinin, kan damarları ile de sıkı ilişkileri vardır.

Santral serotonerjik nörotransmitter sistemin önemli işlevlerine rağmen 5-HT sinirlerinin gelişimi hakkındaki bilgilerimiz sınırlıdır. Ancak serotonerjik sinir fenotipinin gelişmesinde, serotoninin kendisi kadar bazı nörotrofinlerin ve büyüme faktörlerinin de rol

oynadığı düşünülmektedir. Bu faktörler arasında, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (Brain-derived neurotrophic factor-BDNF), dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), kemik morfogenetik protein (BMP), silyar nörotropik faktör (CNTF) sayılabilir. Ayrıca moleküler mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte sinir hücresi adezyon molekülünün (NCAM) de serotonerjik sinirlerin modülasyonuna, özellikle 5-HT_{1A} reseptörleri aracılığıyla katılımının olduğuna dair veriler vardır(9, 33).

Anatomik özelliklerine göre serotonerjik sinirler, mekanoreseptör veya kemoreseptör işlevi görürler. Raphe sinirlerinin çeşitli sinirsel ya da sinirsel olmayan uyarılara cevap verebilme ve değişebilme özellikleri nedeniyle nöral doku homeostazisinde anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu sinirler, dış uyarılara cevaben kendilerini devamlı şekilde modifiye ederler. Örneğin serotonerjik sinir hücre cisimlerinin boyutları, hayvanın hormonal durumuna bağlı olarak değişebilmektedir. Adrenalektomili hayvanlarda tüm raphe sinirlerinin küçüldüğü ve incelendiği, deksametazon uygulandığında ise somaların tekrar büyüdüğü ve 24–72 saat gibi kısa bir süre içinde, triptofan hidroksilaz immünoreaktif sinir hacimlerinin yaklaşık %80 arttığı gösterilmiştir. Serotonin seviyelerindeki dalgalanmalar beynin her bölümüne iletilir ve SSS'nin yapı ve işlevinin stabilizasyonu ve integrasyonu için dinamik bir süreç oluşturur. Serotonerjik sinirlerde bulunan major enzimler, triptofan hidroksilaz ve L-amino asid dekarboksilazdır. Bu sinirlerin MAO A, MAO B ve ayrıca nitrik oksid (NO) üretimi için gerekli enzimlerden biri olan NADPH diaforaz da içerdikleri gösterilmiştir. Raphe serotonerjik sinirleri çeşitli nöropeptidler de içerirler. Raphe Magnus çekirdeğinde ilk olarak P maddesi tanımlanmış, daha sonra eksitator nörotransmitter glutamatın, bu sinirlerde serotonin ve P maddesi ile eş lokalize olduğu gösterilmiştir. Takiben serotonerjik sinirlerin kalretinin, galanin, enkefalin, N-acetyl-aspartyl-glutamate (NAAG), nöropeptid Y (NPY), anjiotensin II ve tirotropin salıverici hormon (TRH) içerdiği gösterilmiştir(9, 42).

Serotonin SSS'nde, bir kısmı halen tartışılan çok çeşitli farmakolojik etkiye aracılık eder; elde edilen yeni bilgiler de yeni soruları beraberinde getirmektedir. Serotonerjik sistem, agresyon, korku, anksiyete gibi duygulanımın düzenlenmesinde major modülatördür; kognitif işlevler, duyu algılanması ve motor etkinlik gibi karmaşık beyin işlevlerinin integrasyonunda da önemli rol oynamaktadır. Bu işlevlere katılan çok sayıda nörotransmitterin etkileşiminde adeta orkestra şefi gibi görev yaptığı düşünülmektedir. Birçok psikiyatrik hastalığın fizyopatolojisine katılımı olduğu, özellikle anksiyete bozukluğunda anahtar rol oynadığı bildirilmiştir. Postsinaptik 5-HT_{1A} reseptörlerin uyarılmasının anksiyeteye, presinaptik 5-HT_{1A} reseptörlerin uyarılmasının ise anksiyolitik etkiye neden olduğu gösterilmiştir(95). İntihar etmiş major depresyonlu hastaların beyin serotonin düzeyinin ve 5-HT_{1A} reseptör sıklığının azaldığı gösterilmiştir. Şizofreni tedavisinde kullanılan klopazin, quetiapin ve risperidon gibi atipik nöroleptikler, 5-HT_{2A} ve 5-HT_{2C} reseptörlerini de antagonize ederler. Ayrıca 5-HT₃ reseptör antagonistlerinin de antipsikotik etkiye sahip oldukları iddia edilmiştir(84).

Serotonerjik sistem, kolinerjik sistemle de etkileşir ve serotonerjik etkinliğinin artması myoklonusa neden olur. Esansiyel tremorun ise serotonerjik etkinliğin azalmasına bağlı olduğu iddia edilmektedir(84). Ayrıca Parkinson hastalığında görülen tremorun da serotonerjik reseptör kaybı ya da disfonksiyonu nedeniyle serotonerjik transmisyonun yetersizliğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir(41).

Serotonin muhtemelen 5-HT_{2A} ve/veya 5-HT_{2C} reseptörleri aracılığıyla bellek ve öğrenmeyi artırmaktadır. Şiddetli demansla karakterize Alzheimer hastalığında beyinde 5-HT_{2A} reseptör sıklığının azaldığı bulunmuştur(84).

Serotonin uyku fizyolojisinde de rol oynadığı ve serotonin azlığının uykusuzluğa neden olduğu gösterilmiştir. Uyku-uyanıklık döngüsünün major transmitteri olan oreksinlerle (diğer adlarıyla hipokretinler) serotoninin etkileşimine dair kanıtlar vardır. Serotoninin

oreksin sinirlerinde hiperpolarizasyon oluřturduėu, noradrenerjik sistemle birlikte oreksin sinirleri üzerinde negatif feedback kontrollerinin olduėu dűőűnűlmektedir(143).

Serotonin, presinaptik 5-HT_{1A} ve postsinaptik 5-HT_{2C} ve 5-HT_{1B} reseptűrleri aracılıėıyla beslenme davranışını dűzenler ve doyunluk merkezini uyarır. İřtah açıcı en űnemli nűropeptidlerden biri olan NPY ile serotoninin zıt etkili olduėu gűsterilmiřtir. Serotonin agonistlerinin hipotalamik NPY miktarlarını azalttıėı ve NPY'e baėlı beslenmeyi baskıladıėı bildirilmiřtir. Ayrıca kansere baėlı inatçı anoreksinin geliřmesinde ventromediyal hipotalamik çekirdekteki (VMH) serotonerjik sinirlerin űnemli rol oynadıėı, kanser esnasında beyin triptofan dűzeyinin ve dolayısıyla beyindeki ve beyin omurilik sıvısındaki serotonin dűzeylerinin arttıėı gűsterilmiřtir. Kansere baėlı olarak geliřen anoreksi-kařeksi sendromunda rol oynayan en űnemli sitokin olan interlűkin-1 (IL-1) ile VMH serotonerjik sistem arasındaki yakın iliřki de bu hipotezi desteklemektedir. IL-1'in periferel yoldan uygulanması beyin triptofan ve serotonin dűzeylerini artırırken, santral yoldan uygulanması serotonin salınımına neden olmaktadır(75).

Serotonerjik sinirlerin 5-HT_{1B} ve 5-HT₃ reseptűrleri aracılıėıyla omurilik seviyesinde sinaptik inhibisyon ve bűylece analjezi (antinosisepsiyon) oluřturdukları bulunmuřtur(84). Nitekim son yıllarda SSRI ilaçlarla, nűropatik ve non-nűropatik aėrı tedavisinde oldukça etkin sonuçlar alınmaktadır(55).

2.4.3. Serotonin Reseptörleri

Serotoninin işlevlerinin anlaşılması, reseptör alt tiplerinin fizyolojik rollerinin öğrenilmesi ile mümkün olmuştur. Pek çok fizyolojik işlev ve patolojik durumun belki de en önemli nörotransmitteri olan serotoninin çok sayıda reseptörünün olması da şaşırtıcı değildir(33).

Serotonin reseptörlerinin sınıflandırılması ilk olarak Gaddum ve Picarelli (1957) tarafından yapılmıştır. Bu araştırmacılar, düz kaslardaki reseptörlere, dibenzilinle selektif olarak antagonize edilmelerinden dolayı D reseptörleri, sinir dokusundakilere de, morfine selektif olmaları nedeniyle M reseptörleri ismini vermişlerdir. Daha sonra iki farklı 5-HT reseptörünün varlığı radyoligand bağlama tekniğiyle gösterilerek, 5-HT₁ ve 5-HT₂ olarak sınıflandırılmıştır(94). Şimdiye kadar serotonin etkilerine aracılık eden 13 farklı, G proteinle eşleşen ve 1 tane iyon kapılı olmak üzere, en az 14 membranal reseptör (bu sayı çeşitli yayınlarda değişebilmektedir) tanımlanmıştır. Bu reseptörler yapısal ve işlevsel farklılıklarına göre 7 sınıfa (5-HT₁₋₇) ayrılmıştır. Agonist ve antagonistlerle yapılan fonksiyonel çalışmalar ve radyoligand bağlama çalışmaları sonucunda önce 4 alt grup reseptör ailesi (5-HT₁₋₄) gösterilmiş ve daha sonra yapılan moleküler biyoloji çalışmalarıyla da bu 4 alt tip doğrulanmış ayrıca yeni reseptör alt tipleri (5-HT_{1E/F}, 5-HT_{3A/B}, 5-HT_{5A/B}, 5-HT₆ ve 5-HT₇) tanımlanmıştır(61).

2.4.3.a. 5-HT₁ reseptörleri

5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}, ve 5-HT_{1p} olmak üzere alt tiplere ayrılır ve 5-HT₁-benzeri reseptörler olarak isimlendirilir. 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} ve 5-HT_{1D} alt tipleri, çeşitli

türlerin farklı dokularında fonksiyonel olarak gösterilmiştir, ancak, 5-HT_{1E} ve 5-HT_{1F} alt tiplerin fizyolojik rolleri henüz bilinmemektedir. 5-HT_{1C} alt tipinin, 5-HT_{2C} alt tipi ile aynı olduğunun anlaşılmasından sonra bu reseptörler 5-HT_{1C/2C} olarak ifade edilmektedir. Serotoninin renal vazokonstriktör etkisi 5-HT₁-benzeri reseptörler aracılığıyla olmaktadır. Bazı damarlarda (köpek koroner arter gibi) yaptığı dilatör etki de kısmen, aynı reseptörler aracılığıyla endotelden nitrik oksid salıvermesine bağlıdır(84).

2.4.3.a.1. 5-HT_{1A} reseptörleri

SSS'nde yaygın olarak dağılmıştır. Raphe çekirdeğindeki sinir hücre cisimlerine lokal olarak (mikroiyontoforezle) 5-HT uygulanırsa bu reseptörler aracılığıyla inhibisyon oluşur; bu nedenle 5-HT_{1A} reseptörlere somatodendritik otoresptörler denir. Böylece bu reseptörlerin uyarılması serotonerjik sinirlerin ateşleme hızını düşürür ve takiben serotonin sentez, salınım ve turnover'ı azalır. 5-HT_{1A} reseptörlerinin bir kısmı ise daha çok limbik yapılarda olmak üzere postsinaptik yerleşim gösterirler ve uyarılmaları G-proteinle eşleşen K⁺ kanalları aracılığıyla nöronal hiperpolarizasyona neden olur. Kronik stres ve uzun süreli glukokortikoid uygulanması, bu reseptörlerde down-regülasyona neden olur. Steroid hormonlar da 5-HT_{1A} reseptör ekspresyonunu modüle ederler. P maddesinin kendi reseptörü olan nörokinin 1 (NK1R) aracılığıyla 5-HT_{1A} reseptörüyle etkileştiği ve bu etkileşiminin anksiyetenin modülasyonunda önemli olduğu gösterilmiştir(9).

2.4.3.a.1.a. 5-HT_{1A} reseptörleri: klinik önemleri

Bu reseptörleri etkileyen 3 tip ligand söz konusudur: i)5-HT_{1A} agonist and parsiyel agonistleri, ii)5-HT_{1A} antagonistleri ve iii)5-HT_{1A} reseptörleri ile birlikte diğer reseptörleri (5-HT₂, dopamin vb.) de etkileyen karma ligandlar. 5-HT_{1A} ligand etkisi, hangi (pre- ya da postsinaptik) 5-HT_{1A} reseptörlerin etkilendiğine bağlı olarak değişir. 5-HT_{1A} agonistleri anksiyolitik, antidepresan, antiagresif ve muhtemelen de antikataleptik, antiemetik ve nöroprotektif özelliklere sahiptir. Aynı zamanda alkolizmde rollerinin olduğu ve uykunun farklı fazlarını da etkilediklerine dair veriler mevcuttur(52). Esas terapötik kullanımları anksiyete ve depresyon tedavisidir. Buspiron, 5-HT_{1A} reseptörlerinin parsiyal agonistidir (gepipron ve ipsaperon gibi) ve anksiyolitik olarak kullanılır. Anksiyolitik etkisi primer olarak somatodendritik 5-HT_{1A} reseptörlerini (sinir ucundan 5-HT salınımını azaltan) etkilemesine bağlıdır. 5-HT_{1A} reseptörleri üzerinden oluşan antidepresan etki ise muhtemelen postsinaptik 5-HT_{1A} reseptörleri aracılığıyla oluşmaktadır(62). 5-HT_{1A} reseptörlerinin, şiddet davranışında önemli rol oynadıkları, bu nedenle bazı 5-HT_{1A} reseptör ligandlarının antiagresif etkili olduğu savunulmuştur(73). Ayrıca alkol varlığında beyin bazı bölgelerindeki 5-HT_{1A} reseptör sıklığının azaldığı gösterilmiştir(10). Bu reseptörlerin obsessif-kompulsif bozukluk, intihara eğilim, panik bozukluk, seksüel davranış, iştah kontrolü, ısı düzenlenmesi, ACTH salınımı ve kardiyovasküler işlev gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik durumlara da katılımlarının olduğu gösterilmiştir(68). β -adrenoseptör blokerleri olan (-) propranolol ve (-) pindolol, 5-HT_{1A} ve diğer bazı 5-HT reseptörleri üzerinde antagonist etkilidirler.

