

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLUŞTURULAN MEDULLA SPİNALİS ZEDELENMESİNDE
AGMATİN, METİLPREDNİZOLON VE RAPAMİSİN'İN TEDAVİ EDİCİ
ETKİLERİNİN IŞIK, ELEKTRON MİKROSKOBİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

DR. TÜLİN FIRAT

BOLU

2010

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OLUŞTURULAN MEDULLA SPİNALİS ZEDELENMESİNDE
AGMATİN, METİLPREDNİZOLON, VE RAPAMİSİN'İN TEDAVİ EDİCİ
ETKİLERİNİN IŞIK, ELEKTRON MİKROSKOBİK VE BİYOKİMYASAL OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
DR. TÜLİN FIRAT

DANIŞMAN
PROF. DR. AYSEL KÜKNER

BOLU
2010

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimime katkılarının yanında, hayatımdaki emeğini ve desteğini de unutamayacağım, insancıl tavırlarıyla da her zaman bizlere örnek olan değerli hocam Prof.Dr. Aysel Kükner'e, tezimin cerrahi girişimlerinde emek ve desteğini esirgemeyen Sayın Yrd.Doç.Dr. Ali Rıza Gezici'ye, tez süresince bana yardımcı olan sevgili Nilüfer Ulaş'a, asistanlık süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Dr.Hakan Terzi'ye, biyokimyasal çalışmaları yapan ve değerlendiren Doç.Dr.Erdiñ Serin'e ve asistan arkadaşlarım Dr.Esra Zor ve Dr.Fatih Özcan'a ve teknisyen Nermin hanıma, elektron mikroskopik değerlendirmelerde desteğini esirgemeyen Prof.Dr. Candan Özoğul'a, her zaman patoloji laboratuvarının teknik imkanlarından faydalanmamıza olanak veren Prof. Dr. Fahri Yılmaz ve Doç. Dr. Çetin Boran'a ve dostça davranan asistan arkadaşlarım ve teknisyenlerine, bilgi ve tecrübesiyle destek olan Doç.Dr. Fatma Töre'ye ve Prof.Dr. Akçahan Gepdiremen'e ve deney hayvanlarının bakımında yardımcı olan Remzi Ulusoy'a teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemi sağlayan, hayatım boyunca destekçim, mesleğime başladıktan sonra yol arkadaşım olan canım anneme, eğitimimdeki katkılarından dolayı babama ve de hayatımı paylaşmaktan sonsuz keyif aldığım, tez dönemim boyunca aflarına sığındığım canım eşime ve çocuklarıma teşekkürlerimle.

Dr. Tülin FIRAT

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Medulla Spinalis Embriyolojisi	4
2.2. Medulla Spinalis Anatomisi	5
2.2.1. Ön ve arka kökler	8
2.2.2. Arterleri ve venleri	8
2.2.3. Zarları	9
2.3. Medulla Spinalis Histolojisi	10
2.3.1. Medulla Spinalisin “Bağ dokusu”: Glia	11
2.3.1.1. Astrositler	12
2.3.1.2. Oligodendrositler	12
2.3.1.3. Mikroglia hücreleri	12
2.3.2. Kan-beyin bariyeri	13
3. OMURİLİK HASARININ TARİHÇESİ	13
4. FİZYO PATOLOJİ	14
5. OMURİLİK HASARINDAKİ PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER	17
5.1. Akut değişiklikler	17
5.2. Glial hücrelerin hasara yanıtı	18
5.3. Subakut Dönem Patolojisi	18
5.4. Kronik dönem patolojisi	19
6. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ	19
7. UYGULANAN TEDAVİLER	21
7.1. Metilprednizolon	21
7.2. Agmatin	22

7.3. Rapamisin	23
8. MATERYAL METOT	24
9. BULGULAR	32
10. TARTIŞMA	52
11. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
12. KAYNAKLAR	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADK: Agmatin dekarboksilaz

AMPA: Alfa-amino-3 hidroksil-5 metil-4-izoksazolepropionik asit

BOS: Beyin omurilik sıvısı

Ca: Kalsiyum

IL-1 β : İnterlökin -1- beta

LHRH: Lüteinize edici hormon salıverici hormon

LTs: Lökotrienler

MDA: Malonal dialdehit

MP: Metilprednizolon

MS: Medulla spinalis

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

mTOR: Mammalian target of rapamycin

NMDAR: N-metil-D-aspartat reseptör

NOS: Nitrik oksit sentaz

PNL: Polimorf nükleer monosit

PON, ONOO⁻: Peroksinitrit anyonu

PSS: Periferik Sinir Sistemi

SOD: Süperoksit dismutaz

TNF- α : Tümör nekroz faktör- alfa

TXA₂: Tromboksan A₂

5-LO : 5-lipoksijenaz

ŞEKİLLER

- Şekil 1:** Medulla Spinalisin Bölgeleri
- Şekil 2:** Medulla spinalisi besleyen arterler
- Şekil 3:** Medulla spinalisin şematik görünümü
- Şekil 4:** Spinal Kord Hasarındaki sekonder hasarın patofizyolojisi
- Şekil 5:** Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu
- Şekil 6:** Agmatin Sentezlenmesinin Basamakları
- Şekil 7:** Hasar alanına ait görüntü
- Şekil 8:** Hasar alanı ait görüntü.
- Şekil 9:** Sham grubuna ait HE boyaması
- Şekil 10:** Sham grubuna ait Luxol Fast Blue boyaması
- Şekil 11:** Sham grubuna ait Luxol Fast Blue boyaması
- Şekil 12:** Hasar grubuna ait HE boyaması
- Şekil 13:** Hasar grubuna ait HE boyaması
- Şekil 14:** Hasar grubu, Luxol Fast blue
- Şekil 15:** Hasar grubu, Luxol Fast blue
- Şekil 16:** Hasar grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 17:** Metilprednizolon grubuna ait HE boyaması
- Şekil 18:** Metilprednizolon grubuna ait HE boyaması
- Şekil 19:** Metilprednizolon grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 20:** Rapamisin grubuna ait HE boyaması
- Şekil 21:** Rapamisin grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 22:** Rapamisin grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 23:** Rapamisin grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 24:** Agmatin grubuna ait HE boyaması
- Şekil 25:** Agmatin grubuna ait HE boyaması
- Şekil 26:** Agmatin grubu, Luxol Fast blue
- Şekil 27:** Agmatin grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 28:** Agmatin grubu, Toluidin blue-Pironin boyaması
- Şekil 29:** Sham grubu, TUNEL
- Şekil 30:** Hasar grubu, TUNEL
- Şekil 31:** Metilprednizolon grubu, TUNEL

Şekil 32: Agmatin grubu, TUNEL

Şekil 33: Rapamisin grubu, TUNEL

Şekil 34: İskemi grubu, elektron mikroskopik görüntü

Şekil 35: Rapamisin grubu, elektron mikroskopik görüntü

Şekil 36. Agmatin grubu, elektron mikroskopik görüntü

Şekil 37. Prednizolon grubu, elektron mikroskopik görüntü

TABLÖLAR

Tablo 1: Hayvan ağırlıkları

Tablo 2: MDA değerleri

Tablo 3: GPx değerleri

Tablo 4: Katalaz değerleri

Tablo 5: SOD değerleri

GRAFİKLER

Grafik 1: Tüm gruplar için ölçülen **MDA** değerleri

Grafik 2: Tüm gruplar için ölçülen **GPx** değerleri

Grafik 3: Tüm gruplar için ölçülen **Katalaz** değerleri

Grafik 4: Tüm gruplar için ölçülen **SOD** değerleri

Bu tez Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından
2009.08.01.305 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

Tülin Fırat, Deneysel oluşturulan medulla spinalis zedelenmesinde agmatin, metilprednizolon ve rapamisin'in tedavi edici etkilerinin ışık, elektronmikroskopik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi, Bolu, 2010. Spinal kord yaralanmaları, önemli bir sosyal ve ekonomik sorundur. Doku zedelenmesi primer ve sekonder yaralanma olarak iki mekanizma ile oluşmaktadır. Primer yaralanma sonucu ortaya çıkan değişiklikler nekrozla sonuçlanır. Takip eden saatler içinde meydana gelen sekonder zedelenme ise dolaşım bozukluğu, inflamatuvar yanıtın durumu kötüleştirilmesi, metabolizmanın bozulması, elektrolit değişiklikleri, serbest oksijen radikallerinin artarak dokuya zarar vermesi, apoptozis, eksitotoksisite gibi olaylarla meydana gelmektedir. Deneysel ve klinik olarak sekonder zedelenmenin önlenmesi yönünde çalışmalar yapılmakta ve medulla spinalis hasarı önlenmeye çalışılmaktadır. Bu çalışmada da deneysel olarak oluşturulan spinal kord hasarına rapamisin ve agmatinin olası etkilerinin araştırılması ve klinikte rutin kullanılan metilprednisolonla karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma, 30 adet Spraque Dawley cinsi erişkin dişi rat ile yapıldı. Sham, hasar ve hasar+metilprednizolon, hasar+rapamisin, hasar+agmatin olmak üzere 5 grup oluşturuldu. T₇₋₈ seviyelerinde spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra tedavi gruplarına bir hafta boyunca hergün ilaç uygulandı. Süre sonunda anestezi altında sakrifiye edilen hayvanların medulla spinalis dokuları ve kan örnekleri alındı. Işık mikroskopik incelemeler için Hematoksilen-Eozin, Luxol Fast Blue boyaları, apoptozisi tesbit etmek için TUNEL yöntemiyle immun boyama yapıldı. Tüm grupların hasarlı medulla spinalis dokuları ince yapı düzeyinde incelendi. Hasar grubunda ödem, nöron, akson ve myelin yapılarında dejenerasyon daha belirgin iken ilaç gruplarında yapı bütünlüğü daha iyi korunmuştu. Biyokimyasal incelemelerde, metilprednizolon ve agmatinin, hasarda artmış olan MDA seviyelerini düşürerek lipid peroksidasyonunu engellediği, rapamisinin olumlu bir etkisinin olmadığı; SOD ve katalaz seviyelerine anlamlı etkinin olmadığı; glutatyon peroksidaz seviyelerini daha çok rapamisin olmak üzere agmatin ve rapamisinin anlamlı olarak düşürmesi serbest oksijen radikallerine verilen cevabı gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak; spinal kord hasarında kullanılan bu ilaçların sekonder cevabı azaltarak, hasarlı alanın genişlemesini azalttığı tespit edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Spinal Kord Hasarı, Metilprednizolon, Rapamisin, Agmatin

SUMMARY

Tülin Fırat. The therapeutic effects of Agmatine, Methylprednisolone and Rapamycine on experimental spinal cord injury and evaluate with light, electronmicroscopy and biochemical datas, Medical Speciality Thesis, Bolu, 2010

Spinal cord injury is an important social and economic problem. Tissue damage occurs with two mechanisms as primary and secondary injury. Necrosis appears as an outcome of primary injury. Secondary injury occurs in following hours such as disturbed circulation, deteriorated conditions with inflammatory response, impaired metabolism, electrolyte imbalance, oxidative stress due to free oxygen radicals, apoptosis and excitotoxicity. Secondary injury became target of therapies because of these mechanisms can be preventive. In the present study it was aimed that to examine the effects of rapamycine, methylprednisolone and agmatine on experimental spinal cord injury in rat by biochemical, light and electron microscopic evaluations. Our study was performed with 30 Spraque Dawley adult female rats. There were 5 groups as Sham control, Injury, Injury+methylprednisolone, Injury+Rapamycine, Injury+ Agmatine. Following the induction of trauma to T₇₋₈ levels, treatment was given everyday for a week. At the end of the time, medulla spinalis and blood samples were collected from sacrificed animals. Hematoxyline- Eosine, Luxol Fast Blue and TUNEL immunreaction for apoptosis staining were performed for light microscopical evaluations. The ultrastructure of injured medulla spinalis tissues were evaluated. Although edema, degeneration of neuron, akson and myelin were significant in injury group, the integrity of structure was well-arranged in treatment groups. Our study showed that, methylprednisolone and agmatine prevents lipid peroxidation by reducing MDA levels, rapamisin increased it. In SOD and catalase levels, there is no significant difference among the groups. Mostly rapamisin and also agmatine decreased the orther antioxidant enzyme glutathione peroxidase levels which attributed to response to free oxygene radicals. The biochemical results showed that, rapamycine significantly decreased SOD and GPx levels, but increased MDA levels; Agmatine decreased GPx levels but not significant alteration occured in SOD levels. As a result, all treatment groups of spinal cord injury decreases secondary response but not prevent completely.

KEY WORDS: Spinal cord injury, Methylprednisolone, Rapamycine, Agmatine

1. GİRİŞ

Akut travmatik spinal kord hasarı (SKH), beklenmeyen, katastrofik (feci) bir olaydır. Sonuçları çoğu kez hastanın yaşamı boyunca sürer ve sadece hastayı değil aile üyelerini ve toplumun tamamını da farklı yollarla etkiler. Bu insanların yaşamlarının en verimli dönemlerinde dışa bağımlı hale gelmelerine tıp çaresiz kalmakta, sadece mevcut durumu en iyi şekilde kullanabilecek rehabilitasyon ve psikolojik destek sağlayabilmektedir (1).

Beyin ve omurilikten oluşan Merkezi Sinir Sistemi (MSS) 100 milyar hücre içerir. Bu hücrelerin 10.000'den fazla alt tipi vardır. Bu hücreler neredeyse sayılamayacak kadar çok bağlantılarla birbirleri ile haberleşirler. Omuriliğin en kalın olduğu bölümü el başparmağı genişliğindedir. Beyinle karşılaştırıldığında birçok işlem çok dar bir alana sıkışmış durumdadır. Omurilikte oluşabilecek en küçük bir hasar bile birçok işlevin bozulmasına yol açmaktadır (2).

Amerika'da her yıl akut spinal kord hasarı olan 10.000-15.000 yeni vaka rapor edilmektedir, toplamda yaklaşık 225.000-288.000 kişi bulunmaktadır. Birçok ülkede de insidansı 1.000.000'da 20 ila 40 arasında değişmektedir. Hastaların ortalama yaşı 16-30 arasındadır (3,4,5,6).

Spinal Kord Hasarı olan hastaların maliyeti şok edici olarak 1998'de 9.7 milyar dolar hesaplanmıştır. Bir insan 25 yaşında tetraplejik olduğunda hayat boyu masrafı 2.8 milyon doları bulmaktadır. Erkekler 4 kat daha fazla etkilenmektedir. Amerika'daki vakaların ortalama yaşı 70'li yıllarda 28.7 iken, 2000'lerde 37.6'ya yükselmiştir. Aynı periodda, 60 yaş ve üstü kişilerdeki hasar oranı %4,7'den %10.9'a çıkmıştır. Spinal kord hasarının başlıca sebepleri: motorlu taşıt kazaları (%47.5), düşme sonrası (%22.9), şiddet (öncelikle ateşli silah yaralanmaları) (%13.8) ve spor yaralanmalarıdır (%8.9) (7).

Yüksek servikal lezyonlar tetraplejiye neden olurken, aşağı lezyonlar paraplejiye yol açmaktadır. Tetrapleji ve parapleji yaralanmaların yarısında mevcuttur (8).

Akut spinal kord hasarı tedavisinde birçok araştırmacı yeni ve modern stratejiler denemelerine rağmen önemli ve kalıcı gelişme sağlayacak evrensel bir tedavi halen bulunmamaktadır (9,10,11,12). Buna rağmen son on yıl içinde omurilik yaralanmalarındaki tedavi çalışmaları son yüzyılda olduğundan daha fazla ilerleme

kaydetmiştir (2). Spinal Kord Hasarı tedavisinde kök hücre denenmektedir ve fareler üzerinde olumlu sonuçlar alındığı bildirilmiştir (13).

Spinal kord hasarının ilk anlarında nöronlarda oluşan hasara primer hasar, ilk hasarın indüklediği birçok mekanizma sonucu oluşan nöronal hasara ise sekonder hasar adı verilir (14). Spinal kord lezyonları sekonder hasarla birlikte genişlemekte, nörolojik disfonksiyon sekonder hasarda daha çok meydana gelmektedir (15). Travma sonrası spinal kord hasarı, sadece primer mekanik hasarın sonucu olarak kabul edilmemekte, birçok sekonder patofizyolojik değişiklikler de bu hasardan sorumlu tutulmaktadır (16,17,18,19,20). Primer hasara karşı medikal veya cerrahi tedavi bulunmamakta, akut spinal kord hasarında modern tedavi rejimleri, sekonder patofizyolojik mekanizmaların verdiği hasarı önlemeyi esas almaktadır (14). Otuz yıl öncesine kadar spinal kord hasarı olan hastalara ve yakınlarına “yapılacak hiçbir şey yok” denilmekteydi. Bu çaresizliği ortadan kaldırmak için yapılan araştırmaların hedefleri şu şekilde sıralanmaktadır (21):

- 1) Ödem ve serbest radikal üretimini önlemek,
- 2) Nöral dokunun, aşırı artmış ekstrasellüler glutamat konsantrasyonu gibi sekonder oluşumlarla ölmesini engellemek,
- 3) İnflamasyon kontrolü,
- 4) Nöronal-glial toplulukların apoptozunu azaltmak veya önlemek,
- 5) Demyelinizasyon ve iletim bozukluklarını tamir etmek,
- 6) Ekstrasellüler ortamın düzelmesi sonucunda nörit büyümesine katkıda bulunmak,
- 7) Hücre replasman tedavileri,
- 8) Transplantasyon yaklaşımı,
- 9) Motor hareketleri yeniden öğrenme ve hatırlama çabaları,
- 10) Elektriksel stimülasyonlarla kayıp fonksiyonların geri kazanımı,
- 11) Kronik ağrı sendromlarını dindirmek .

Spinal kord travmalı hastaların %50'sinin serum ve BOS 'larında galaktoserebrozid, MBP, ve GM-1 gangliozidler için spesifik antikorların seviyeleri artmıştır (21). Lenfositler hasar bölgesine ulaşmakta ve süresiz olarak kalmaktadır. T ve B lenfositler fare spinal kord hasarı lezyonlarında, hasar sonrası 9. haftaya kadar artmaktadır. Bu artış tam olarak doku yenilenmesi ve bütünlüğünün sağlanmasına rağmen meydana gelir (22,23,24). İntraspinal sitokin/kemokinlerin giderek artış gösterdiği, endotel ve diğer hücrelerde integrin ekspresyonunu düzenleme

kapasitesinde olduğu öne sürölmektedir (25,26,27). Kemokinlerin artması ve adezyon moleköllerini, spinal kord hasarı sonrası intraspinal lenfositlerin etkilerini kontrol etmek için moleköler hedefler sunmaktadır (28).

Hasarlarda ortaya çıkan eksitotoksikite, nöronal hücre ölümünde en önemli mediyatörler olarak tanımlanan eksitatör nörotransmitterler glutamat ve aspartatla düzenlenir (29). Glutamat, hipoksi ve iskemiyle ilgili nöron ve oligodendrositlerin ölümüyle ilişkilidir. Glutamatın intraspinal enjeksiyonu, enjeksiyon alanının etrafındaki nöronların belirgin kaybına yol açar, bu da bize spinal kord hasarında salınan eksitatör aminoasitlerin nörotoksik olduğunu göstermektedir (30). Glutamat'ın NMDA ve en bilineni AMPA/kainat tip glutamat reseptörü olan non-NMDA reseptörleri gibi birçok reseptörlerle zararlı etkileri vardır (31). NMDA reseptör aktivasyonu, hasardan 24 saat ve 7 gün sonraki apoptozise bağılı gecikmiş nöronal ve glial hücre ölümünden sorumludur (32).