2.4.3.a.2. 5-HT_{1B/1D} reseptörleri

5-HT_{1B} reseptörleri (rodent tipi) ile **5-HT_{1D}** (non-rodent tip) reseptörlerinin homolog oldukları ve bu nedenle 5-HT_{1B/D} reseptörler şeklinde ifade edilmesi gerektiği savunulmuştur. Gerçekte, 5-HT_{1B/D} reseptörlerin sınıflandırılması konusundaki tartışmalar henüz bitmemiştir. Yararlanılan kaynaklar doğrultusunda bu alt tipler ayrı başlıklar altında anlatılacaktır.

2.4.3.a.2.a. 5-HT_{1B} reseptörleri

İlk kez rodent beyinde gösterilmiştir. Pre- (serotonin salınımını düzenleyenler) ve postsinaptik yerleşim gösterirler. Bu reseptörlerin serotonerjik sinir uçlarında eksprese edildiği gösterilmiştir. 5-HT_{1B} reseptörleri adenilil siklazla negatif şekilde eşleşirler.

5-HT_{1B} reseptörleri: fizyolojik işlevleri ve klinik önemleri

Isı düzenlenmesi, solunum, iştah kontrolü, seksüel davranış, agresyon, anksiyete ve muhtemelen de uyku, sensoryomotor inhibisyon ve lokomotor aktiviteyle ilişkilidirler(53).

2.4.3.a.2.b. 5-HT_{1D} reseptörleri

SSS'nde geniş ölçüde dağılım gösterirler. Bazı araştırmacılar bu reseptörlerin heterojen olduklarını iddia ederek, 5-HT_{1D}-benzeri reseptörler ifadesini kullanırlar. Bu araştırmacılar 5-HT_{1D} reseptörlerinin iki farklı alt tipini, 5-HT_{1D α} ve 5-HT_{1D β} olarak tanımlamaktadır. Klonlama çalışmaları rat ve fare 5-HT_{1B} reseptörlerinin insan 5-HT_{1D β} reseptörlerine büyük ölçüde benzer olduğu göstermiştir(52, 53).

5-HT_{1D} reseptörleri: fizyolojik işlevleri ve klinik önemleri

5-HT_{1D α} ve 5-HT_{1D β} reseptörleri migren tedavisinde hedef reseptörlerdir. Nöral dokuda egemen olan 5-HT_{1D α} tipinin daha çok nörojenik inflamasyona, 5-HT_{1D β} tipinin ise vazokonstriksiyona katılımının olduğu düşünülmektedir. Migrenin nöbet tedavisinde kullanılan 5-HT_{1D} agonisti sumatriptan, her iki tipi, 5-HT_{1D α} ve 5-HT_{1D β} , benzer şekilde uyarır ve ayrıca 5-HT_{1F} reseptörlerine de bağlanır. Bu reseptörlerin ayrıca, anksiyete, depresyon ve Huntington hastalığı gibi bazı hastalıkların fizyopatolojilerinde de önemli olduğuna dair kanıtlar vardır(52, 53).

2.4.3.a.3. 5-HT_{1E} reseptörleri

Radyoligand bağlama çalışmaları ile insan beyinde tanımlanmışlardır. 5-HT_{1D} reseptörlerinden karboksitriptamine ve ergotamine düşük affiniteli olmalarıyla ayrılırlar(61).

2.4.3.a.4. 5-HT_{1F} reseptörleri

En son klonlanan 5-HT₁ reseptörleridir. 5-HT_{1E} tipine benzerler, ancak ona göre ergo türevlerini daha yüksek affiniteyle bağlarlar. Adenilil siklazla negatif şekilde eşleşir ve non-selektif 5-HT antagonisti metiotepinle antagonize olurlar. Uterusta, bazı damarsal ve sinirsel dokularda gösterilmişlerdir ancak 5-HT_{1E} reseptörleri gibi klinik önemleri henüz bilinmemektedir(84).

2.4.3.a.5. 5-HT_{1P} reseptörleri

Midede tanımlanmış (p-periferel) ancak beyinde gösterilememiştir. Bu reseptörler, 5-HT₄ reseptörlerle birlikte besin alerjisi esnasında barsaktaki mast hücrelerinden salgılanan serotoninin barsak salgısını ve motilitesini artırmasına aracılık eder (84).

2.4.3.b. 5-HT₂ reseptörleri

Damar düz kasında, kalp kasında, trombositlerde, mast hücrelerinde, akciğerde, SSS'nde ve mide-barsak kanalında yaygın şekilde bulunurlar(64, 69, 92, 104). 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} ve 5-HT_{2C} olarak 3 alt tipe ayrılırlar. 5-HT_{2A} tipi Gaddum ve Picarelli'nin D tipine karşılık gelir.

2.4.3.b.1. 5-HT₂ reseptörleri: fizyolojik işlevleri ve klinik önemleri

Serotonine bağlı, mide-barsak ve damar düz kasındaki kasılmaya, trombosit agregasyonuna, hipertansiyon, migren ve sinir depolarizasyonuna aracılık ederler. 5-HT₂ antagonistleri antipsikotik etki potansiyeline sahiptir. Atipik antipsikotikler, klozapin, quetiapin ve olanzepin 5-HT₂ reseptör antagonistidirler. İştah düzenlenmesine katılımı olan reseptör alt tipinin de yine 5-HT_{2C} olduğu düşünülmektedir(104).

Hasarlanmış dokularda inflamasyonda ve inflamatuvar ağrıda serotoninin de rolü olduğu bilinmekte olup yine 5-HT₂ reseptör bloker ajanların diskopatiye sekonder lomber ağrı tedavisinde etkin olabileceğine dair çalışmalar yapılmış ve hatta 5-HT₂ bloker ajanların NSAI ilaçarınkine eş ağrı kontrolü sağladığı da iddia edilmiştir(69, 81).

Serotonin iskemi reperfüzyona bağlı kardiyak hasarlanmada da yine 5-HT₂ reseptörleri üzerinden mediyatör özelliğe sahip olabilir. Bu amaçla yapılmış bazı deneysel çalışmalarda 5-HT₂ reseptör blokajının miyokard iskemisine bağlı hücresel hasarı önleyici etkinliği olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir(104).

2.4.3.c. 5-HT₃ reseptörleri

Prototipi kolinerjik nikotink reseptörler olan iyon kapılı reseptör ailesine aittirler. Monoamin nörotransmitterler arasında iyon kapılı olan tek reseptördür. Gaddum ve Picarelli'nin M (morfin) reseptörlerine tekabül eder. İlk olarak periferik otonomik, duyu ve enterik sinir hücrelerinde tanımlanmıştır. Serotoninin eksitator etkisine aracılık ederler. Daha sonra beyindeki sinir uçlarında bulunduğu ve serotonin dahil, bazı nörotransmitterlerin salınımını düzenlediği gösterilmiştir. Hem GİS'de hem de SSS'nde kusma cevabına katılırlar. Bu reseptörlerin de alt tipleri olduğuna dair kanıtlar mevcuttur. Uyarılmaları, başta Na⁺ olmak üzere, K⁺ ve daha az olarak da Ca⁺⁺ gibi katyonların girişine ve hızlı ve kısa süreli depolarizasyona neden olur(84).

2.4.3.c.1. 5-HT₃ reseptörleri: fizyolojik işlevleri ve klinik önemleri

5-HT₃ reseptör antagonistleri ondansetron, granisetron, dolasetron ve tropisetron özellikle sisplatin gibi emetojenik etkisi güçlü kemoterapötik ilaçlara ve radyoterapiye bağlı şiddetli kusmanın tedavisinde kullanılırlar. Etki mekanizmaları periferik vagal afferentlerdeki ve kemoreseptör trigger zone (CTZ) ve nukleus traktus solitarius gibi santral bölgelerdeki 5-HT₃ reseptörlerin bloke etmelerine bağlıdır(84). 5-HT₃ antagonistlerinin irritabl kolon

sendromunun (İKS) diyare egemen formu kadın hastalarda visseral duyuyu etkilediği, kolon transitini yavaşlattığı ve su ve klor salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir. Ondansetrondan 10 kat daha potent olan 5-HT₃ antagonisti alosetron, ABD’de İKS’nun diyare egemen formunda tedaviye girmiş ve kısa süre sonra ciddi yan tesirleri nedeniyle piyasadan kaldırılmıştır. Serotoninin İKS patofizyolojisinde, 5-HT₃ reseptörleri ve 5-HT₄ reseptörleri aracılığıyla anahtar rol oynadığı düşünülmekte ve bu konudaki araştırmalar devam etmektedir(28).

5-HT₃ reseptör antagonistlerinin migren tipi ve diğer tip ağrı tedavisinde etkin oldukları, ayrıca anksiyete, depresyon ve demans tedavisinde de yararlı olabileceklerine dair bulgular elde edilmiştir(53). İlave olarak bu reseptörler yeni sınıf antipsikotik ilaçlar için hedef reseptörlerdir ve alkol, nikotin, kokain ve amfetamin bağımlılığı tedavisinde kullanıma potansiyelleri de halen araştırılmaktadır(53).

2.4.3.d. 5-HT₄ reseptörleri

SSS ve periferde yaygın dağılım gösterirler. Gastrontestinal sistemde, düz kaslar, salgı hücreleri ve miyenterik pleksüsteki sinirler üzerinde yerleşmişlerdir. Adenilil siklazla (adenilat siklaz) pozitif şekilde eşleşirler. 5-HT₄ reseptörlerinin uyarılması barsakta asetilkolin salınımını uyarır, peristaltizmin düzenlenmesine katkı yapar. Bu reseptörlerin uzun form, 5-HT_{4L} ve kısa form, 5-HT_{4S} olmak üzere iki izoformunun olduğu gösterilmiştir; bu izoformlar, bazı yayınlarda sırasıyla 5-HT_{4A} ve 5-HT_{4B} olarak da ifade edilir.

2.4.3.d.1. 5-HT₄ reseptörleri: fizyolojik işlevleri ve klinik önemleri

5-HT₄ reseptör agonistleri metoklopramid, sisaprid ve mosaprid özafagusun alt kısmını ve fundusu gevşetip midenin kapasitesini ve uyuncunu artırırken, antrumu uyarıp mide boşalmasını çabuklaştırır (prokinetik etki) (84). Metoklopramid gibi bazı 5-HT₄ reseptör agonistlerinin aynı zamanda 5-HT₃ reseptör antagonisti olması ilginçtir. 5-HT₄ reseptörlerinin parsiyel agonisti tegaserod İKS'nun konstipasyon egemen formunda kullanılmaktadır(28).

2.4.3.e. 5-HT₅ reseptörleri

Fonksiyonel olarak tanımlanması son yıllarda olmuştur. Amino asid dizilimleri diğer 5-HT reseptörlerinden oldukça farklıdır, ancak farmakolojik özellikleri bir dereceye kadar 5-HT_{1D} reseptörlerine benzemektedir. Bu reseptörlerin iki alt tipinin olduğu, 5-HT_{5A} ve 5-HT_{5B}, gösterilmiştir. Farmakolojik işlevleri tam olarak bilinmez, ancak yerleşim yerleri dikkate alınarak, motor kontrol, beslenme, anksiyete, öğrenme, bilgi depolama, adaptif cevap ve beyin gelişiminde rol oynadıkları ileri sürülmüştür(53).

2.4.3.f. 5-HT₆ reseptörleri

Sadece SSS'nde bulunduğu iddia edilmektedir. Farmakolojik işlevleri henüz tam olarak bilinmeyen bu reseptörler adenilil siklazla pozitif şekilde eşleşirler. Bazı tipik (klorpromazin, flufenazin) ve atipik (klozapin, risperidon, olanzepin) nöroleptiklerin bu reseptörlere yüksek affiniteyle bağlandıkları gösterilmiştir (53).

2.4.3.g. 5-HT₇ reseptörleri

İnsanda, ratta, fare ve kobayda klonlanmıştır. Memelilerdeki sirkadyen ritmi, hipotalamusta suprakiazmatik çekirdekte yer alan bir tempocu (pacemaker) etkinliğin oluşturduğu düşünülmektedir. Hipotalamusta, suprakiazmatik sinirlerin sinirsel ateşleme hızında oluşturulan diurnal değişiklikler, bu tempocu etkinlik tarafından sürdürülmektedir. Serotonin uygulaması, muhtemelen 5-HT₇ reseptörleri aracılığıyla bu etkinlikte faz kaymasına (ritmin değişmesine) neden olmaktadır(53).

2.4.4. Sinyal Transdüksiyonu ve Hücresel Yolaklar

5-HT₃ reseptörlerinin ise iyon kapılı reseptörler olduğu ve uyarılmalarının nonselektif katyon girişine bağlı olarak depolarizasyona neden olduğu, reseptörler bölümünde anlatılmıştır. G proteinle eşleşen diğer reseptörlerin ise çok basamaklı, enzim aracılı yolak ve doğrudan iyon kanalının (G proteinle aktive edilen içe yönelik doğrultucu K⁺ kanalı) düzenlenmesi olmak üzere iki major, reseptör aracılı sinyal transdüksiyon yolağı vardır. Her ikisinde de reseptörle efektör molekülün bağlanması için guanin nükleotid trifosfat (GTP)-bağlayan protein (G protein) gereklidir. Enzime bağlı sinyallemenin içerdiği basamakların dizilim sırası şöyledir; membran reseptörü, G protein, efektör enzim; ikincil ulak; protein kinaz fosfoproteini. Bu çok basamaklı süreçte ikincil ulaklar adenilil siklazın aktivasyonu veya inhibisyonu ve fosfoinoziditaz (fosfolipaz C) aktivasyonudur. Bu, enzim-bağımlı yolaklar hücresel uyarıları aynı zamanda amplifiye ederler. G proteinlerin çok sayıda farklı izoformu (Gi, Gs vb) olduğu gibi, adenilil siklaz [anksiyetenin modülasyonunda özellikle adenilil siklaz tip 8 (AC8)'in rol oynadığı düşünülmektedir] ve fosfoinoziditazın da farklı izoformları vardır. Ayrıca protein kinaz A, protein kinaz C ve Ca²⁺/kalmodülin bağımlı

kinazın da farklı izoformları gösterilmiştir. Bütün bu süreç, protein fosforilasyonu ile son bulur. AC8, Ca^{2+} -kalmodülün kinaz II ve G proteinle aktive olan içe yönelik doğrultucu K^+ kanal 2 gibi major sinyal transdüksiyon yollarından başka minör yolların da varlığı gösterilmiştir. Bunlardan biri olan nöronal nitrik oksidin (NO), özellikle 5-HT_{1A} ve 5-HT_{1B} ile etkileşiminin olduğu bildirilmiştir(9).

2.5. Quetiapine (Serequel ©, Astra Zeneca)

Quetiapine dibenzotiyazepin türevi bir atipik antipsikotik ajandır. Serotonin 5-HT₂ reseptörlerine yüksek, dopamin D₂ reseptörlerine ise daha düşük bağlanma afinitesi gösterir bir bloker ajandır. Bununla birlikte histamin H₁ reseptörlerine, α_1 ve α_2 reseptörlerine de afinitesi vardır. Bunların dışında dopamin D₁ ve Muskarinik M₁ reseptörlere ise ihmal edilir düzeyde bağlanma özelliği de gösteren bir ajandır. Muskarinik reseptörlerle olan bu çok zayıf ilişkisi sayesinde klozapinden farklı olarak antikolinergik yan etki görülme riski de düşüktür. Klozapin benzeri antipsikotik etkinlik göstermekle birlikte dopaminerjik reseptörlere daha düşük afinitesi sayesinde EPS ortaya çıkarma ihtimali daha düşük olup prolaktin seviyesi üzerine de etkisi düşüktür(59, 66, 83). İnvitro çalışmalar göstermiştir ki quetiapinin farmakolojik etkisi mesolimbik ve mesokortikal dopaminerjik sistemlere selektif olup bu etki antipsikotik etkinliğinden sorumludur. Ancak nigrostriyatal dopaminerjik sistem üzerine etkinliği yoktur ki böylece ekstrapiramidal sistem semptomları da oluşturmamasını açıklayıcıdır(54). Oral alımı takiben hızlı absorbe edilir ve gıda alımından etkilenmez. Plazma proteinlerine %83 oranında bağlanır. Karaciğerde hızlı bir şekilde metabolize edilir ve majör metabolik yol sitokrom P450 sistemine ait sülfoksidasyondur. İlaç inaktif metabolitleri şeklinde primer olarak (%73) idrar yoluyla atılır. Eliminasyon yarılanma ömrü ise yaklaşık

olarak 6 saattir ancak şizofrenili hastalarda yapılan PET çalışmasında serotonin reseptörlerine klinik olarak efektif seviyede en az 12 saat bağlı kaldığı gösterilmiştir. Yani plazmadan eliminasyonuna göre reseptörlerden uzaklaşması daha yavaş seyretmekte olup bu da günde iki kez kullanımına imkan sağlamaktadır. Quetiapine hastalar tarafından iyi tolere edilir bir ajandır. Quetiapine' in farmakokinetiği kadın veya erkekte, adolesan veya erişkinde değişmemektedir. Sigara içimi ve hastaların etnik kökeni de etki etmemektedir(39, 49, 102).

Antipsikotik ajanlar düzeltilmiş QT intervalini (QTc) uzatabilirler ancak quetiapine terapötik dozlarda QTc üzerine etki etmiyor görünmektedir. Klinik çalışmalar Quetiapine kullanan hastalardaki QTc değişikliklerinin plasebo ile farklı olmadığını göstermiştir(7).

Kısa dönem, çift kör, randomize çalışmalar göstermiştir ki şizofreni tedavisinde plaseboya göre quetiapine belirgin olarak daha etkindir. Yine çalışmalarda şizofreninin hem pozitif hem de negatif semptomlarında da etkinliği olduğu, şizofreni hastalarının depressif dönemlerinde de oldukça etkin olduğu kanıtlanmıştır. Bipolar bozukluk tedavisinde de hem mani, hem depresyon dönemlerini kontrol altına almada etkin bir ajan olarak kullanılmaktadır(2).

EPS (örn. parkinsonizm, akatizi ve distoni) standart ve bazı atipik antipsikotik ajanlara belirgin tolerabilite problemi olarak şizofreni tedavisinde ortaya çıkabilmekte ve tedavi programını direkt etkileyebilmektedir. Quetiapine' in ise şizofrenik hastalarda EPS oluşturma potansiyeli ise düşüktür. Quetiapine tedavisi altında EPS oluşma insidansının plasebo değerleriyle benzer olduğu çalışmalarda tespit edilmiş olup uzun dönem tedavilerde ise EPS insidansına küçük bir etki söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle EPS nedeniyle kesilmesi gereken standart bir antipsikotik ajanın iyi bir alternatifi quetiapine olacaktır(3).

Organik beyin hasarı olan hastalar özellikle Parkinson hastalığı olanlar EPS gelişimi yönünden artmış riske sahiplerdir. Ancak quetiapinin bu hasta gruplarında EPS' ları veya istemsiz hareketleri artırmadığına dair çalışmalar mevcuttur(83).

Tardif diskinezi de standart antipsikotik ajanların uzun dönem kullanımlarıyla ortaya çıkan ve tedavinin kesilmesini gerektiren önemli bir sorundur. Yine quetiapin tardif diskinezi oluşturma riski hem erişkinlerde hem de yaşlı hastalarda standart ajanlardan daha düşük görünmektedir(34).

Travmatik beyin hasarı gelişen birçok hastada takiben ortaya çıkan ajitasyon ve agresyon hali travma sonrası psikososyal iyileşmede gecikmeye neden olmakta ve hastaların nörorehabilitasyon programlarından görecekları yararı da etkilemektedir. Yapılan klinik deneysel çalışmalarda quetiapine, travmatik beyin hasarına bağlı agresyon ve ajitasyonun tedavisinde de uygun bir ajan olarak değerlendirilmiştir(87).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafınca G.Ü.ET-07.026 kod numarasıyla deneysel çalışmamızın etik onayı alındı. Çalışma Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilen, ağırlıkları 200 – 220gr arasında değişen dişi, Wistar cinsi albino ratlarla yapıldı. Bakımı ve takipleri yine GÜDAM'nde gerçekleştirilen hayvanlar her kafeste 4 adet barınacak şekilde, herhangi bir su ve yem kısıtlaması yapılmadan barındırıldılar. Her grupta rastgele seçilmiş 8 rat olmak üzere dört deney grubu oluşturuldu;

Grup 1 (K-I): 1 gün yaşatılan kontrol grubu (N=8)

Grup 2 (D-I): 1 gün yaşatılan ilaç grubu (N=8)

Grup 3 (K-II): 7 gün yaşatılan kontrol grubu (N=8)

Grup 4 (D-II): 7 gün yaşatılan ilaç grubu (N=8)

Her gruba aynı cerrahi prosedürler uygulandı. İlaç gruplarına quetiapin 10mg/kg/gün intraperitoneal yolla, oluşturulan travmanın 30. dk'ında ve takiben her gün aynı saatte olacak şekilde günlük(1x1) olarak verildi. Doz ve uygulanım şeklinde daha önceki deneysel çalışmalar baz alındı(43, 110, 118).

3.1 Cerrahi Teknik

Her deney hayvanında intramusküler yolla 10mg/kg xylazine (Rompun, Bayer, İstanbul/Türkiye) ve 50mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul/Türkiye) ile genel anestezi sağlandı. Ardından ratlar prone pozisyonda operasyon masasına yatırılıp tespit

edildiler. Steril şartlarda uygun saha temizliğini takiben torakal 4 -10 segmentler seviyesi orta hat vertikal cilt insizyonu yapıldıktan sonra cilt/ciltaltı geçilip fascia orta hat açıldı. Paravertebral adaleler spina ve laminalardan künt diseksiyonla sıyrıldıktan sonra torakal 5-7 total laminektomi uygulanarak kord ortaya çıkarıldı. Torakal 6 seviyesinde kord maksimum açılımı 9.2mm, bacak uzunluğu 15mm ve kapanma kuvveti 90gr olan Yaşargil geçici anevrizma klibi (cat.FT280T) ile 60sn süreyle travmaya maruz bırakıldılar(Resim 1). Klip alındıktan sonra fascia ve cilt sutürlerle usulüne uygun kapatılarak cerrahi işlem tamamlandı.



Resim 1. Deneysel spinal kord travması oluşturulması (kipleme yöntemi)

Cerrahi işlemleri takiben 1 günlük ilaç grubuna (D-I) ve 7 günlük ilaç grubuna (D-II) operasyonu takiben 30. dakikada quetiapin 10mg/kg i.p. yolla uygulandı. Kontrol gruplarına (K-I, K-II) herhangi bir medikasyon uygulanmadı ve tüm gruplar takibe alındı.

K-I ve D-I gruplarındaki hayvanlar travmanın 24. saatinde sakrifiye edilerek laminektomi sahaları genişletilmek suretiyle T 6 seviyesindeki travma hattının ~0.5cm proksimal ve distalini içerecek şekilde spinal kordları rezeke edilerek %10' luk nötral formaline alındılar.

K-II ve D-II gruplarında ise deney hayvanları her gün 10mg/kg/gün i.p. yolla quetiapin verilmek suretiyle 7 gün takip edildiler. Sekizinci gün bu iki gruba ait deney hayvanları da aynı cerrahi teknikle sakrifiye edilerek benzer şekilde spinal kordları rezeke edildi. Kord örnekleri aynı şekilde %10' luk nötral formaline alındılar.

Elde edilen tüm numuneler doku takip işlemleri yapılmak üzere ayrı kaplara alındılar.

3.2 Doku Takibi

Tüm histolojik ve immünohistokimyasal takip ve incelemeler Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında yapıldı. Tüm örnekler formalinle fikse edildikten sonra akarsu altında formalinden kurtarıldıktan sonra alkol serilerinden geçirilmek suretiyle dehidrate edildiler. Ardından tüm örnekler parafine gömülerek bloklandı. Mikrotom yardımıyla 5µ kalınlıkta seri kesitlerle travma sahasından uygun kesitler alınarak siyalinize lamalar üzerine alındılar. Ardından immünohistokimyasal incelemeye geçildi.

3.2.1 İmmünohistokimyal Değerlendirme

Apoptotik hücreleri saptayabilmek için TUNEL metodu ile *insitu* hibridizasyon tekniği ile ApopTag Plus Peroksidaz In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, USA cat#S7101) kullanıldı. Bu metodla apoptotik hücrelerin fragmente olan DNA' larının tespiti sağlandı.

- 1) %10' luk nötral formalin ile tespit edilip parafin bloklara gömülmüş tüm dokulardan 5µ kalınlığında kesitler elde edildikten sonra bu kesitlerden biri lama alınıp deparafinize edilerek hematoksilin-eozin ile boyandı. Sahanın doğruluğu tespit edildi. Diğer kesit ise Apoptag kit için siyalinize lama alınarak deparafinizasyon işlemi için 56 °C'da 14–16 saat etüvde bekletildi.
- 2) Daha sonra, 3 kez, her biri 5'er dakika olacak şekilde ksilolde ve 2 kez 5' er dakika absolut alkolde bekletildikten sonra kesitler %95 etanolde 3 dakika, %70 alkolde 3 dakika daha bekletilerek deparafinizasyon ve dehidratasyon işlemleri tamamlandı.
- 3) Kesitler PBS (phosphate buffered saline - fosfat tampon solusyonu, pH: 7,4) ile 5 dakika yıkandıktan sonra PBS içerisinde dilüe edilen 20 µg/ml proteinaz K ile oda ısısında 15 dakika inkübe edildi.
- 4) İşlem sonrası distile su ile yıkanan kesitler endojenöz peroksidaz aktivitesini engellemek amacıyla taze hazırlanmış %3 H₂O₂ solüsyonunda 15 dakika bekletildi.

- 5) Bu işlemi takiben kesitler equilibration buffer ile muamele edildikten sonra DNA fragmanlarının işaretlenmesi amacıyla TUNEL reaksiyonu, Tdt enzimi ile 37 °C'de 60 dakika inkübe edilerek gerçekleştirildi.
- 6) Bu işlemin ardından kesitler hızlıca yıkandı ve enzimle birleşmemiş nükleotidler uzaklaştırıldı.
- 7) Kesitler 1'er dakikadan 3 kez PBS ile yıknadıktan sonra antidigoksinin peroksidaz konjugat ile 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 8) Daha sonra kesitler 4 kez PBS ile 2' şer dakika yıkandı ve taze hazırlanan % 0,005 (w/v) 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ile işaretlenen DNA fragmanlarının görüntülenmesi amacıyla, oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
- 9) Zemin boyaması için %0,5'lik metil yeşili ile 10 dakika işleme tabi tutulan kesitler distile su ile yıkandıktan sonra % 100 n-bütanol ile dehidrate edildikten sonra kapatma balzamu uygulanarak lamel ile kapatıldı.

Kontrol dokusu olarak, ApopTag Kit içerisinde kontrol doku olarak bulunan kemirgen (rodent) meme dokusu kullanıldı.