Medulla spinalis yaralanmalarının fizyopatolojisiyle ilgili birçok araştırmanın sonucunda, oluşan ödem, serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun ikincil hasarın meydana gelmesinde önemli rollerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Spinal kord hasarı; akson, myelin, kan damarları ve hasar bölgesinde doku kaybına yol açan sekonder dejenerasyonun takip ettiğı ani mekanik doku harabiyetine neden olmaktadır. Bu sonuçlar, ikincil hasarın oluşmasını önleyecek nöroprotektif ajan araştırmalarını beraberinde getirmiştir (33). Deneysel spinal kord hasarı sonrası sekonder hasarı önlemek için metilprednizolon (34), melatonin (35), eritropoetin (36), magnezyum (37), meksiletin ve naloksan gibi farmakolojik ajanlar denenmiştir (21).

Bu konuda yapılan çalışmalar göz önüne alınarak, çalışmamızda sıçanlarda deneysel medulla spinalis zedelenmesi sonucunda gelişen sekonder hasarın önlenmesi veya hafifletmesi için agmatin ve rapamisin ile tedavi edilen deneklerdeki olası koruyucu etkilerin araştırılması, tedavide rutin olarak kullanılan metilprednizolon etkisi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. MEDULLA SPİNALİS EMBRİYOLOJİSİ

Sinir sistemi, embriyonik ektodermin kalınlaşmış terlik biçimindeki alanı olan nöral plaktan gelişir. Notokord ve paraksiyal mezoderm, üzerinde yer alan ektodermin nöral plağa farklılaşmasını indükler. Bu olay aktivin ve fibroblast growth faktörleri (FGFs) içeren sinyalleyici moleküller gibi transforming growth factor- β (TGF- β) ailesinin üyeleriyle gerçekleştiği düşünülmektedir (38). Üçüncü haftanın sonlarına doğru nöral plağın lateral kenarları daha fazla büyüyüp yükselerek nöral katlantıları oluşturur. Nöral katlantıların arasında kalan çukur bölge ise nöral oluk olarak adlandırılır. Nöral katlantılar, daha sonra, birbirlerine doğru yaklaşarak orta hatta birbirleriyle kaynaşırlar. Kaynaşma, gelecekte boynun oluşacağı, dördüncü somit bölgesinden başlar, sefalik ve kaudal yönde devam eder. Bu olayların sonunda nöral tüp oluşur. Kaynaşma tamamlanana kadar nöral tüpün sefalik ve kaudal uçları, amnion boşluğuyla sırasıyla kranial ve kaudal nöroporlar yoluyla ilişkidir. Kranial nöropor 25. gün dolaylarında(18-20 somitlik evre) ve posterior nöropor da 27. gün dolaylarında (25 somitlik evre) kapanır. Nöroporların kapanmasıyla nörolasyon tamamlanır. Santral sinir sistemi, kaudal bölgesi dar olan **spinal kord** ve içinde birkaç dilatasyonun beyin keseciklerinin yer aldığı geniş sefalik bölgesi olan kapalı bir tübüler yapı haline gelir (39). Nöral plağın ve nöral tüpün kranial 2/3'ü ve 4. çift somitlerin kaudaline kadar olan kısmı gelecekteki beyni; kaudal 1/3'ü ise gelecekteki medulla spinalisi oluşturur (38). Her iki yandaki nöral katlantılar birbirlerine doğru yükselip kaynaşırken nöroektodermin lateral sınırı veya krestinde bulunan hücreler komşularından ayrılmaya başlarlar. Bu hücre topluluğu nöral krest adıyla bilinir. Nöral krest hücrelerinden daha sonra, spinal (duyu) ve otonom sinir sistemi ganglionları, V, VII, IX ve X. Kafa çifti ganglionlarının bazı bölümleri, Schwann hücreleri ve meninksler (pia ve araknoid) gelişir (39). Yeni kapanmış bir nöral tüpün duvarları, nöroepitelyal hücrelerden meydana gelir. Bu hücreler, duvarın tüm kalınlığı boyunca uzanarak, kalın bir psödostratifiye epitel oluştururlar. Birbirleriyle, lümendeki birleşim kompleksleri aracılığı ile bağlantı kurarlar. Nöral oluk evresinde ve tüpün kapanmasından hemen sonra, bu hücreler hızla bölünmeye başlayarak, giderek daha fazla sayıda nöroepitelyal hücre üretirler. Sonuçta bu hücre

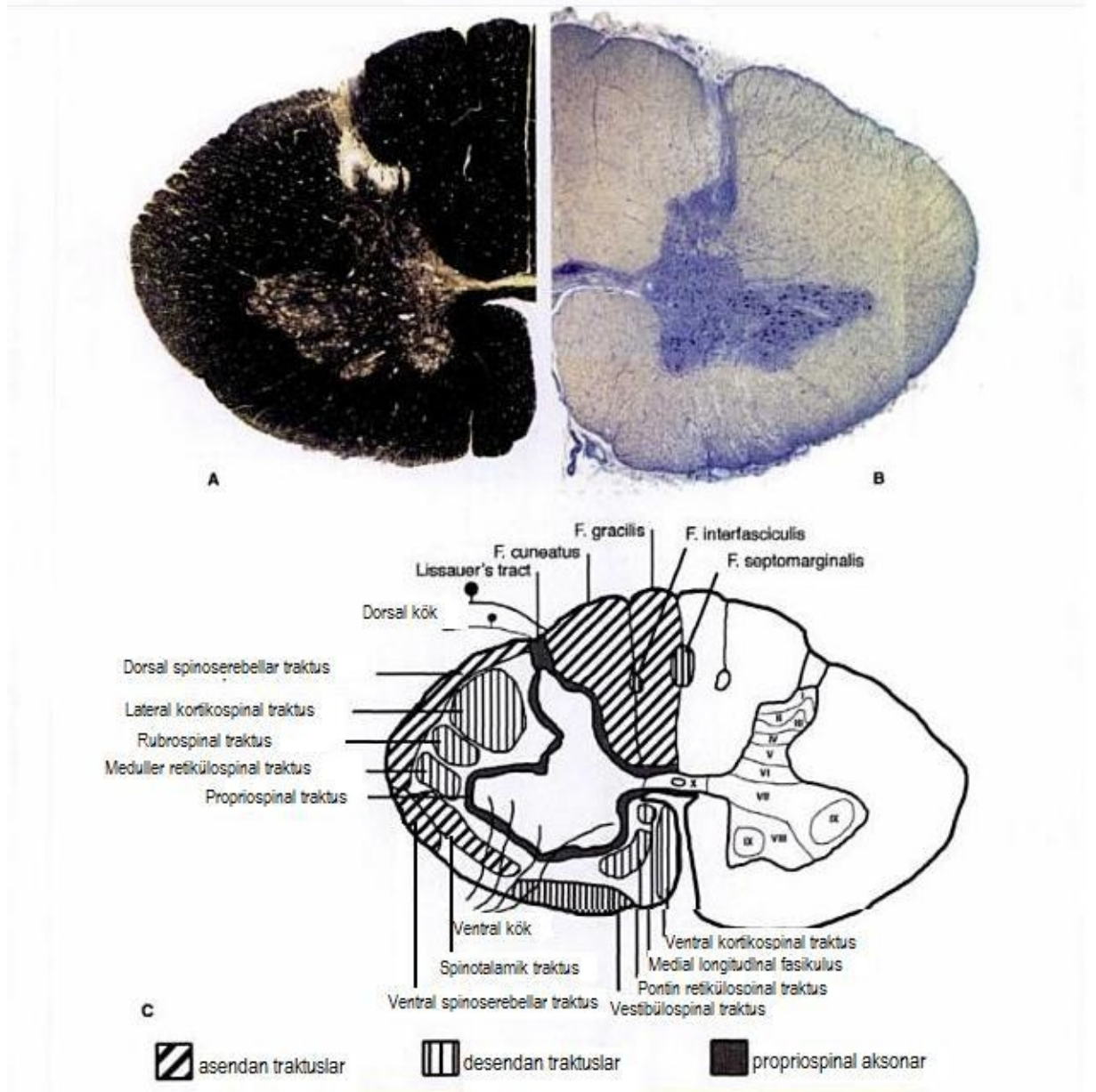
yığını topluca, nöroepitelyal tabaka veya nöroepitel adını alırlar. Nöral tüp kapandıktan sonra, nöroepitelyal hücreler, geniş, yuvarlak nukleuslu, soluk nukleoplazmalı ve nukleolusları koyu boyanan bir başka hücre tipini oluşturmaya başlarlar. Bu hücreler, primitif sinir hücreleri veya diğer adıyla, nöroblastlardır. Nöroblastlar, nöroepitelyal tabakanın çevresinde manto tabakası olarak bilinen bir tabaka oluştururlar. Bu tabaka daha sonra spinal kordun gri cevherini oluşturacaktır. Spinal kordun en dış katmanı manto tabakasındaki nöroblastlardan çıkan sinir liflerini içerir ve marjinal tabaka olarak bilinir. Bu tabaka sinir liflerinin myelinizasyonu sonucu beyaz bir görünüm kazandığından, spinal kordun beyaz cevheri adıyla anılır. Manto tabakasına sürekli biçimde yeni nöroblastların katılmasının bir sonucu olarak, nöral tübün her iki yanında, bir dorsal ve bir de ventral kalınlaşma ortaya çıkar. Bazal plaklar olarak bilinen ventral kalınlaşmalar, ventral motor boynuz hücrelerini içerir ve spinal kordun motor bölümünü oluştururken, alar plaklar adıyla anılan dorsal kalınlaşmalar da duyu bölgelerini meydana getirirler. Bu iki kalınlaşma bölgesi arasındaki sınırı, sulkus limitans adlı longitudinal bir oluk oluşturur. Nöral tübün dorsal ve ventral orta hat bölgeleri, sırasıyla tavan ve taban plakları, nöroblast içermezler ve asıl görevleri, bir taraftan diğer tarafa geçen sinir liflerine zemin oluşturmaktan ibarettir. Ventral motor boynuz ve dorsal sensoryal (duyu) boynuz ek olarak, bu iki bölge arasında kümelenen bir grup nöron, küçük bir ara boynuzun oluşmasına neden olurlar. Bu boynuzda otonom sinir sisteminin sempatik kısmına ait nöronlar bulunur ve bu yapıya sadece spinal kordun torasik ve üst lumbar (L2-L3) bölgelerinde rastlanır (39,40).

2.2. MEDULLA SPİNALİS ANATOMİSİ

Spinal kord, atlas kemiğinin üst sınırından, 1. ve 2. lomber vertebra eklemine kadar devam eder. Ortalama uzunluğu Avrupa erkeklerinde 45cm, ağırlığı ise yaklaşık 30 gr'dır. Kranialde medulla oblongata ile devam eder, kaudalde ise uç kısmı bağ doku filamanı filum terminale olan conus medullaris ile birinci koksigeal vertebral segmente inerek sonlanır. Gelişim sırasında, vertebral kolon spinal korda göre daha hızlı uzar, bu yüzden spinal kord segmenti ve eşlik eden vertebra arasında gittikçe artan bir uyumsuzluk olur. 23. gelişim evresinde (56 gün) vertebral kolon ve spinal kord aynı uzunluktadır ve kord son koksigeal vertebrada biter: bu düzenleme üçüncü fetal aya kadar devam eder. Doğumda, spinal kord ikinci lomber vertebra'nın alt

sınırında sonlanır ve bazen üçüncü lomber vertebraya ulaşabilir. Erişkinde, spinal kord 1. ve 2. vertebra gövdelerinin arasındaki disk seviyesinde sonlanır, bu da kollar yanda iken dirsek seviyesine denk gelir. Bununla birlikte, spinal kordun bitiş yerinde önemli varyasyonlar bulunur. %40 olguda bu seviyede biterken, 12. torasik vertebra veya 2. ve 3 lomber vertebra arasında da sonlanabilmektedir. Spinal kordun transvers genişliği farklılık gösterir, bazı seviyelerdeki genişlemelerin dışında, kranialden kaudale doğru giderek inceler. Silindirik değildir, transvers olarak her seviyede, özellikle de servikal segmentlerde daha geniştir. Servikal genişleme, üst ekstremiteye giden geniş spinal sinirlerin kaynağıdır. Üçüncü servikalden ikinci torasik segmente doğru uzanır, çevresi maksimum 38mm olarak 6. servikal segmenttedir (Bir spinal kord segmenti, bir çift spinal sinir kök parçalarını da içermektedir). Lomber genişleme, alt ekstremitayı etkileyen geniş spinal sinirlerin kaynağıdır. Birinci lomberden üçüncü sakral segmente uzanır, eş vertebral seviye 9. ve 12. torasik vertebra düzeyindedir. En büyük çevresi yaklaşık 35 mm'dir, 12. torasik vertebra seviyesindedir, hemen altında konus medullaris'e doğru inceler. Önde anterior median fissür, arkada posterior median sulkus ve septum, kordu sağ ve sol yarılarına ayırır, fakat santral kanalı da kapsayan sinir doku, kommunikan liflerle birbirine bağlanmaktadır. Anterior median fissür, kaudal seviyelerde daha derinleşmekle birlikte tüm ventral yüz boyunca ortalama derinliği 3mm olarak uzanır. Commissura alba anterior'un arkasındadır. Spinal damarların delici dalları santral spinal bölgeyi beslemek için fissürden kommisüre girmektedir. Posterior median sulkusun derinliği daha azdır, ve bundan itibaren bir posterior median septum neredeyse santral kanala kadar kordun yarısından fazlasına uzanır. Septum anteroposterior uzunluğu 4-6 mm'dir ve kord daraldıkça ve kanal daha arkaya yerleştiği gibi kaudal olarak küçülür. Posterolateral sulkus, posterior median sulkusun her iki tarafında 1,5-2,5mm kadar lateralinde bulunur. Spinal sinirlerin dorsal kökleri (kökçükler de) sulkus boyunca korda girmektedir. Posterior median ve posterolateral sulkus arasındaki her iki taraftaki beyaz maddeye posterior funiculus adı verilir. Servikal ve üst torasik segmentlerde, uzunlamasına bir posterointermediate sulkus her bir posterior funikulusu iki alana bölen bir septumu işaretler: fasikulus gracilis (medial) ve fasikulus kuneatus (lateral). Posterolateral sulkus ile anterior median fissür arasında anterolateral funikulus bulunur. Bu, anterior ve lateral funikuli olarak ventral spinal kökçüklerle bölünür. Üst servikal segmentlerde, sinir kökleri her

lateral funikulusdan, spinal kordun yanındaki vertebral kanaldan yukarıya uzanan ve foramen magnum yoluyla posterior kranial fossaya giren spinal aksesuar siniri oluşturmak için çıkar (41,42) (Şekil 1,2).



Şekil 1. Medulla Spinalisin Bölgeleri (42)

Filum terminale, 20cm uzunluğunda bir bağ doku filamanıdır, conus medullarisin apeksinden aşağıya uzanır. Üst 15cm kısmı, filum terminale internum, dural ve

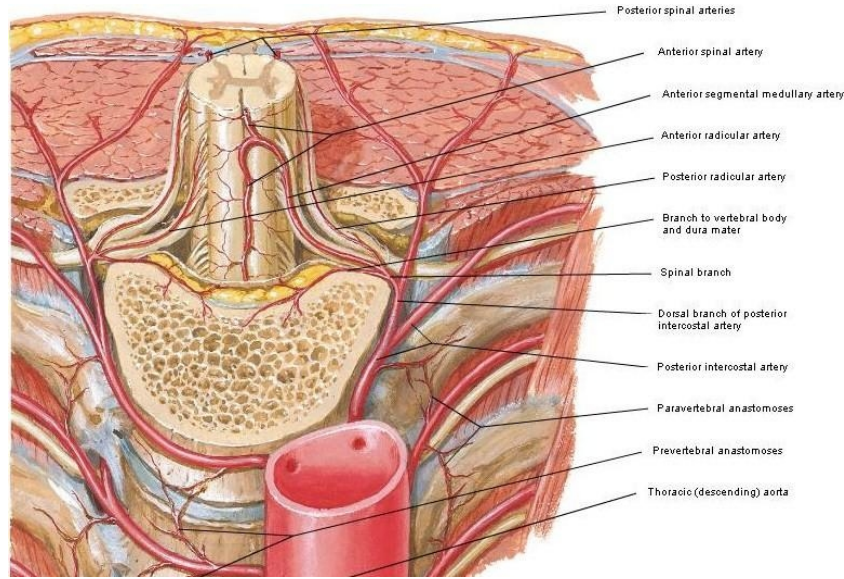
araknoid meninks uzantılarıyla birlikte devam eder ve ikinci sakral vertebranın kaudal sınırına ulaşır. Son 5cm kısmı, filum terminale externum, duramaterle kaynaşır ve sonra ilk koksigeal vertebral segmentin sırtına (arkasına) uzanır. Filum, üstündeki spinal piamaterle devam eder. Santral kanal 5-6mm filumla devam eder. Subaraknoid boşluğun geniş bir kısmı filum terminale internumu çevreler ve BOS'a (lomber ponksiyon için) giriş noktası oluşturur (42).

2.2.1. Ön ve arka kökler

Medulla spinalise bütün uzunluğunca ön veya motor, arka veya sensitif kökler aracılığıyla 31 çift spinal sinir tutunmuştur (Şekil 1). Her bir kök medulla spinalise komşu segmentler boyunca uzanan bir seri küçük kökçüklerle bağlıdır. Her bir arka sinir kökü, periferik ve santral uzantılar veren arka kök ganglionuna (ganglion spinale) sahiptir (42).

2.2.2. Arterleri ve venleri

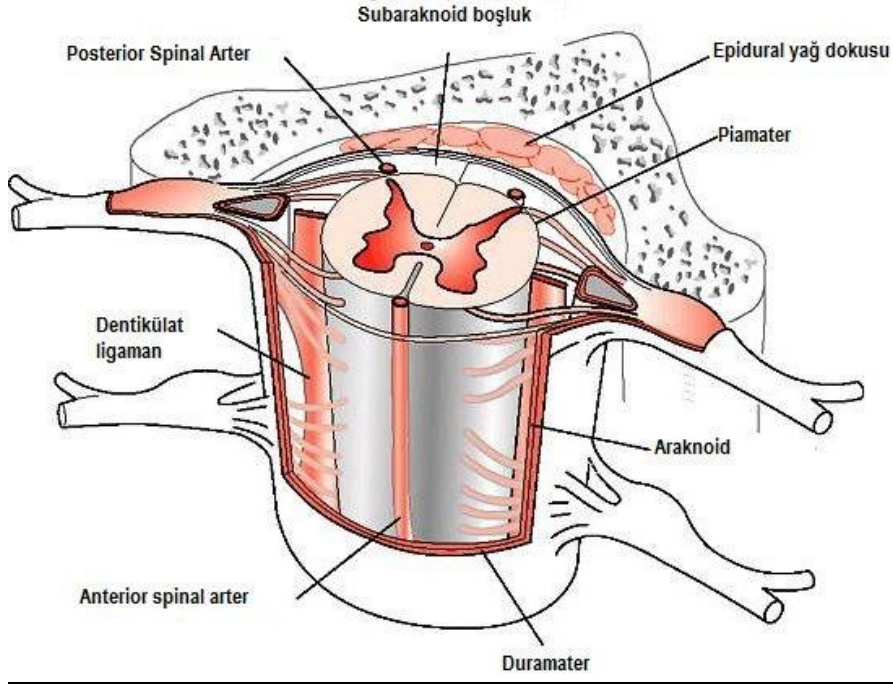
Şekil 2'de görüldüğü gibi, medulla spinalis, iki A. Spinalis Posterior ve bir A. Spinalis Anterior olmak üzere longitudinal uzanan üç küçük arterle beslenir (43,44). A. spinalis posterior, medulla spinalisin iki tarafında doğrudan veya dolaylı olarak A. Vertebralis'lerden çıkarlar. Arka spinal köklerine yakın olarak aşağı doğru uzanırlar. Vertebral arterlerden çıkan A. Spinalis Anterior'lar fissura mediana anterior içinde aşağı doğru birleşerek tek bir arter oluştururlar. A. Spinalis Anterior ve Posterior'lar Foramen İntervertebrale'lerden vertebral kanala giren A. Radicularis'lerce desteklenirler. Radiküler arterler; vertebral, inferior tiroidal, asendan servikal, interkostal, iliolumbalis ve sakral arterlerden çıkan ve her intervertebral foramenden giren segmental arterlerdir. İntumescentia lumbalisi besleyen anterior radiküler arter, Adamkiewicz arteri (A. Radikularis Manga) adını alır. Venler omurilikte arterlere eşlik eder ve arter dallarıyla aynı ismi alır. Medulla spinalisin venleri plexus venosus vertebralis internus'a drene olurlar (43).