3.2.2. Kesitlerin Değerlendirilmesi

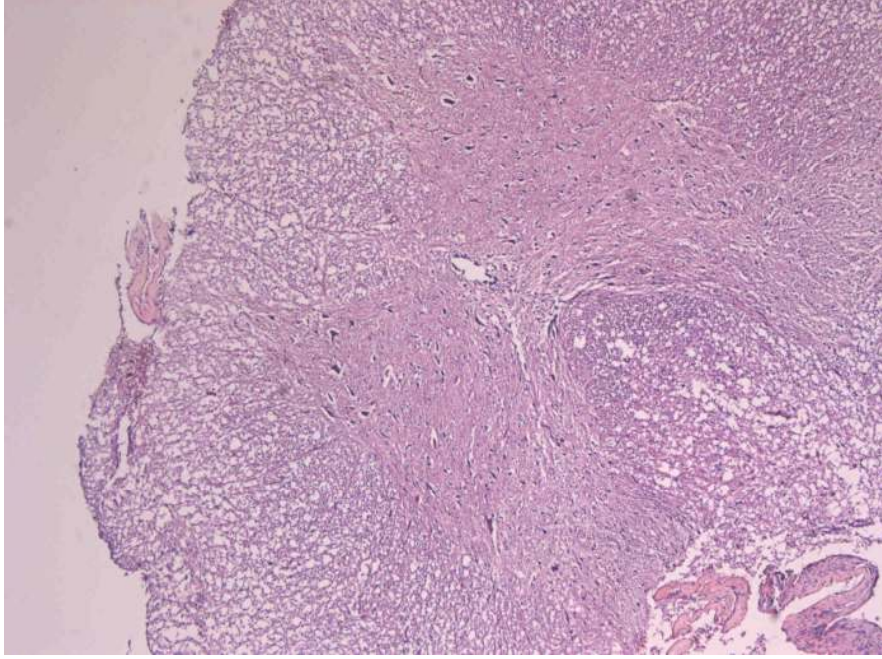
Tüm gruplara ait immunohistokimyasal olarak boyanmış kesitler ışık mikroskopuyla (Leica Microsystems RM6000, Germany) incelendiğinde örneklerde açık renkteki metil yeşilinin oluşturduğu zemin üzerindeki koyu kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler ApopTag pozitif olarak değerlendirildi (Resim 2). Sayım işlemi, X40 objektifle büyütmede

ikisi gri cevherden, ikisi beyaz cevherden olmak üzere toplam 4 farklı mikroskopik büyük alan (x40 büyütme için her büyük alan 0,0625mm²'ye karşılık gelmektedir) içine düşen pozitif boyanma gösteren hücrelerin oküler grid yardımıyla sayılmasıyla gerçekleştirildi. Apoptag pozitif hücreler hem gri hem beyaz cevherde ayrı ayrı sayılarak not edildiler.



Resim 2. TUNEL yöntemiyle hazırlanan spinal kord kesiti örneği (x50)

Tüm gruplara ait medulla spinalis örneklerinin hematoksilen-eozin(HE) ile boyanmış kesitleri genel doku bütünlüğü ve özelliklerini incelemek açısından ışık mikroskopuyla (Leica Microsystems RM6000, Germany) X100 ve X200 büyütmede değerlendirildi(Resim 3).



Resim 3. Hematoksilen-Eozin ile boyanmış spinal kord kesiti örneği (x50)

4. BULGULAR

Tüm gruplarda elde edilen apoptag pozitif hücrelerin sayıları birer tablo halinde düzenlendi. Sayılan her bir büyük büyütme alanına ait değerler ayrı ayrı verilmiştir(Tablo 3-6).

Tablo 3. Bir gün yaşatılan kontrol grubunda (K-I) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları

1 günlük kontrol grubu	Gri cevher		Beyaz Cevher	
	Alan I	Alan II	Alan I	Alan II
1g k1	18	19	17	14
1gk2	20	19	16	17
1gk3	15	25	27	20
1gk4	15	16	18	14
1gk5	16	18	13	16
1gk6	13	14	17	12
1gk7	20	14	9	15
1gk8	18	15	11	14

Tablo 4. Bir gün yaşatılan ilaç grubunda (D-I) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları

1 günlük ilaç grubu	Gri cevher		Beyaz Cevher	
	Alan I	Alan II	Alan I	Alan II
1g d1	8	10	3	4
1gd2	4	3	2	2
1gd3	3	5	1	2
1gd4	13	11	4	10
1gd5	10	4	12	11
1gd6	12	6	13	8
1gd7	4	5	4	7
1gd8	8	6	5	4

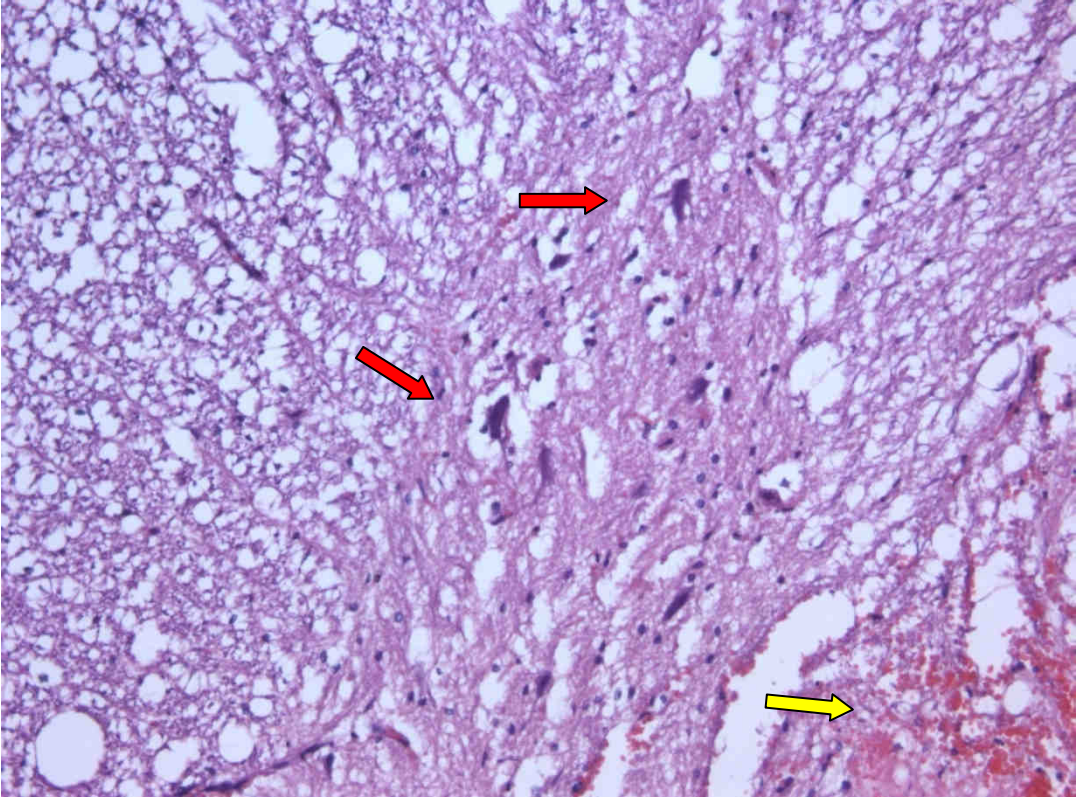
Tablo 5. 7 gün yaşatılan kontrol grubunda (K-II) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları

7 günlük kontrol grubu	Gri cevher		Beyaz Cevher	
	Alan I	Alan II	Alan I	Alan II
7g k1	21	32	12	11
7gk2	13	11	12	15
7gk3	17	17	8	14
7gk4	17	19	10	9
7gk5	18	11	7	6
7gk6	16	15	9	11
7gk7	20	19	11	10
7gk8	19	18	12	10

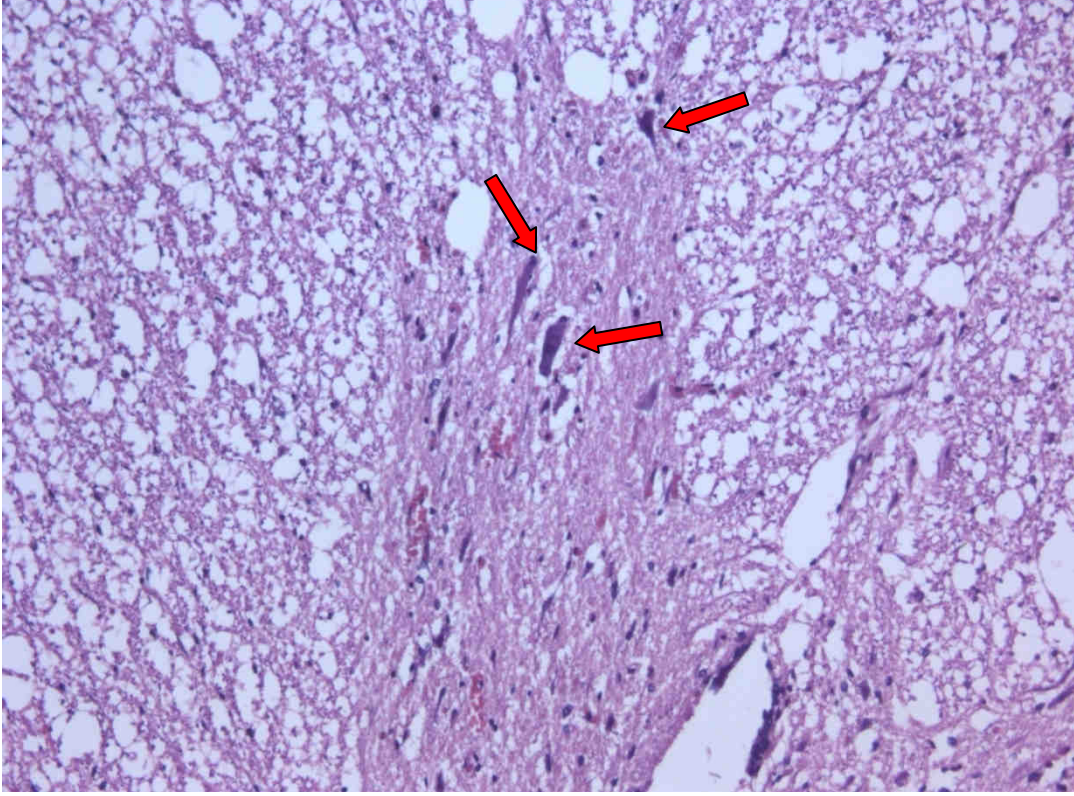
Tablo 6. 7 gün yaşatılan ilaç grubunda (D-II) elde edilen apoptag pozitif hücre sayıları

7 günlük ilaç grubu	Gri cevher		Beyaz Cevher	
	Alan I	Alan II	Alan I	Alan II
7g d1	6	6	9	7
7gd2	4	3	6	8
7gd3	10	8	6	8
7gd4	10	9	7	8
7gd5	8	7	6	4
7gd6	10	6	5	7
7gd7	10	8	4	8
7gd8	11	7	7	9

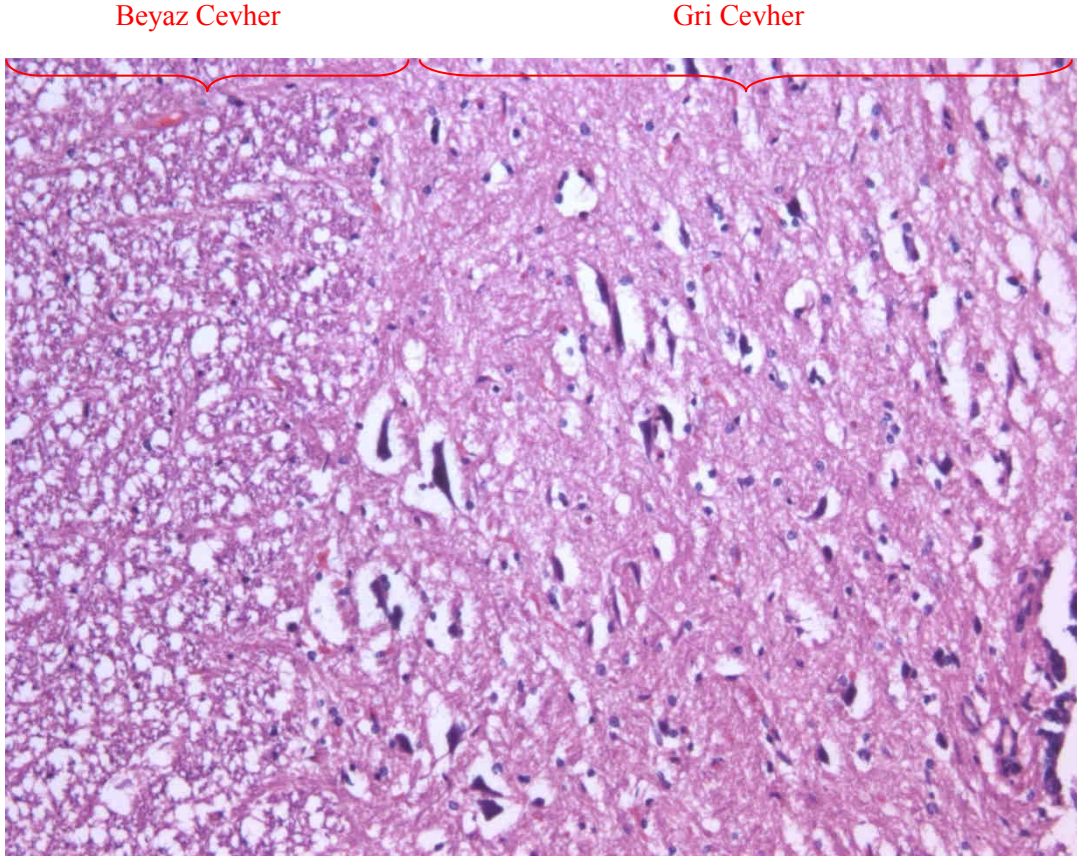
HE ile boyanan preparatlar incelendiğinde kordda ödem, nöronlarda büzüşmeler, yer yer hemorajik alanlar, göze çarpmaktaydı(Resim 4). Kontrol grubunda hem 1 gün hem de 7 gün gruplarında ödem ve nöronlardaki büzüşme varlığı daha belirgin iken(Resim 5), deney gruplarında kord bütünlüğünün daha korunmuş olduğu,7 günlük deney grubunda ödemin daha az olduğu izlenmekteydi(Resim 6).



Resim 4. Kordda ödem, nöronlarda büzüşmeler(kırmızı oklar) ve hemorajik alanlar(sarı ok) izlenmekte (K-I, HEx200)

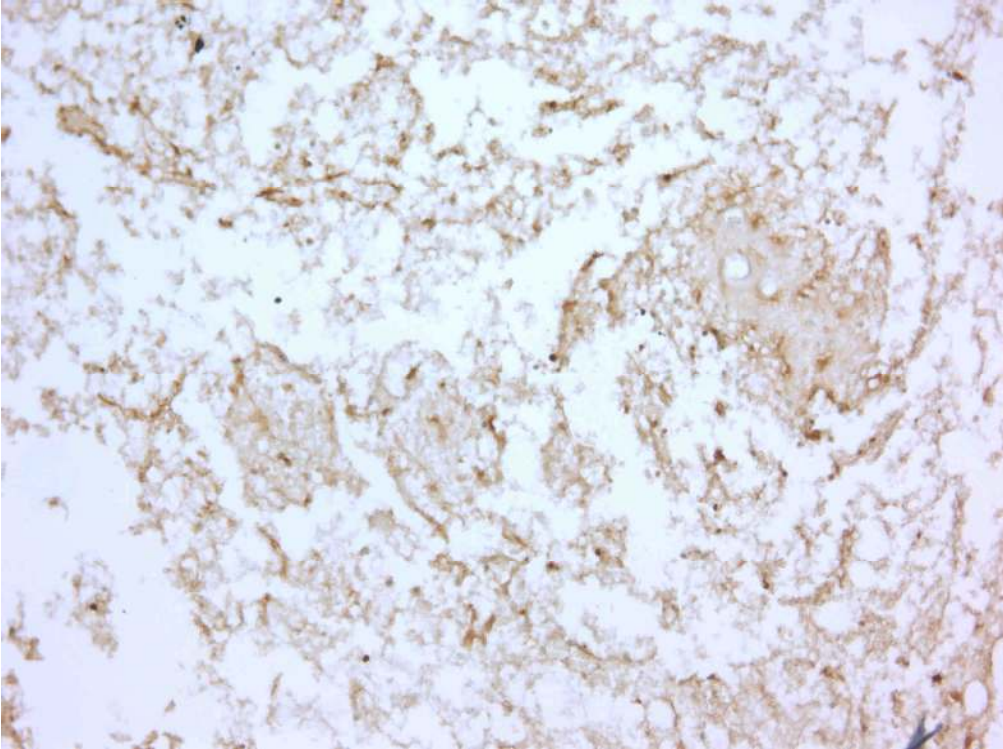


Resim 5. 7 günlük kontrol grubunda da yaygın ödem ve doku bütünlüğündeki bozukluk göze çarpmakta. Yine gri cevherde nöronlardaki büzüşme(kırmızı oklar) de yine dikkat çekmekte (K-II, HEx200)

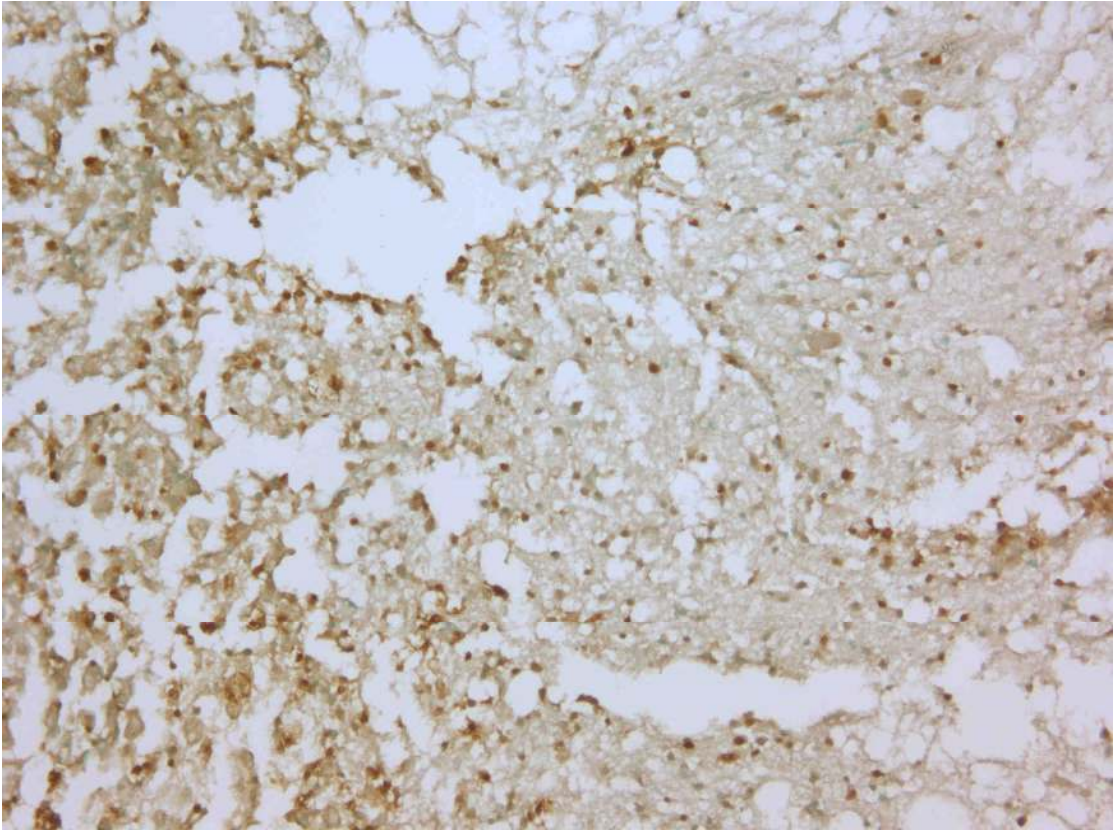


Resim 6. Deney grubu HE preparatlarında ödemin nispeten az oluşu ve gri cevherde doku bütünlüğünün korunduğu görülmektedir (D-II, HEx200)

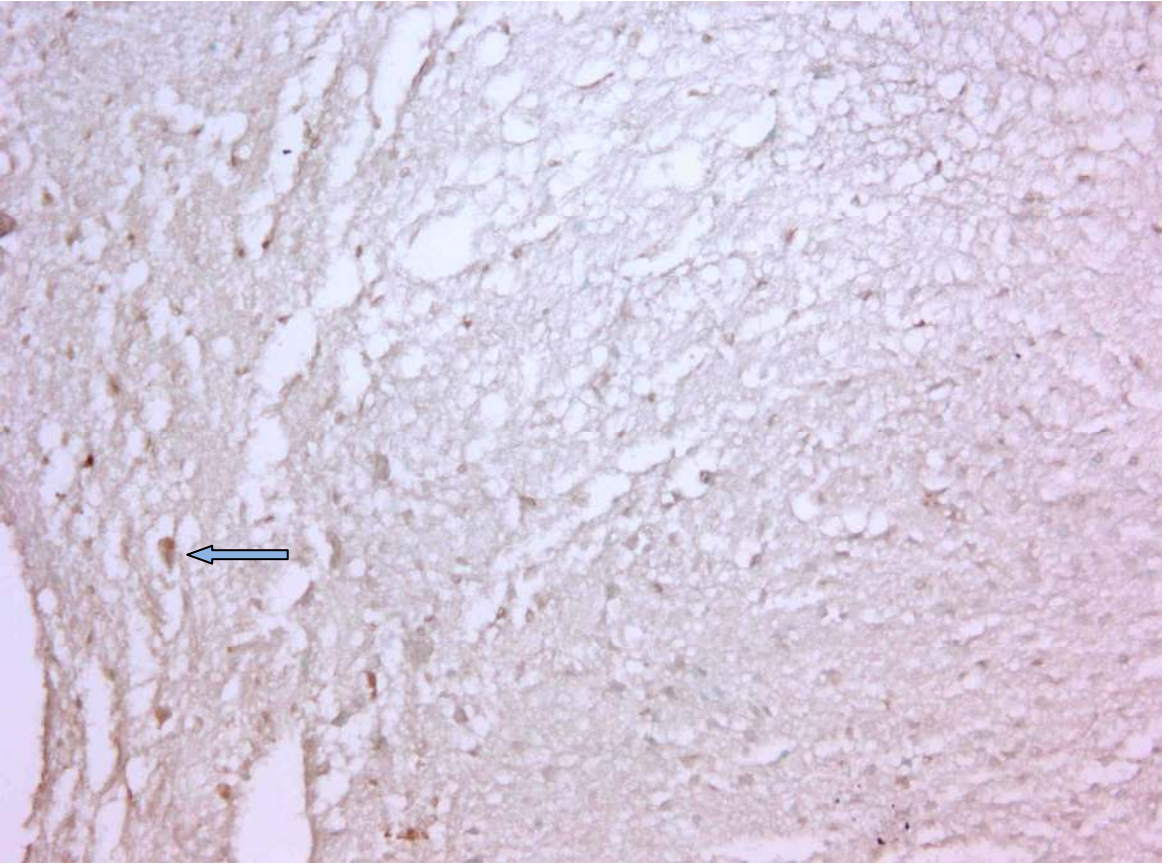
TUNEL yöntemiyle yapılan immunohistokimyasal incelemede soluk yeşil zemine kahverengi boyanmış apoptag pozitif hücreler gri ve beyaz cevherde ayrı ayrı sayılarak değerlendirilmiştir(Tablo I-IV). Bu incelemelerde görülmekteydi ki kontrol gruplarıyla (Resim 7 ve 8) deney grupları(Resim 9 ve 10) arasında belirgin fark mevcuttu. Deney gruplarında apoptag pozitif hücre sayısı belirgin az olup kord posteriorunda travmanın yoğun olduğu bölgelerde kısmen pozitif hücre olup uzak bölgelerde çok daha az sayıda apoptag pozitif hücre görülmesi kordda komşu sahaların deney gruplarında korunduğu şeklinde yorumlandı(Resim 10).



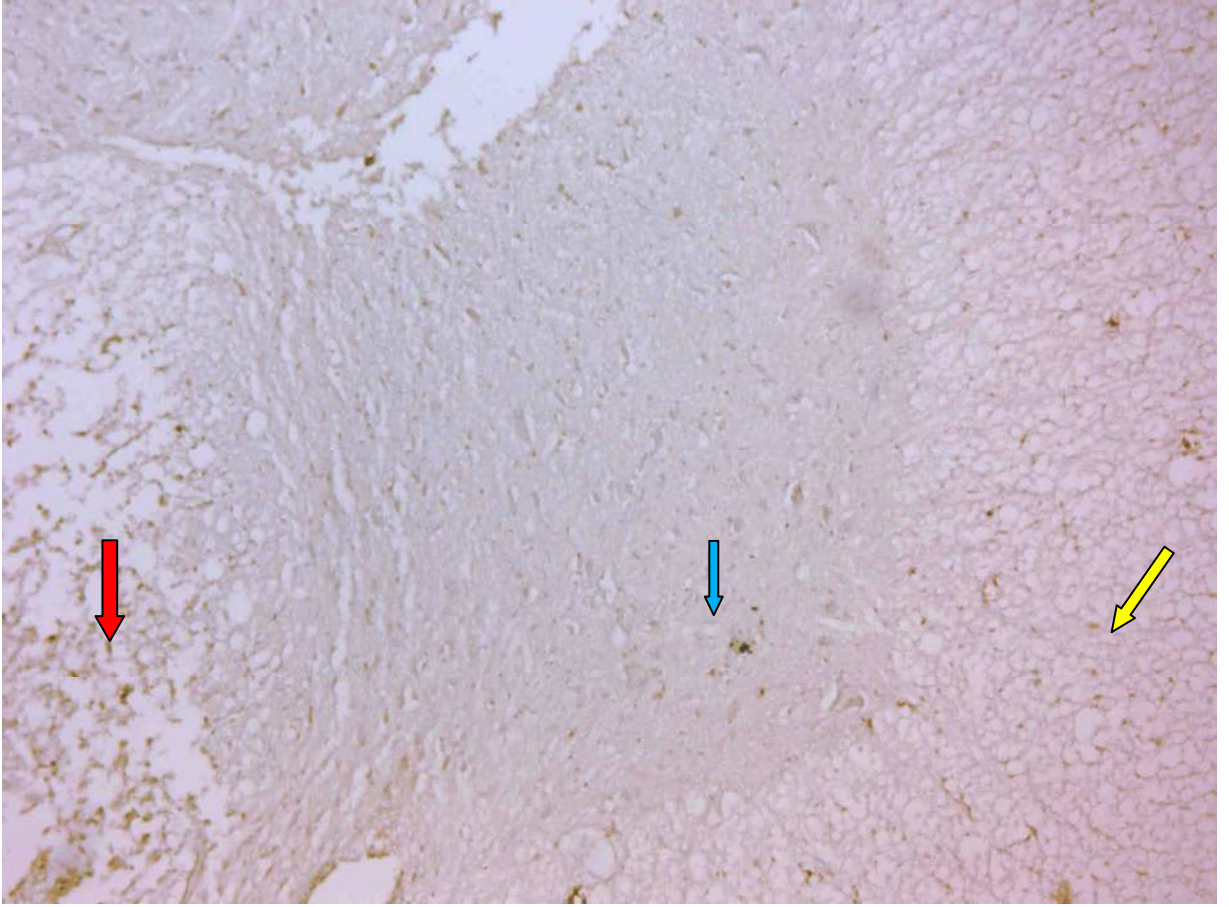
Resim 7. 1 günlük kontrol grubunda doku bütünlüğünün bozulduğu sahada ilk gün içinde ortaya çıkan apoptag pozitif hücreler kahverengi renkte görülebilmektedir (K-I, TUNELx200)



Resim 8. 7 günlük kontrol grubunda doku bütünlüğünün bozulduğu kordda çok sayıda kahverengi renkte boyanmış apoptag pozitif hücre izlenmekte (K-II, TUNELx200)



Resim 9. 1 günlük deney grubunda az sayıda apoptag pozitif hücre(ok) seçilmekte (D-I, TUNELx100)



Resim 10. 7 günlük deney grubunda apoptag pozitif hücre sayısının az oluşu dikkat çekmekte. Yine gri cevherdeki(mavi ok) hücre sayısı beyaz cevhere(sarı ok) göre daha az olarak izlenmekte. Travmanın yoğun olduğu bölgede(kırmızı ok) pozitif hücre sayısı kontrol grubundan az olmakla birlikte komşu sahalardan daha fazla sayıda izlenmekte(D-II, TUNELx100).

4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tablo I, II, III ve IV’ de sunulmuş olan tüm hücre sayıları istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirmede tüm analizler iki yönlü varyans analiziyle yapıldı. Elde edilen sonuçlar Tablo V’ de belirtilmiştir.