Şekil 2. Medulla spinalisi besleyen arterler (44)

2.2.3. Zarları

MS ve beyin üç zarla kaplıdır. Dura mater, araknoid ve piamater. Duramater en dıştaki membran olup MS ve kauda ekinayı örten sık örgülü, sağlam, fibröz bir kılıftır. Duramater ve araknoid foramen magnumdan başlar, S₂ seviyesinde kapanır. Araknoid ile pia arasında subaraknoid boşluk bulunur (şekil 3) ve S₂ seviyesine kadar uzanır. BOS'un yaklaşık yarısı (75 ml) bu boşlukta. Duramater, Foramen İntervertebrale'lerde spinal sinirlerin epineuriumuna karışır. Epidural (ekstradural) boşluk, arkada lig. Flava'lar ile duramater arasında, önde ise lig. longitudinale posterior ile duramater arasındadır. Epidural aralıkta, plexus venosus denilen venöz bir pleksus bulunur. Piamater, medulla spinalisin bittiği yerde (L₁₋₂ arası diskus seviyesinde) kapanır. Piamater ve araknoid Foramen İntervertebrale'lerde spinal sinirlerin perineuriumuna karışır. Ligamentum Denticulatum, medulla spinalisin her iki yanında, spinal sinirlerin ön ve arka kökleri arasında, subpial dokudan duramatere uzanan diş benzeri ligamentlerdir. Piamater tarafından oluşturulur. Birinci servikal vertebra ile birinci lumbal vertebra arasında kalan bölgede bulunurlar. Genellikle 21 çifttir. Birincisi a. vertebralis ile n. accessorius'un spinal kökü ve C₁'in ventral kökü arasından geçer. Sonuncu ligament T₁₂ ve L₁ spinal sinirlerin çıkışları arasındadır (45).



Şekil 3. Medulla spinalisin şematik görünümü (42)

Spinal sinir kökleri, her bir spinal sinir segmentinden laterale doğru kendileri ile ilgili foramen intirvertebrale seviyesine kadar uzanırlar, orada birleşerek spinal sinirleri oluştururlar. Burada motor ve sensitif lifler karışmışlardır. Öyle ki, bir spinal sinir motor ve sensitif liflerin karışımıdır. Gelişme sırasında kolumna vertebralisin uzunluğu medulla spinalise göre oransız büyüme nedeni ile daha fazladır. Dolayısı ile köklerin uzunluğu yukarıdan aşağı doğru kademeli olarak artar. Üst servikal bölgede spinal sinir kökleri kısadır ve daha çok horizontal olarak uzanır. Fakat aşağıda lumbal ve sakral sinir kökleri medulla spinalisin bitme seviyesinde filum terminale çevresinde sinirler vertikal bir kılıf oluşturur. Alt sinir kökleri topluca kauda ekina olarak isimlendirilir (43).

2.3. MEDULLA SPİNALİS HİSTOLOJİSİ

Enine kesitte medulla spinalis; santral kanal etrafında kelebek şeklindeki gri madde ve dıştaki beyaz maddeden oluşmaktadır. Santral kanal çevresinde tek katlı prizmatik endim hücreleri yer alır. Beyaz madde myelinli ve myelinsiz aksonları ve glial hücreleri içermektedir. Bu aksonlar, medulla spinalisin diğer kısımları veya beyine giren ve çıkan aksonlardır. İşlevsel olarak; beyaz maddedeki akson demetlerine

traktus adı verilmektedir. Gri madde ise, akson ve nöroglialarla birlikte nöron hücre gövdelerini ve dendritlerini içermektedir. Motor nöronlar gri maddenin ön boynuzunda arka boynuzdaki nöronlara göre daha büyüktür. Ventral motor nöronlar veya ön boynuz hücreleri, büyük bazofilik hücrelerdir ve histolojik kesitlerde kolaylıkla görülürler. Ön boynuz nöronlarında Nissl cisimciği belirgin olarak ayırt edilir. Gri maddede işlevsel olarak bir araya gelmiş sinir hücre gövdeleri, fibril ve nöroglialardan oluşan gruba çekirdek adı verilmektedir. Çekirdek, periferik sinir sistemindeki ganglionla aynıdır. Sinapslar sadece gri maddede olmaktadır. İmpulsları santral sinir sisteminden uzağa ilettikleri için efferent nöron adı da verilmektedir. Motor nöronun aksonu spinal kordu terk eder, ön boynuzdan çıkıp o segmentin spinal sinir üyesi olarak kasa iletilir. Kasa geldiğinde çok sayıda terminal dallara ayrılarak kas hücresinin nöromuskuler sinapsını oluşturur. Arka kök ganglionundaki duyuşal nöronlar psödonipolardır. Periferden hücre gövdesine bilgileri getiren periferik kısımdan ve hücre gövdesinden MS'in gri maddesine ileten santral kısımdan oluşur. Sensoryal nöronlar santral sinir sistemine impulsları getirdiği için, afferent nöron da denmektedir. İmpuls, periferik kısımda terminal reseptör ağında oluşturulmaktadır (46).

2.3.1. Medulla Spinalisin “Bağ dokusu”: Glia

Glia hücreleri, çoğalma özelliği gösterebilen ve nöronlardan daha fazla sayıda bulunan hücrelerdir. Birçok benign ve malign beyin tümörleri glia orjinlidir. MSS yaralanmalarında glia hücreleri, hasarlı dokuyu temizler ve o bölgeyi çevreleyerek nöron rejenerasyonunu engelleyen glial skar dokusu-“gliosis” oluşumuna neden olur (47).

Glia hücreleri;

1. Nöroektodermden köken alan **astrositler**
2. Nöroektodermden köken alan **oligodendrositler**
3. Mezodermden köken alan **mikroglia**'yı içerir.

Glia hücreleri, nöronların aksine aksiyon potansiyeli oluşturmazlar ve elektriksel uyarıların alınması ve iletilmesine rol oynamazlar. Glia hücrelerinin fonksiyonu

nöronlara yapısal destek sağlamak ve nöronların normal fonksiyonlarını yerine getirmek için lokal olarak uygun ortam sağlamaktır (47).

2.3.1.1. Astrositler

MSS de gözlenen astrositler iki gruba ayrılır:

1. Fibröz astrositler
2. Protoplazmik astrositler

Fibröz astrositler beyaz cevherde daha fazla bulunur ve birkaç ince dalları olan uzun ince uzantılara sahiptir. Protoplazmik astrositler ise gri cevherde daha fazla bulunur ve çok sayıda dalları olan oldukça kısa uzantılara sahiptir. Astrosit uzantılarının genişlemiş uç kısımlarına son-ayak adı verilir. Son ayak uzantılar, nöronları (dendritler ve hücre gövdeleri), piamaterin iç yüzeyini ve MSS'nin her bir kan damarını örtmektedir. Astrositlerin önemli özelliklerinden birisi, çok miktarda glial filamentler (**GFAP**-glial fibrillary acidic protein) içermesidir. Astrositlerin tanımlanmasında GFAP immünohistokimyasal boyaması kullanılmaktadır. Astrositlerin çekirdekleri büyük, oval biçimli ve açık boyanmıştır. Astrositler, nöronlarda myelin kılıfından yoksun alanları çevreleyerek sinir sistemi için yapısal bir matriks oluşturur (47).

2.3.1.2. Oligodendrositler

Oligodendrositler astrositlerden daha küçüktür ve koyu boyanan düzensiz çekirdeğe sahiptirler. Sitoplazmalarında gelişmiş bir Golgi aygıtı, çok sayıda mitokondri ile mikrotübülleri içerir. Oligodendrositlerin görevi aksonu myelinleştirmektir (47).

2.3.1.3. Mikroglia hücreleri

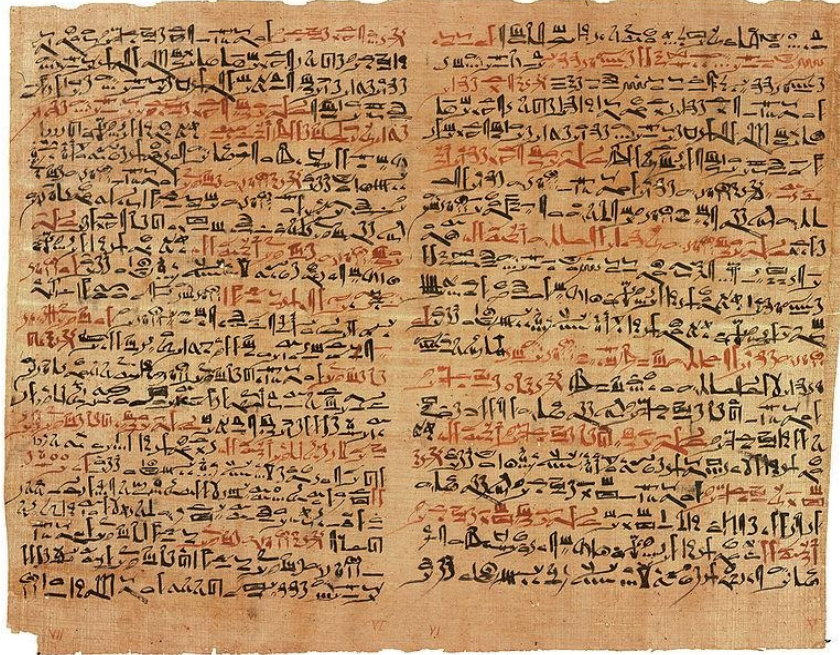
Bu hücreler mezoderm kökenli hücreler olup en önemli işlevleri fagositozudur. Beyin ve omuriliğin immun koruyucuları olarak adlandırılırlar. Nöron ve astrositlerle temas halindedir, ölü nöronların olduğu alanlara gelerek sayısal olarak çoğalırlar ve ölü hücreleri fagosit ederler. Rutin histolojik tekniklerle mikroglia hücreleri, astrositleri ve oligodendrositleri birbirinden ayırmak güçtür, immunhistokimya teknikleri kullanılmaktadır (47).