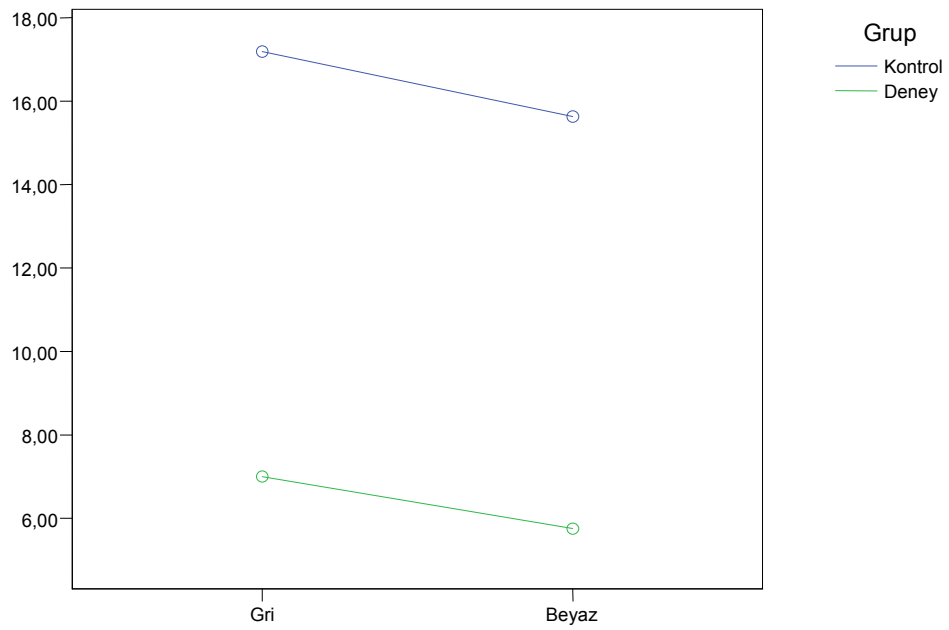
Tablo 7. İstatistiksel Analiz Sonuçları

GÜN	GRUP	HÜCRE	N	Ortalama	Std. Deviasyon	Mediyan	Minimum	Maksimum
1. gün	kontrol	gri	8	17.1875	2.13705	17.0000	13.50	20.00
		beyaz	8	15.6250	3.55317	15.0000	12.00	23.50
		Total	16	16.4063	2.94516	16.2500	12.00	23.50
	deney	gri	8	7.0000	2.93987	7.0000	3.50	12.00
		beyaz	8	5.7500	3.70328	5.0000	1.50	11.50
		Total	16	6.3750	3.29393	6.2500	1.50	12.00
	Total	gri	16	12.0938	5.81727	12.7500	3.50	20.00
		beyaz	16	10.6875	6.18836	11.7500	1.50	23.50
		Total	32	11.3906	5.95106	12.0000	1.50	23.50
7. gün	kontrol	gri	8	17.6875	4.30064	17.5000	12.00	26.50
		beyaz	8	10.4375	1.98993	10.7500	6.50	13.50
		Total	16	14.0625	4.94933	12.7500	6.50	26.50
	deney	gri	8	7.6875	2.03430	8.5000	3.50	9.50
		beyaz	8	6.8125	1.06695	7.0000	5.00	8.00
		Total	16	7.2500	1.63299	7.5000	3.50	9.50
	Total	gri	16	12.6875	6.10157	10.7500	3.50	26.50
		beyaz	16	8.6250	2.42556	8.0000	5.00	13.50
		Total	32	10.6562	5.01198	9.2500	3.50	26.50

5.1. Elde edilen istatistik sonuçlarına göre:

1. gün için:

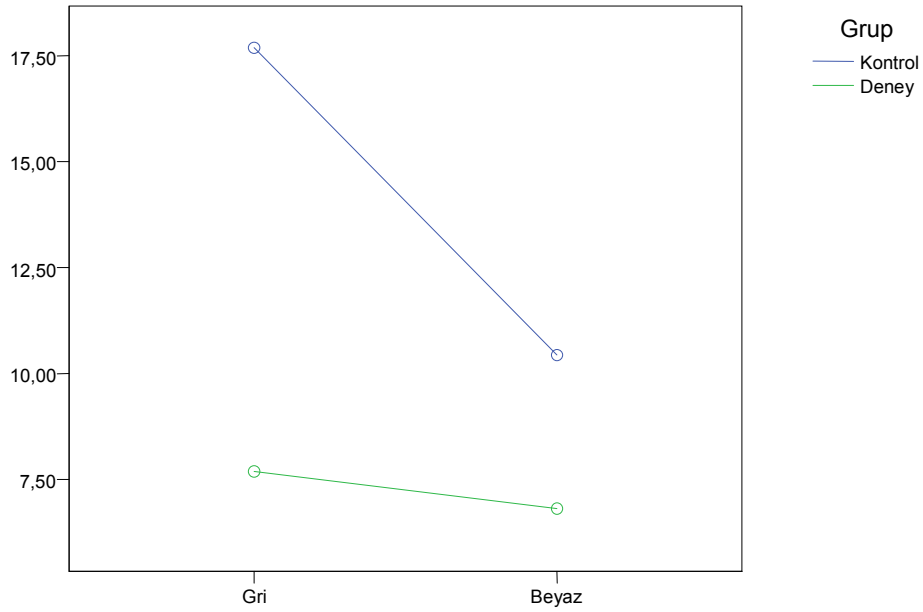
- ✓ Kontrol ve deney grupları arasında farklılık var ($p=0,00000008$)
- ✓ Gri ve beyaz hücreler arasında farklılık yok ($p=0,216$)
- ✓ Hücre ile grup (kontrol-deney) etkileşimi önemsiz ($p=0,889$), yani kontrol grubunda gri-beyaz farkı ile deney grubundaki gri-beyaz farkı aynı (Grafik 1).



Grafik 1. Hücre ile grup etkileşimini gösterir grafik (1. Gün)

7. gün için:

- ✓ Kontrol ve deney grupları arasında farklılık var ($p=0,000005$)
- ✓ Gri ve beyaz hücreler arasında farklılık var ($p=0,0001$)
- ✓ Hücre ile grup (kontrol-deney) etkileşimi önemli ($p=0,002$), yani kontrol grubunda gri-beyaz farkı daha fazla iken, deney grubunda gri-beyaz farkı daha az (Grafik 2).



Grafik 2. Hücre ile grup etkileşimini gösterir grafik (7. Gün)

5. TARTIŞMA

Ciddi morbidite ve mortalite nedeni olan spinal kord travmasıyla mücadelenin önemi açıktır. Bu nedenle son derece hassas bir yapıya sahip olan spinal kordun travmayı en az hasarla atlatabilmesi ve ileriye dönük korunması amaçlı birçok medikal ve/veya cerrahi tedavi prensibi bulunmuştur, denenmektedir ve de denenecektir.

Daha önceki bölümlerde de bahsettiğimiz gibi primer hasarlanmayla mücadelede seçeneklerimiz hala çok sınırlıdır. Bununla birlikte bilinmektedir ki sekonder hasarlanma daha uzun sürmekte, daha önemli yer tutmakta ve morbidite ve mortalitenin düşürülmesinde esas hedef olmaktadır. Bu yüzden spinal travmanın sekonder hasarlanma basamağı nöroşirürjiyenlerin daha çok ilgi ve dikkatini çekmekte ve birçok çalışmanın konusu olmaktadır. Bu safhada özellikle apoptozis mekanizması spinal kordda sekonder hasarlanmanın önemli mekanizmalarından biri olarak görülmektedir(14, 15, 18, 19, 98, 99, 100, 124).

Bao ve ark. deneysel olarak kord travma sahasında nitrik oksit, peroksinitrit ve oksijen konsantrasyonlarının yüksek olduğunu ve antioksidanların bu mekanizmaları ve dolayısıyla apoptozisi de önlediğini göstermişlerdir(14, 15).

Spinal kordda hasarlanma alanında travmayı takip eden 24 saat içinde beyaz cevherdeki astrositler ve oligodendrositlerin yaklaşık %50' sinin öldükleri bilinmekle birlikte Beattie ve ark. travmayı takip eden haftalar boyu çevreleyen sahadaki glial hücrelerin apoptotik mekanizmalarla ölmeye devam ettiğini göstermişlerdir(19).

Deneysel spinal kord travması çalışmalarında ilk 24 saat içinde potansiyel proapoptotik transkripsiyonal değişiklikler bulunmuştur(107, 114, 136).

Nesic ve ark.'nın 2001 yılında yaptıkları deneysel bir çalışmada ratlarda spinal kord travma modellerinde proinflamatuvar sitokin IL-1 ekspresyonunda artış olduğunu ve bunun sonucu olarak IL-1 reseptörlerinin ve takiben de apoptosisin aktive olduğunu ve kaspaz-3 aktivitesinin de arttığını göstermişlerdir. Sonrasında glutamat reseptör aktivasyonu, artmış hücre içi kalsiyum ve calpain, TNF- α veya hücre siklus düzenleyicilerinin ekspresyonunda değişiklikler gibi apoptozise götüren birçok yolak deneysel modellerle gösterilmiştir(40, 106, 136, 147).

Mikroglia ve oligodendrosit hücrelerindeki apoptotik ölümler yüzünden posttravmatik dönem iyileşme safhasında uygunsuz, bozuk myelinizasyon ve bozuk aksonal transmisyon oluşacaktır. Yani apoptotik mekanizmalar geç dönemde oluşacak aksonal rejenerasyonun da düzgün temininin önünde engeldir(124).

Sekonder hasarlanmada apoptozisin rolü ve götüren yolakların gösterilmesiyle bu yolu bloke ederek fayda sağlaması amaçlı birçok ajan deneysel olarak kullanılmıştır. Yune ve ark.(147) bu amaçla 17-beta östradiol kullanmış ve faydası olduğunu deneysel olarak göstermişlerdir. Yine başka bir çalışmada eritropoetin'in psottravmatik spinal kordda apoptozise karşı önleyici etki gösterdiği gösterilmiştir(5,134).

Luo J ve Shi R yakın zamanda yaptıkları deneysel çalışmada polietilen glikolün spinal travmayı takip eden dönemde apoptotik hücre ölümünü inhibe ettiğini göstermişlerdir. Polietilen glikolün hücre membranı ve mitokondri membranı stabilizasyonu yaparak nöroprotektif etki gösteren bir ajan olduğu önceden bilinmekteyken bu çalışmada sitokrom c salınımını baskıladığı, bu şekilde apoptozise gidişi önlediği ifade edilmiştir(100).

Çalışmamızın konusu olan 5-HT₂ reseptör grubunun kraniyal veya spinal iskemi veya travmaya sekonder hasarlanma mekanizmalarında apoptotik hücre ölümleriyle ilişkili olduğu

gösterilmiştir. Capela ve arkadaşlarının 2006 ve 2007 yıllarında yaptıkları çalışmalarda ecstasy (MDMA) kullanılmıştır. MDMA' nın serotoninerjik, özellikle 5-HT_{2A} reseptör yolları üzerinden apoptotik hücre ölümüne neden olduğu belirtilmiş, bir 5-HT₂ bloker ajan olan Ketanserin kullanılarak da apoptozisin önüne geçilebildiği gösterilmiştir(23, 24).

Yine bu bağlamda 5-HT₂ reseptör bloker ajanların diğer organlarda da apoptozisi önleyerek hücre hasarına karşı organı koruyucu etkinliği olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin sarpogrelate kardiyovasküler cerrahların çalışmalarına konu olan ve aterosklerotik darlıkları olan hastaların tedavisinde kullanılan bir ajandır(78). Sarpogrelate' ın kardiyak dokuda antiapoptotik etki göstererek kardiyomiyositlerin apoptotik yolaklarla ölümünü engellediği, postiskemik miyokard disfonksiyonuna karşı protektif etkisi olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. (104, 115).

Bu bahsedilen mekanizmalar ve deneysel çalışmalar ışığında bir 5-HT₂ reseptör bloker atipik antipsikotik olan Quetiapine (Serequel®)' in travmatik spinal kord hasarlanmasında apoptotik hücre ölümlerini engelleyici ve travmanın sekonder zararlarını azaltıcı etkisi olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda oluşturulan spinal travmanın 1 ve 7 gün sonrasında incelemeler yapılarak akut ve subakut safhada koruyucu etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre histopatolojik olarak quetiapine' in koruyucu etkisi olduğu görüldü ve istatistiksel olarak kanıtlandı. Kontrol grubunda travma sahasındaki dejenerasyon ve dokuda ödem belirgin iken deney grubunda doku bütünlüğünün daha korunmuş görüldüğü izlendi.(ŞEKİL)

İmmünohistokimyasal incelemede kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayılarının deney grubunda düşük olduğu gözlemlendi. Hem 1 günlük takip grupları arasında (p=0,00000008), hem de 7 günlük takip grupları arasında (p=0,000005) istatistiksel olarak

anlamalı fark mevcuttu. Bir ilginç nokta da her iki deney grubunda (D-I ve D-II) kord posteriorunda daha travmatize görünen kord sahasında yani primer hasarlanma bölgesi olarak düşünülen sahada apoptotik hücreler çoğunlukta iken komşu sahalarda apoptotik hücre sayısının son derece az olduğu idi. Bu durum komşu sahanın korunduğu şeklinde yorumlandı.(şekil)

Çalışmamızda gri ve beyaz cevherdeki apoptotik hücre sayıları ayrı ayrı da değerlendirildi. Bir gün takipli kontrol (K-I) ve deney (D-I) grupları arasında hücre ile grup (kontrol-deney) etkileşimi önemsiz iken 7 gün takipli gruplarda (K-II ve D-II) hücre ile grup (kontrol-deney) etkileşimi önemli ($p=0,002$), yani kontrol grubunda gri-beyaz farkı daha fazla iken, deney grubunda gri-beyaz farkı daha az olarak bulundu. Bu durum da subakut dönemde quetiapinin gri cevher hücrelerinde beyaz cevher hücrelerine göre daha iyi korunma sağladığı şeklinde yorumlandı. Bu durum immunohistokimyasal incelemede de beyaz cevherde gri cevhere göre daha yoğun apoptotik hücre varlığı olduğu şeklinde gözlemlendi.(şekil)

6. SONUÇ

Quetiapine' in psikiyatride kendine bulduğu ve iyi bilinen geniş kullanım alanının yanında travmatik beyin hasarı olan hastaların posttravmatik dönem tedavisinde, ajitasyon ve agresyonun kontrolünde faydalı olacağına dair çalışmalar mevcuttur. Posttravmatik stres bozukluğunun tedavisinde de kullanılmaktadır. Yani nöroşirurji hastalarının tedavilerinde yardımcı bir terapötik ajan olarak kullanımının faydalı olacağı açık olup spinal travmaya maruz kalmış hastaların da posttravmatik takiplerinde yer edinecek quetiapine çok yönlü fayda sağlayabilecektir.

Spinal kord travmasında sekonder hasarlanmanın ne kadar önem arz ettiği ve tedaviye yönelik çalışmaların bu safhaya yoğunlaştığı açıktır. Sekonder hasarlanmanın çok önemli bir mekanizmasını da apoptotik yollar oluşturmaktadır. Yaptığımız çalışma da göstermiştir ki kliplleme yöntemiyle oluşturulan deneysel spinal kord travmasında quetiapine 5-HT₂ reseptör bloker etkisine bağlı olarak hücreleri apoptotik ölüme yani sekonder hasarlanmanın önemli bir mekanizmasına karşı koruyucu gözükmektedir. Bu nedenle Quetiapine, posttravmatik stres bozukluğu, ajitasyon, agresyon ve depresyon tedavisindeki yeri de düşünüldüğünde spinal kord hasarlanmalı hastaların tedavisinde hasarlı kordun tedavisinde de kullanılabilecek çok yönlü bir tedavi seçeneği olabilir. Ancak klinikte rutin kullanımı için ileri çalışmalarla desteklenmesinin gerektiği, nöron ve glial hücre düzeyinde oluşacak etkilerin moleküler düzeyde çalışmalarla aydınlatılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

7. ÖZET

Spinal kord travmasında sekonder hasarlanma döneminin ve yine bu dönemde kordda oluşacak hasarla mücadelenin tedavideki yerinin önemi iyi bilinmektedir. Bu nedenle bu dönem birçok deneysel araştırmanın konusu olmuştur ve olmaya devam edecektir.

Çalışmamızda sekonder hasarlanma döneminin en önemli mekanizmalarından olduğu bilinen apoptozisi önlemek adına 5-HT₂ reseptör blokeri bir atipik antipsikotik olan quetiapine(serequel©)' in bir etkinliğinin olup olmadığı araştırıldı. Wistar cinsi 32 adet dişi rat 4 eşit gruba ayrılarak tüm deney hayvanların T6 vertebra seviyelerinde total laminektomi yapıp Yaşargil FT280T geçici anevrizma klibiyle ekstradural kliplleme yöntemiyle spinal kord travması oluşturuldu. Travma sonrası 1(D-I) ve 7(D-II) gün yaşatılan deney gruplarına 10mg/kg/gün quetiapine intraperitoneal olarak verildi. Yine 1(K-I) ve 7(K-II) gün yaşatılan kontrol gruplarına herhangi bir medikasyon uygulanmadı. 1. ve 7. gün sonunda denekler kurban edilmek üzere çıkarılan spinal kord örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal tekniklerle incelenerek oluşan histopatolojik değişiklikler ve apoptotik hücre sayıları karşılaştırıldı.

Quetiapine' in spinal kord üzerinde hem 1. hem de 7. gün gruplarında gri ve beyaz cevherde apoptozise karşı koruyucu etkisi olduğu gösterildi. Sonuç analizlerinin istatistiksel incelemesi de anlamlıydı. Ayrıca 7. gün gruplarında istatistiksel olarak da anlamlı olacak şekilde gri cevher hücrelerinin beyaz cevher hücrelerine göre daha iyi korunduğu şeklinde de sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlar ışığında quetiapine' in spinal kord travmasının sekonder evresinin etkilerine karşı spinal kord koruyucu etkisinin yanında posttravmatik stres, ajitasyon ve depresyon için de kullanılabileceği düşünüldüğünde spinal travmalı hastalarda kendisine çok yönlü bir tedavi seçeneği olarak yer bulabileceği düşünülmüştür

8. SUMMARY

The importance of treatment modalities against damage on spinal cord at second phase of spinal cord injury is well known. So, numerous experimental studies have been focused on this phase.

Effectiveness of Quetiapine (Serequel©), a 5-HT₂ receptor blocker atypical antipsychotic agent, on apoptosis that is one of the major mechanisms of secondary damage on spinal cord was researched in our study. 32 female Wistar rats were separated to 4 equal groups. Total laminectomy was performed at T₅₋₇ level and spinal cord injury was produced by using Yasargil FT280T temporary aneurysm clip. Each rat was daily injected ip with Quetiapine (10mg/kg/day) at 1 day (D-I) and seven day (D-II) groups. Control groups of 1 day (K-I) and 7 day (K-II) were performed no treatment. At the end of follow up periods all animals were killed and spinal cords were removed. Apoptotic cells were evaluated by using immunohistochemical technique (TUNEL) in injured spinal cord specimens.

We showed that, Quetiapine had a protective effect against apoptosis of injured D-I and D-II spinal cord groups. All the results were significant statistically. In addition, we saw that, this agent had more protective effect on gray matter cells than white matter cells at 7 day group(D-II). As a result, our findings were suggested that Quetiapine had protective effect on secondary damage of spinal cord injury and it could be a versatile treatment agent by thinking its effectiveness on posttraumatic stress disorder, depression and agitation.

9. KAYNAKLAR

1. Afford S, Randhawa S: Apoptosis. *Mol Pathol* 53: 55–63, 2000
2. Altamura AC, Salvadori D, Madaro D, Santini A, Mundo E: Efficacy and tolerability of quetiapine in the treatment of bipolar disorder: preliminary evidence from a 12-month open-label study. *J Affect Disord* 76: 267–271, 2003
3. Alvanitis LA, Miller BG: Multiple fixed doses of "Seroquel" (quetiapine) in patients with acute exacerbation of schizophrenia: a comparison with haloperidol and placebo. The Seroquel Trial 13 Study Group. *Biol Psychiatry* 15; 42(4): 233–46, Aug 1997
4. Antonsson B: Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306(3): 347–61, Dec 2001
5. Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S: Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. *Spine* 1; 31(21): 2432–8, Oct 2006
6. Assunção Guimarães C, Linden R: Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 271(9): 1638–50, May 2004
7. Atkinson GA, Hellewell JSE, Raniwalla J: Extrapyramidal symptom and tolerability profile of Seroquel® (Quetiapine): an overview of phase II/III placebo controlled trials. *Eur Neuropsychopharmacol* 7 Suppl. 2: 224, Sep 1997
8. Azbill RD, Mu X, Bruce-Keller AJ, Mattson MP, Springer JE: Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury. *Brain Res.* 765: 283–290, 1997

9. Azmitia EC: Serotonin neurons, neuroplasticity and homeostasis of neural tissue. *Neuropharmacology* 21: 33–45, 1999
10. Badawy AA: Alcohol and violence and the possible role of serotonin. *Crim Behav Ment Health* 13: 31–44, 2003
11. Balakumaran A, Campbell GA, Moslen MT: Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139: 122–127, 1996
12. Balcı Ekmekçi Ö, Donma O, Ekmekçi H: Programlı hücre ölümü: Apoptozis. *Sendrom* 16: 14–23, 2004
13. Balla A, Tóth B, Timár G, Bak J, Krajcsi P: Molecular targets for pharmacological cytoprotection. *Biochem Pharmacol* 61(7): 769–77, Apr 2001
14. Bao F, Liu D: Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. *Neuroscience* 126(2): 285–95, 2004
15. Bao F, Liu D: Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptotic cell death and activates caspase-3. *Neuroscience* 116(1): 59–70, 2003
16. Barinaga M: Is apoptosis key in Alzheimer's disease? *Science* 281: 1303–1304, 1998
17. Bates S, Vousden KH: Mechanisms of p53 mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 55: 28–37, 1999
18. Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC: Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17(10): 915–25, Oct 2000
19. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC: Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137: 37–47, 2002

20. Boise LH, Gottschalk AR, Quintas J, Thompson JB: Bcl-2 and Bcl-2 related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 200: 107–121, 1995
21. Bregman BS, Reier PJ. Neural tissue transplants rescue axotomized rubrospinal cells from retrograde death. *J Comp Neurol* 244: 86–95, 1986
22. Cai J, Ziemba KS, Smith GM, Jin Y: Evaluation of cellular organization and axonal regeneration through linear PLA foam implants in acute and chronic spinal cord injury. *J Biomed Mater Res A* 14: May 2007
23. Capela JP, Fernandes E, Remião F, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F: Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons. *Neurotoxicology* 28(4): 868–75, Jul 2007
24. Capela JP, Ruscher K, Lautenschlager M, Freyer D, Dirnagl U, Gaio AR, Bastos ML, Meisel A, Carvalho F: Ecstasy-induced cell death in cortical neuronal cultures is serotonin 2A-receptor-dependent and potentiated under hyperthermia *Neuroscience* 139(3): 1069–81, 2006
25. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L: Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 151(1): 77–88, May1998
26. Chan SL, Mattson MP: Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res* 58: 167–190, 1999
27. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y: A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 29; 7(1): 61–4, Dec 1995
28. Chey WD: Tegaserod and other serotonergic agents: what is the evidence? 3: 35–40, 2003

29. Cloutier F, Siegenthaler MM, Nistor G, Keirstead HS: Transplantation of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors into rat spinal cord injuries does not cause harm. *Regen Med* 1(4): 469–79, Jul 2006
30. Cohen JJ: Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126–130, 1993
31. Cohen JJ: Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract* 15; 28(12): 35–43, Dec 1993
32. Collins WF. A review of treatment of spinal cord injury. *Br J Surg* 71(12): 974–975, 1984
33. Cornea-hebert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L: Cellular and Subcellular distribution of the Serotonin 5-HT_{2A} Receptor in the Central Nervous System of Adult Rat. *J Comp Neurol* 28; 409(2): 187–209, Jun 1999
34. Correll CU, Leucht S, Kane JM: Lower risk for tardive dyskinesia associated with second-generation antipsychotics: a systematic review of 1-year studies. *Am J Psychiatry* 161(3): 414–425, Mar 2004
35. D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG: Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114(Pt 20): 3771–8, Oct 2001
36. Das A, Sribnick EA, Wingrave JM, Del Re AM, Woodward JJ, Appel SH, Banik NL, Ray SK: Calpain activation in apoptosis of ventral spinal cord 4.1 (VSC4.1) motoneurons exposed to glutamate: calpain inhibition provides functional neuroprotection. *J Neurosci Res* 81(4): 551–62, Aug 2005
37. David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system “bridges” after central nervous system injury in adult rats. *Science* 214: 931–933, 1981

38. Demediuk P, Lemke M, Faden AI: Spinal cord edema and changes in tissue content of Na⁺, K⁺, and Mg²⁺ after impact trauma in rats. *Adv Neurol* 52: 225–32, 1990
39. DeVane CL, Nemeroff CB. Clinical pharmacokinetics of Quetiapine: an atypical antipsychotic. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (7): 509–522
40. Di Giovanni S, Knobloch SM, Brandoli C, Aden SA, Hoffman EP, Faden AI: Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle neuronal death. *Annals of Neurology* 53: 454–468, 2003
41. Doder M, Rabiner EA, Turjanski N, Lees AJ, Brooks DJ: Tremor in Parkinson's disease and serotonergic dysfunction: an 11C-WAY 100635 PET study. *Neurology* 60: 601–605, 2003
42. Doherty MD, Pickel VM: Ultrastructural localization of the serotonin 2A receptor in dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res* 12; 864(2): 76–85, May 2000
43. Ellenbroek BA, Lubbers LJ, Cools AR. Activity of "seroquel" (ICI 204,636) in animal models for atypical properties of antipsychotics: a comparison with clozapine. *Neuropsychopharmacology*. 1996 Oct; 15(4): 406–16
44. Fishelson Z, Attali G, Mevorach D: Complement and apoptosis. *Mol Immunol* 38(2–3): 207–19, Aug 2001
45. Fleisher TA: Apoptosis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 78(3): 245–9, Mar 1997
46. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC: The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129(Pt 12): 3249–69, Dec 2006
47. Friedlander RM: Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 348: 1365–1375, 2003

48. Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, Tsururo T: Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-XL protein by caspase-3 like proteases. *Oncogene* 17: 1295–1304, 1998
49. Gefvert O, Bergstrom M, Langstrom B, et al. Time course of central nervous dopamine-D2 and 5-HT2 receptor blockade and plasma drug concentrations after discontinuation of Quetiapine (Seroquel) in patients with schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 1998 Jan; 135 (2): 119–126
50. Geske FJ, Gerchenson LE: The biology of apoptosis. *Hum Pathol* 32: 1029–1038, 2001
51. Gibson RM: Does apoptosis have a role in neurodegeneration? *BMJ* 23; 322(7301): 1539–40, Jun 2001
52. Glennon RA, Dukat M, Westkaemper RB, Ismaiel AM, Izzarelli DG, Parker EM: The binding of propranolol at 5-hydroxytryptamine1D beta T355N mutant receptors may involve formation of two hydrogen bonds to asparagine. *Mol Pharmacol* 49(1): 198–206, Jan 1996
53. Glennon RA, Dukat M, Westkaemper: Serotonin receptor subtypes and ligands. *Neuropharmacology The 4th Generation of Progress*, 2000
54. Goldstein JM. Preclinical profile of Seroquel (Quetiapine): an atypical antipsychotic with clozapine-like pharmacology. *Schizophrenia: breaking down the barriers*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1996: 177–236
55. Goodnick PJ: Use of antidepressants in treatment of comorbid diabetes mellitus and depression as well as in diabetic neuropathy. *Ann Clin Psychiatry* 13: 31–41, 2001
56. Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM: Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* 78(8): 893–913, Aug 1998