2.3.2. Kan-beyin bariyeri

MSS’nde, kapillerler kesintili olmayan devamlı endotel hücreleri ile örtülü olup sıkı bağlantılarıyla bağlanmışlardır. Maddeler ancak endotel hücrelerini geçerek sinir dokusuna ulaşabilirler. Bunun yanında, gazlar ve yağda eriyen moleküller endotel hücrelerinden kolaylıkla geçebilmektedir. Endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, kan-beyin bariyerinin en önemli elemanıdır. Diğer elemanlar ise: kapiller endotelinin bazal laminası ve perivasküler astrositin son ayak uzantısıdır (47).

3. OMURİLİK HASARININ TARİHÇESİ

Spinal kord hasarının tarihçesi eskilere dayanır. M.Ö. 2500-3000 yılları arasında mısırlı cerrahlarca yazılan Edwin Smith Papirüsü’nde (48) spinal travma ile ilgili ilk yazılara rastlanmaktadır. Aşağıda görülen bu papirüste spinal kord hasarı “tedavi edilemez bir hastalık” olarak tariflenmektedir.



MÖ. 400 yıllarında Hipokrat, kırık ve dislokasyonları redükte etmek için kendine özgü bir traksiyon cihazı imal etmiş ve paraplejiyi tariflemiştir. MÖ. 150 yıllarında Galen de deneysel olarak kesilen medulla segmentinin altında duyu ve hareket kaybının oluştuğunu saptamıştır. Sekonder hasar teorisi ilk defa Allen tarafından 1911 yılında deneysel akut spinal kord hasarı yapılmış köpeklerde myelotomi sonrası posttravmatik hematomyelinin uzaklaştırılmasıyla nörolojik fonksiyonların iyileşme

göstermesiyle ortaya atılmıştır. Allen, hasar sonrası hemorajik nekrotik dokuda bulunan ve daha ileri hasar oluşturan “biyokimyasal bir faktör”, zararlı bir ajan olduğu teorisini sunmuştur. Modern nörolojik bilimler, spinal kordun nöronal hücreleri ve destek dokularında, birbiriyle ilişkili kompleks biyokimyasal ve moleküler olayların kör travma sonrası ilerleyici hücre ölümüne yol açtığına ışık tutmuşlardır (49). Allen aynı zamanda halen en çok kullanılan modellerden birisi olan ağırlık düşürme metodunu geliştirilmiştir (50). Bu model, duramateri açılmamış spinal kord üzerine değişik ağırlıkların düşürülmesi ve ağırlıkların hemen uzaklaştırılmasını temel alan çarpma modeline dayanır. Bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından kullanılan bu model, halen de yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlardaki spinal kord yaralanmasının biyomekaniğini çok iyi taklit eden ağırlık düşürme metodunun en büyük dezavantajı; insanlarda anterior kord kompresyonu daha yaygın olmasına rağmen, posterior kord kompresyonu oluşturmaktadır (51). 1978 yılında Tator ve Rivlin tarafından geliştirilen klip kompresyon modelinde omurilik çeşitli zaman aralıklarında anevrizma klipleri ile klibe edilmekte ve bu sayede değişik miktarlarda travma oluşturulabilmektedir. Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir (52,53). Bu modelin avantajı omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak, aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model olmaktadır (54).

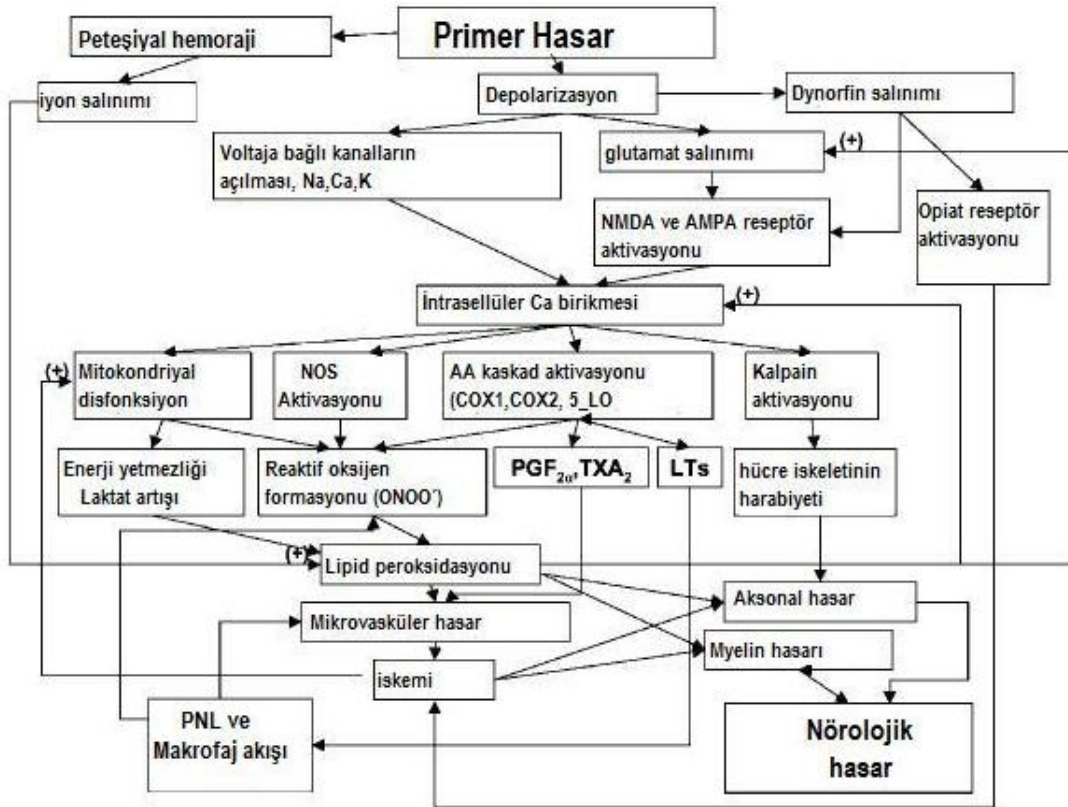
4. FİZYOPATOLOJİ

Medulla spinalis yaralanmalarının fizyopatolojisiyle ilgili birçok araştırmanın sonucunda oluşan ödem, serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun ikincil hasarın meydana gelmesinde önemli rollerinin olduğu ortaya çıkmıştır. Bu sonuçlar, ikincil hasarın oluşmasını önleyecek nöroprotektif ajan araştırmalarını beraberinde getirmiştir (38).

Spinal kord hasarındaki patolojik bulgular sadece primer yaralanmaya ait değildir, devamında ortaya çıkan fizyopatolojik mekanizmalar sonucu oluşan yaralanmalar, sekonder yaralanmayı oluşturur. Bu tip yaralanmada rol oynayan birçok fizyopatolojik mekanizma tanımlanmıştır (55). Hasarın sekonder fazında spinal kord perfüzyonu ve hücresel düzeyde enerji yetersizliği önemli rol oynamaktadır. İskemi,

spinal kord hasarından hemen sonra başlar, tedavi edilmezse ilk 3 saat içinde kötüleşir, haftalar veya aylar sürebilir (56,57).

Travmatik SCI sonrası ilk dakikalar, saatler ve günler içinde oluşan sekonder olaylar zincirindeki kompleks etkileşimler ve anahtar oyuncular Şekil 4’de şematize edilmiştir (58). En ani olay, mekanik olarak indüklenmiş depolarizasyon ve takip eden voltaja bağlı iyon kanallarının (Na, K, Ca gibi) açılmasıdır. Bu, NMDA, AMPA gibi glutamat reseptör-bağımlı iyon kanallarının açılmasına yol açan glutamat gibi nörotransmitterlerin masif salınımına öncülük eder.



Şekil 4. Spinal kord hasarındaki sekonder zedelenmenin patofizyolojisi (58).

İyon akışının en önemli aşaması, intrasellüler kalsiyum birikimidir. Bu kalsiyum birikimi;

- 1) Aerobik solunumun bozulmasına ve laktat birikimine yol açan mitokondriyal işlev kaybına neden olur.
- 2) Mitokondriyal ve sitoplazmik nitrik oksit sentaz (NOS) ve nitrik oksit üretiminin aktivasyonuna yol açar.
- 3) Fosfolipaz A2'nin aktivasyonu ile araşidonik asitin (AA) serbestleşerek siklooksijenaz (COX 1,2) ile potent vazokonstrüktör prostaglandin F2 (PGF2) ve

vazokonstrüktör/trombosit agregasyonu yapan tromboksan A₂ (TXA₂) gibi prostanoidlere, lipooksijenazlar ile bazıları PNL ve makrofajları bölgeye çeken lökotrienlere (LT) dönüşmesine yol açar. Vasokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu ile lokal iskemiye neden olarak sekonder yaralanmayı arttırıcı rol oynarlar (59,60,61,62). Sitoskeletal proteinler de dahil olmak üzere birçok substrata sahip kalsiyumla aktifleşen sistein proteaz, kalpainin aktivasyonu gibi birçok hasar verici etkiyi başlatmaktadır. Membran geçişinde artış olmasıyla, kalsiyum hücre içine girer ve potasyum hücre dışına çıkar, sodyum su ile birlikte hücre içine girer ve sonuçta ödem gelişir (63). Kalsiyumun normal nöronal fonksiyonu ayarlamada rolü olduğu gibi hücre ölümü ve yaralanmasında da önemli rolü bulunmaktadır (64). Yüksek Ca⁺² girişine bağlı olarak mitokondriyal işlev kaybı, çekirdekte şişme ve parçalanma görülür (nekrotik hücre ölümü). Daha az hasarlı yaralanmalarda hücre içine Ca⁺² girişi olmasına rağmen mitokondri işlevi bozulmaz, hücreler apoptozis ile ölümü seçerler. Hücre içi yüksek Ca⁺² seviyeleri, fosfolipaz, proteaz ve endonükleaz gibi enzimlerin aktivasyonuna neden olur (65,66).