57. Green DR: Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-698, 1998
58. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR: Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol* 168(2): 273–82, Apr 2001
59. Gunasekara NS, Spencer CM. Quetiapine: a review of its use in schizophrenia. *CNS Drugs* 1998 Apr; 9 (4): 325–340
60. Gutknecht L, Jacob C, Strobel A, Kriegebaum C, Muller J, Zeng Y, Markert C, Escher A, Wendland J, Reif A, Mossner R, Gross C, Brocke B, Lesch KP: Tryptophan hydroxylase–2 gene variation influences personality traits and disorders related to emotional dysregulation. *Int J Neuropsychopharmacol* 10(3): 309–20, Jun 2007
61. Gültekin H: Serotonin. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 1(1): 45–54, 2005
62. Haddjeri N, Blier P, de Montigny C: Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci* 18: 10150–6, 1998
63. Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, Fukuzawa K: Involvement of an intercellular adhesion molecule 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J. Neurochem* 66: 1525–1531, 1996
64. Hamamori Y, Yokoyama M, Yamada M, Akita H, Goshima K, Fukuzaki H: 5-hydroxytryptamine induces phospholipase C-mediated hydrolysis of phosphoinositides through 5-hydroxytryptamine-2 receptors in cultured fetal mouse ventricular myocytes. *Circ Res* 66: 1474–1483, 1990
65. Hammang JP, Archer DR, Duncan ID: Myelination following transplantation of EGF-responsive neural stem cells into a myelindeficient environment. *Exp Neurol* 147: 84 – 95, 1997

66. Hamner MB, Arvanitis LA, Miller BG, Link CG, Hong WW: Plasma prolactin in schizophrenia subjects treated with Seroquel (ICI 204,636). *Psychopharmacol Bull* 32(1): 107–110, 1996
67. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70, 2000
68. Hardman JG, Limbird LE: *The Pharmacological Basis of Therapeutics: Goodman & Gilman's* 10. Baskı, 2001.
69. Hashizume H, Kawakami M, Yoshida M, Okada M, Enyo Y, Inomata Y. Sarpogrelate Hydrochloride, a 5-HT_{2A} Receptor Antagonist, Attenuates Neurogenic Pain Induced by Nucleus Pulposus in Rats. *SPINE* Volume 32, Number 3, pp 315–320, 2007
70. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770–776, 2000
71. Hetz CA, Torres V, Quest AF: Beyond apoptosis: nonapoptotic cell death in physiology and disease. *Biochem Cell Biol* 83(5): 579–88, Oct 2005
72. Hirata H, Takahashi A, Kobayashi S, Yonehara S, Sawai H, Okazaki T, Yamamoto K, Sasada M: Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J Exp Med* 16; 187(4): 587–600, Feb 1998
73. Hoyer D, Hannon JP, Martin GR: Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71: 533–554, 2002
74. Hsu CY, Halushka PV, Hogan EL, Banik NL, Lee WA, Perot PL: Alteration of thromboxane and prostacyclin levels in experimental spinal cord injury. *Neurology* 35: 1003–1009, 1985
75. Inui A: Neuropeptid Y: a key molecule in anorexia and cachexia in wasting disorders? *Molecular medicine today* 2: 79–85, 1999

76. Ishii K, Toda M, Nakai Y, Asou H, Watanabe M, Nakamura M, YatoY, Fujimura Y, Kawakami Y, Toyama Y, Uyemura K: Increase of oligodendrocyte progenitor cells after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 65: 500–507, 2001
77. Işıldı E: Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Nimodipin ve Fenitoinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji A.D. Uzmanlık Tezi, 2006
78. Iwakuma, H. Electroencephalographical effects of sarpogrelate hydrochloride versus ticlopidine hydrochloride in elderly patients with peripheral atherosclerosis. *Journal of International Medical Research* 2004; 32: 274–283
79. Jones RK, Searle RF, Bulmer JN: Apoptosis and bcl-2 expression in normal human endometrium, endometriosis and adenomyosis. *Reprod* 13(12): 3496-502, Dec 1998
80. Kakulas BA: The applied neuropathology of human spinal cord injury. *Spinal Cord* 37(2): 79–88, 1999
81. Kanayama M, Hashimoto T, Shigenobu K, et al. New treatment of lumbar disc herniation involving 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor inhibitor: a randomized controlled trial. *J Neurosurg Spine* 2005; 2: 441–446
82. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacrose R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacrose S, Simone S, Bucci R, Farber E: Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21(1): 165–70, Jul 2002
83. Kasper S, Müller-Spahn F. Review of Quetiapine and its clinical applications in schizophreina. *Expert Opin Pharmacother* 2000 May; 1 (4): 783–801
84. Kayaalp O: Tıbbi Farmakoloji (Hacettepe TAŞ, Ankara). 10. Baskı, 2002
85. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O: Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate

- and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci*; 25(19): 4694–705, May 2005
86. Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC: Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest* 108(9): 1291–8, Nov 2001
 87. Kim E, Bijlani B. A pilot study of Quetiapine treatment of aggression due to traumatic brain injury. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2006; 18: 4, 547–549
 88. Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM, Andreeff M: Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 457: 217–36, 1999
 89. Koukoulis GK, Shen J, Karademir S, Jensen D, Williams J: Cholangiocytic apoptosis in chronic ductopenic rejection. *Hum Pathol* 32(8): 823–7, Aug 2001
 90. Kwo S, Young W, Decrescito V: Spinal cord sodium, potassium, calcium, and water concentration changes in rats after graded contusion injury. *J Neurotrauma* 6(1): 13–24, Summer 1989
 91. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR: Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 4(4): 451–464, Jul-Aug 2004
 92. Laer S, Remmers F, Scholz H, Stein B, Muller FU, Neumann J: Receptor mechanisms involved in the 5-HT-induced inotropic action in the rat isolated atrium. *Br J Pharmacol* 123: 1182–1188, 1998
 93. Lee KH, Yoon DH, Park YG, Lee BH: Effects of glial transplantation on functional recovery following acute spinal cord injury. *Neurotrauma* 22(5): 575–89, May 2005

94. Lemke M, Faden AI: Edema development and ion changes in rat spinal cord after impact trauma: injury dose-response studies. *J Neurotrauma* 7(1): 41–54, Spring 1990
95. Lesch KP, Zeng Y, Reif A, Gutknecht L: Anxiety-related traits in mice with modified genes of the serotonergic pathway *Eur J Pharmacol* 480: 185–204, 2003
96. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 14; 91(4): 479–89, Nov 1997
97. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 12; 86(1): 147–57, Jul 1996
98. Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 18; 89(2): 175–84, Apr 1997
99. Lu J, Ashwell KW, Waite P: Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine* 25: 1859–1866, 2000
100. Luo J, Shi R. Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury. *Brain Res* 25; 1155: 10–6, Jun 2007
101. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146(1): 3–15, Jan 1995
102. McConville BJ, Arvanitis LA, Thyrum PT, et al. Pharmacokinetics, tolerability and clinical effectiveness of Quetiapine fumarate: an open label trial in adolescents with psychotic disorders. *J Clin Psychiatry* 61 (4): 252–260, Apr 2000
103. Moore KL, Dalley AF: Sırt (Bl.4): Kliniğe Yönelik Anatomi. Ersoy M, Peker T. (çev.), Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia): 432–502, 2007

104. Muto T, Hotta Y, Miyazeki K, Hiroaki A, Ishikawa N, Hasegawa T, Sugimoto Y, Yamada J, Miki Y. Protective effects of sarpogrelate, a 5-HT_{2A} antagonist, against postischemic myocardial dysfunction in guinea-pig hearts. *Molecular and Cellular Biochemistry* 272: 119–132, 2005.
105. Naderi S, Türe U, Pait TG: History of the spinal cord localization. *Neurosurg Focus*. 15; 16(1): E15, Jan 2004
106. Nesic O, Xu GY, McAdoo D, High KW, Hulsebosch C, Perez-Pol R: IL–1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase–3 activation after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18(9): 947–56, Sep 2001
107. Nesic-Taylor O, Cittelly D, Ye Z, Xu GY, Unabia G, Lee JC, Svrakic NM, Liu XH, Youle RJ, Wood TG, McAdoo D, Westlund KN, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR: Exogenous Bcl-xL fusion protein spares neurons after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 79(5): 628–37, Mar 2005
108. Okano H, Ogawa Y, Nakamura M, Kaneko S, Iwanami A, Toyama Y: Transplantation of neural stem cells into the spinal cord after injury. *Semin Cell Dev Biol* 14: 191–198, 2003
109. Oren M, Rotter V: Introduction: p53-the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 55: 9–11, 1999
110. Orsetti M, Canonigo PL, Dellarole A, Colella L, DiBrisco F, Ghi P. Quetiapine prevents anhedonia induced by acute or chronic stress. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Aug; 32(8): 1783–90
111. Otsuki Y: Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc* 34(3): 166-73, Sep 2001
112. Parr AM, Kulbatski I, Tator CH: Transplantation of adult rat spinal cord stem/progenitor cells for spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24(5): 835–45, May 2007

113. Peroutka SJ, Howell TA: The molecular evolution of G protein-coupled receptors: Focus on 5-hydroxytryptamine receptors. *Neuropharmacology* 33: 319-24, 1994
114. Qiu J, Nesic O, Ye Z, Rea H, Westlund KN, Xu GY, McAdoo D, Hulsebosch CE, Perez-Polo JR: Bcl-xL expression after contusion to the rat spinal cord. *J Neurotrauma* 18(11): 1267–78, Nov 2001
115. Rajesh KG, Suzuki R, Maeda H, Murio Y, Sasaguri S. 5-HT₂ receptor blocker sarpogrelate prevents downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2 and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Life Sci.* 2006 Sep 27; 79(18): 1749–55
116. Rang HP, Dale MM: *Pharmacology*, Churchill-Livingstone, 4th edition, 1999
117. Rapport MM, Green AA, Page IH: Serum vasoconstrictor (serotonin). Isolation and characterization. *J. Biol Chem* 176: 1243-51, 1948
118. Robertson GS, Matsumura H, Fibiger HC. Induction Patterns of Fos-Like Immunoreactivity in the Forebrain as Predictors of Atypical Antipsychotic Activity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994 Nov; 271(2): 1058–66
119. Rosenberg LJ, Zai LJ, Wrathall JR: Chronic alterations in the cellular composition of spinal cord white matter following contusion injury. *Glia* 49(1): 107–20, Jan 2005
120. Rutledge SE, Chin JW, Schepartz A: A view to a kill: ligands for Bcl-2 family proteins. *Curr Opin Chem Biol* 6: 479–485, 2002
121. Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA: Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease. *Am J Med* 107(5): 489-506, Nov 1999
122. Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 528–537, 2000

123. Savinov AY, Tcherepanov A, Green EA, Flavell RA, Chervonsky AV: Contribution of Fas to diabetes development. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(2): 628–32, Jan 2003
124. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res.* 1997 Dec 1; 50(5): 798–808
125. Taoka Y, Okajima K: Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56(3): 341–58, 1998
126. Tator CH, Fehlings MG: Review of clinical trials of neuroprotection in acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus* 15; 6(1): e8, 1999
127. Tator CH, Koyanagi I: Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg* 86(3): 483–92, Mar 1997
128. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5(4): 407–413, 1995
129. Tator CH: Pathophysiology and pathology of spinal cord injury: Neurosurgery. 2.nd ed. Wilkins RH, Renghacory SS (ed) McGraw-Hill, New York 1996, 2847–2861
130. Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456–1462, 1995
131. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312–1316, 1998
132. Tian DS, Xie MJ, Yu ZY, Zhang Q, Wang YH, Chen B, Chen C, Wang W: Cell cycle inhibition attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats. *Brain Res* 1135(1): 177–85, Mar 2007
133. Vaccaro AR, Ahmad SS, Rauschnig W, Garfin SR: Anatomy and Pathophysiology of Spinal Cord Injury: Spine Trauma. Levine AM, Eismont FJ, Garfin SR, Zigler JE (ed) W.B. Saunders, Philadelphia 1998, 75–86

134. Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P, Gorio A, De Biasi S: Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 9; 144(3):865–77, Feb 2007
135. Watanabe H, Kanzaki H, Narukawa S, Inoue T, Katsuragawa H, Kaneko Y, Mori T: Bcl-2 and Fas expression in eutopic and ectopic human endometrium during the menstrual cycle in relation to endometrial cell apoptosis. *Am J Obstet Gynecol* 176(2): 360–8, Feb 1997
136. Watanabe K, Nakamura M, Iwanami A, Fujita Y, Kanemura Y, Toyama Y, Okano H: Comparison between fetal spinal-cord- and forebrain-derived neural stem/progenitor cells as a source of transplantation for spinal cord injury. *Dev Neurosci* 26(2–4): 275–87, Mar-Aug 2004
137. Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG, Ray SK, Hazen-Martin DJ, Hogan EL, Banik NL: Early induction of secondary injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *J Neurosci Res* 73(1): 95–104, Jul 2003
138. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* 142(1): 67–77, Jan 1984
139. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555–556, 1980
140. Xu JA, Hsu CY, Liu TH, Hogan EL, Perot PL Jr, Tai HH: Leukotriene B4 release and polymorphonuclear cell infiltration in spinal cord injury. *J Neurochem* 55(3): 907–12, Sep 1990
141. Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB: Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J Comp Neurol* 351: 145–160, 1995

142. Yakovlev AG, Faden AI: Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol* 23(2-3): 179-90, Oct-Dec 1994
143. Yamanaka A, Muraki Y, Tsujino N, Goto K, Sakurai T: Regulation of orexin neurons by the monoaminergic and cholinergic systems. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 120-129, 2003
144. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN: Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine* 29(9): 966-71, May 2004
145. Yang L, Jones NR, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C, Moore EJ, Manavis J, Sarvestani GT, Ghabriel MN: Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *J Clin Neurosci* 12(3): 276-84, Apr 2005
146. Yoo S, Wrathall JR: Mixed primary culture and clonal analysis provide evidence that NG2 proteoglycan-expressing cells after spinal cord injury are glial progenitors. *Dev Neurobiol* 67(7): 860-74, Jun 2007
147. Yune TY, Kim SJ, Lee SM, Lee YK, Oh YJ, Kim YC, Markelonis GJ, Oh TH: Systemic Administration of 17 β -Estradiol Reduces Apoptotic Cell Death and Improves Functional Recovery following Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *J Neurotrauma* 21(3): 293-306, Mar 2004
148. Zai LJ, Wrathall JR: Cell proliferation and replacement following contusive spinal cord injury. *Glia* 50(3): 247-57, May 2005
149. Zileli M, Gülmen V: Deneysel omurilik yaralanmaları: Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Zileli M, Özer AF (ed) *Meta Basım*, İzmir 2002, 951-956

150. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 108: 99–103, 2001