Hücre dışı potasyum travmadan 2-3 saat sonrasına kadar yüksek seviyededir, hücre içi kalsiyum ise daha uzun süre yüksek kalmaktadır (67).

COX ve lipooksijenaz ve NOS aktivasyonu sonucunda, peroksinitrit anyonu da dahil olmak üzere reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşur. Bu radikaller, süperoksit radikalının nitrik oksitle reaksiyonuyla meydana gelirler. Peroksinitrit çeşitli mekanizmalarla hücre sel hasarı tetiklese de, hücre membranı (plazma ve organeller) lipid peroksidasyonu (LP) kesin olarak anahtar mekanizmadır. Bununla birlikte, demir LP reaksiyonlarının yayılımını hızlandıran güçlü bir katalizördür. Glikolitik yolla oluşan laktat, ferritin gibi depolandığı yerlerden demir salınımını stimüle ederek LP'yi destekler. Ek olarak, primer ve sekonder peteşiyal hemorajiler hemoglobin bağlı demiri sağlarlar. Nöronlar ve kan damarlarında oluşan LP, nöronal ve aksonal membran fonksiyonunu ve bütünlüğünü direkt olarak bozar ve sekonder nöronal hasarla indirekt olarak ilişkili mikrovasküler hasara ve sekonder iskemiye yol açar. Travmanın indüklediği, en önemlisi dinorfin A olan endojen opiatların salınımı, NMDA reseptörlerini stimüle ederek ve opiyat reseptörlerini aktive ederek sekonder hasar oluşumunu kötüleştirir ve son olarak vasküler disfonksiyon, iyonik ve metabolik bozukluğa katkıda bulunur. Bu ikincil hasar olayları travma sonrası apoptotik süreçle de ilişkilidir (68).

5. OMURİLİK HASARINDAKİ PATOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER

5.1. Akut değişiklikler

Spinal Kord Hasarı, primer hasar alanında veya yakınında demyelinizasyonun yanı sıra nöronal ve aksonal destrüksiyona da sebep olur. Bu sürecin anahtar mediyatörü, kemo ve sitokinlerin sentez ve salınımıyla birlikte akut ve güçlü inflamatuvar cevap ve hem CNS parankimindeki mikrogliaların hem de dolaşımdaki lökositlerin bölgeye göçüdür. Hasar sonrası ilk 24 saatte, TNF- α ve IL-1 β gibi güçlü pro-inflamatuvar mediatörlerin lezyon bölgesinde sentez ve salınımları artarak, insan ve deneysel Spinal Kord Hasarı sonrası deney hayvanlarında sekonder doku dejenerasyonunun gelişiminde major rol oynamaktadır.

Medulla spinalisde hasar, beyaz cevhere oranla daha sıklıkla gri cevherde görülür. İlk belirtiler gri cevherde peteşiyal kanamalar, beyaz cevherde ise ödemdir (69).

İlk oluşan kan akımı değişikliği, kan akımında duraklamadır (staz). Ödem, travmayı takiben ilk 15 dakikada belirir ve 12-18 saatte maksimum seviyeye ulaşır; 3-5 gün sonunda şiddetini kaybeder. Ancak travma sonrası 15 gün boyunca özellikle beyaz cevherde belirgin kalabilir. Ödem hafif olduğunda sadece damarlar çevresinde, ağır olduğunda ise, etkilenen tüm segmentte yaygın olarak izlenir. Beyinde olduğu gibi medulla spinaliste ödem, beyaz cevherde perivasküler mesafelerde ve astroglial hücre sitoplazmalarında; gri cevherde ise, nöronlar çevresinde belirgindir. Ayrıca travma sonrası eritrositlerin damar dışına çıkmasıyla peteşiyal kanamalar oluşur ve lökositler de damar dışına çıkarlar. Nötrofiller travma sonrası ortama hakim olup daha sonra yerlerini lenfosit ve makrofaja bırakırlar. Medulla spinalis parankimindeki travmatik değişiklikler; nöronlarda akson ve myelin kılıfının şişmesi ve bütünlük kaybı olup, 7. saatte başlar. Ultrastrüktürel olarak da aksonlarda, mikrotübül ve nöroflamanlarda parçalanma izlenir. Akson membranındaki hasara bağlı olarak iyon kanallarında fonksiyonel bozukluk ve vasküler endotelial hasar ortaya çıkar. Akson hafif şiddette hasarlandığında şişmiş, boğumlanmış ve kıvrımlanmış bozulma gösterirken, daha ağır hasarda kesintili damlacıklar şeklinde görülür. Aksonun tamamen yırtıldığı veya koptuğu noktada "terminal tanecik" adı

verilen terminal şişme görülür. Miyelin kılıfta hafif hasarda **vakuoler** dejenerasyon görülürken, ağır hasarda miyelin ve aksonun birlikte parçalanmaları ile serbest yağ tanecikleri gözlenir (69).

5.2. Glial hücrelerin hasara yanıtı:

Santral sinir sistemine hasarlar sadece nöronlara zarar vermez, glial hücrelerde dramatik değişikliklere yol açar (70,71,72,73). Spinal Kord Hasarını takiben, astrositler; vimentin, nestin, ve glial fibriller asidik proteinleri gibi ara flaman proteinlerini, proteoglikanları ve akson büyümesini inhibe eden diğer moleküllerin ekspresyonunu artırır. Hasar sonrası birtakım çoğalmalar olmakla birlikte, en dramatik astrosit cevabı, hasar bölgesine göç ve hipertrofiyi içerir. Zaman geçtikçe, reaktif astrositler ekstrasellüler matriks moleküllerini biriktirir ve glial skar oluştururlar. Glial skar, tamir aşamasında önemli rol oynar çünkü hasar bölgesini sınırlayarak homeostazı yeniden düzenler ve kan beyin bariyerinin bütünlüğünü eski haline getirir. Ancak, glial skar; hasarlı aksonların rejenere olmasını ve fonksiyonel bağlantıların yeniden kurulmasını engelleyen fiziksel ve biyokimyasal bariyeri oluşturur (74).

5.3. Subakut Dönem Patolojisi

Travma sonrası 2-3 haftada akut bozukluklar düzelmeye başlar. Küçük kanamalar rezorbe olup, ödem azalırken, büyük kanamalar organizasyon ile giderilmeye çalışılır, rekanalizasyon izlenir. Damarların çoğunun lümeninde fibrin trombüsleri bulunur. Ortamda çok sayıda lipid ve hemosiderin yüklü makrofajlar vardır. Hasar alanında, özellikle de damar çevresinde fagositik hücreler rozetler oluştururlar. Miyofibroblastların kollajen üreten fibrositlere dönüşümüyle nedbe dokusu oluşurken, astrositik glial hücre artışı ile gliosis izlenir (69).

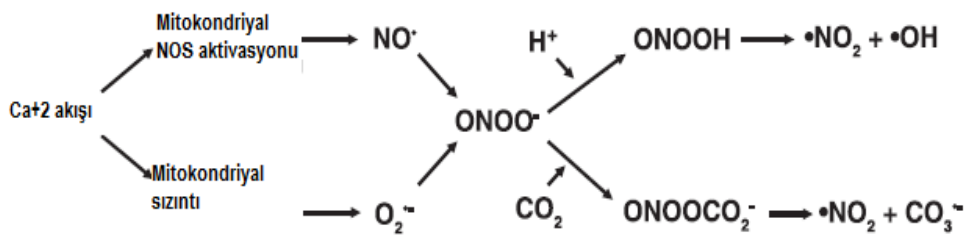
Eğer santral hemorajik nekroz oluşmuşsa, onarım boru şeklinde kistik boşluk olarak gerçekleşir. Aksonal bağlantısı kesilmiş nöronda "santral kromatolizis" olarak adlandırılan sitoplazmanın belirgin homojenizasyona uğradığı ve şiştiği, çekirdeğin ise kenara itildiği değişiklikler görülür. Travmanın başında şişmiş olan spinal kord onarım sonuna doğru incelmış ve atrofik görünüm almıştır. Yapılan deneysel spinal kord hasarı çalışmalarında, rejenerasyonun üç yıla kadar yavaş hızla devam ettiği görülmüştür (75).

5.4.Kronik dönem patolojisi

Travmanın 6 ay ve sonrası döneminde izlenen değişikliklerdir. Hasarlı kord bölgesi üzerindeki duramater ve araknoid membran kalınlaşır. Meningial zar, adeziv araknoidit olarak isimlendirilen korda veya duraya yapışıklık gösterir. Mikroskopik olarak fibrozis ve meningeal hücre proliferasyonu görülür. Medulla spinalis makroskopik olarak büzülerek küçülmüştür, gri ve sert kıvamlıdır. Skar dokusunun yanı sıra bazı nöronlarda aksonal rejenerasyon, Schwann hücrelerinde remyelinizasyon görülebilir (69).

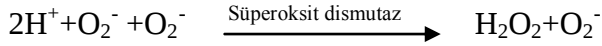
6. SERBEST OKSİJEN RADİKALLERİ

Santral sinir sistemi yüksek konsantrasyonda poliansatüre yağ asidi içerdiği için serbest radikal reaksiyonları sonucu oluşan lipid peroksidasyonuna oldukça duyarlı bir dokudur (76). Biriken serbest radikaller hücre lipidlerine, proteinlerine ve DNA ya zarar verir. Serbest radikaller, mitokondride oluşur ve antioksidan sistemler ile zararlı etkileri engellenir (77). Serbest radikallerin aşırı artışı, antioksidan sistemlerin yetersiz kalmasına ve hücre ölümüne neden olur (78). Travma sonrası spinal korddaki hasarın çoğu glutamat eksitotoksitesinin sekonder etkileriyle ilişkilidir. Ca²⁺'nin aşırı artışı ve oksidatif stresle birlikte nöronun disfonksiyonuyla sonuçlanan olaylar dizisinde yer alır. Reaktif oksijen radikallerinin içinde hidrojen peroksit ve hidroksil radikali posttravmatik oksidatif hasarda önemli rol oynar. Nörolojik rahatsızlıklarda sekonder doku hasarı yapan asıl radikal olan peroksinitrit (PON, ONOO⁻); NO⁻ ve O₂⁻'nin nitrikoksit sentaz (NOS) tarafından birleştirilmesiyle oluşturulur. Peroksinitrit'in (aynı zamanda reaktif oksijen türleri olarak da isimlendirilir) biyokimyası bulunduğu günden beri daha iyi tanımlanmıştır. PON'un güçlü okside edici kabiliyeti, kendi ayrışma ürünlerinin güçlü serbest radikal özelliklerine bağlıdır. Bu ürünler, Şekil 5'de gösterildiği gibi (79) iki yoldan meydana gelirler:



Şekil 5. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu (79)

Lipid peroksidasyon düzeyi, malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyonu sırasında oluşan ara ürünler aracılığı ile tayin edilebilmektedir. Süperoksit dismutaz, iki değerli bakır içerir. Bu özelliğinden dolayı, süperoksit radikalini (O_2^-) H_2O_2 'ye dönüştürmektedir.



Katalaz, H_2O_2 varlığında $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalizler. Glutasyon peroksidaz da hidrojen peroksiti metabolize eder. Katalaz, SOD ve glutasyon, artmış oksidan stresiyle başa çıkacak primer antioksidan koruyuculardır. Hücresel substratları okside edebilecek oksijen ve H_2O_2 'yi ortadan kaldıran antioksidanlardır. Bunlar serbest radikallerin miktarını azaltarak zincir reaksiyonlarını önlerler. Bu enzimlerin aktif oluşu daha zararlı radikallerin oluşumunu engellemektedir. Nitrik oksit, hidroksil radikali ($OH^\cdot$), süperoksit anyonu (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serbest radikaller oksidatif strese salınırlar. Süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz (GSHPx) ve katalaz antioksidan enzimlerdir, oksidatif strese karşı savunmada rol oynarlar. Fazla NO ve/veya defektif antioksidanlar lipid peroksidasyonu, hücre işlevinin bozulmasına ve ölüme sebep olurlar (80). Nitrik oksit, membranları kolayca geçebilme özelliği olan, oldukça lipofilik bir moleküldür. Nitrik oksit sentezleyen enzimlerin (NOS) katalize ettiği bir dizi reaksiyon sonucunda L-arginin, L-sitrülin ve nitrik oksite dönüşür (81). Nitrik oksit sentezleyen enzimin 3 farklı izoformu vardır. Bu izoenzimlere özgü genler kromozom 7 (endotelial NOS-eNOS), 12 (nöral NOS-nNOS) ve 17 (indüklenebilen NOS-iNOS) üzerinde bulunmuştur. Nitrik oksit sentezleyen enzim-I ya da nNOS ve NOS-III ya da eNOS sürekli, ancak az miktarda ve kalsiyuma bağımlı olarak (enzim aktivasyonu için hücre içi kalsiyumun artması gerekir) salınır. Nöral dokularda NOS-I ve vasküler endotelde ise NOS-III bulunur. Solunum yolu epitelinde ve çeşitli diğer hücrelerde NOS-II ya da iNOS bulunur (kalsiyuma bağımlı değildir). Özgül sitokinlerin indüklemesi sonrasında fazla miktarda salgılanır. İnterferon- γ , IL-1 β , TNF- α , endotoksin veya egzotoksinlerce indüklenmesi sonucunda NOS-I ve NOS-III'ten (ikisi birlikte, constitutive NOS-cNOS olarak adlandırılmaktadır) 1000 kat daha fazla NO sentezleyebilmektedir. Glukokortikosteroidler bu indüksiyonu ve NO sentezini inhibe eder (82). Spinal kord hasarı sonrası, reaktif oksijen ve nitrojen türleri, inflamatuvar hücrelerde gerçekleşen bir dizi reaksiyon tarafından NADPH

Oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS), fosfolipaz A2-siklooksijenaz, Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları ile ortaya çıkar. Sonuçta, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen radikalleri oluşur. Nitrik oksit, in vivo sekonder patolojik süreçte olduğu kadar, hasar sonrası spinal kord kavitasyonu gelişimiyle de alakalıdır. Bu antioksidanların tükenmesine ve-veya serbest oksijen radikallerinin artmış üretimine ve hasar alanında NO artışına sebep olur. Serbest oksijen radikalleri NO ile reaksiyona girerek yüksek reaktif ve sitotoksik olan ONOO⁻ ve peroksinitröz asit (ONOOH) oluşturur. Serbest oksijen radikalleri ve ONOO⁻ lipidlere, proteinler ve nükleik asitlere zarar vererek sitotoksisiteye sebep olur. Ayrıca, NO bağımlı patoloji NOS'un fazla açığa çıkmasıyla ilişkilidir (83).

7. UYGULANAN TEDAVİLER

7.1. Metilprednizolon

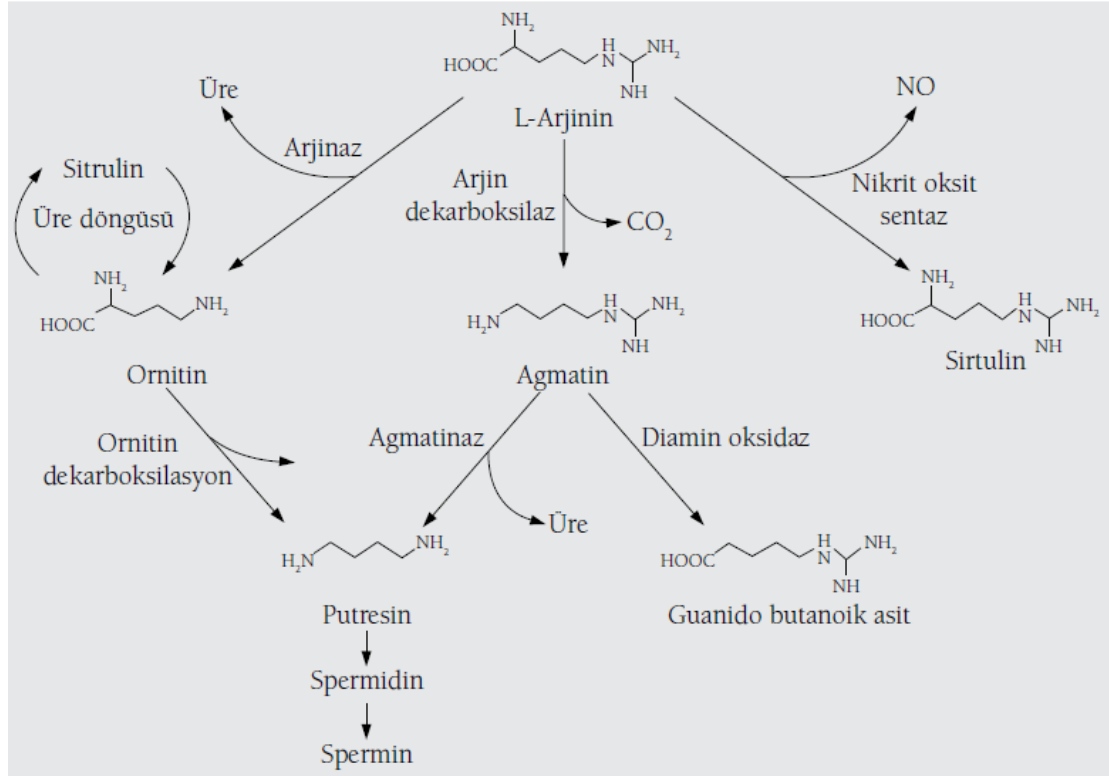
Medulla spinalis yaralanmalarında halen en yaygın klinik kullanımı olan ajan metilprednizolondur (MP), ancak yüksek doz kortikosteroidler nörolojik yararları gösterilmiş olsa da ciddi yan etkilere sahiptir (84). Metilprednizolon, diğer kortikosteroidlere göre daha güçlü antioksidan özelliği olması ve hücre membranından daha kolay geçmesi sebebiyle ön plana çıkmıştır (21) . Spinal kord hasarında yüksek doz metilprednizolon uygulamasının hayvan ve insanda başarılı bir yaklaşım olduğu gösterilmiştir (85,86). Metilprednizolon'un etkilerinin tam olarak anlaşılamamasına rağmen, inflamatuvar sitokin üretimi ve lipid peroksidasyonun önlenmesinde major rol oynadığı düşünülmektedir (87,88,89,90). MP vasküler geçirgenlik ve ödem üzerine doğrudan etki etmekte veya antiinflamatuvar etki yapmaktadır. Cochrane Review'e göre, spinal kord travması sonrası, "yüksek doz MP, zedelenmeden sonra 8 saat içinde uygulanırsa, etkili olduğu kabul edilen tek farmakolojik tedavidir" (21). Spinal kord hasarlı hastalarda steroid tedavisinin etkinliğiyle ilgili üç tane geniş çaplı randomize klinik çalışma- The National Acute Spinal Cord Injury Study NASCIS-1-2-3 yapılmıştır (91,92,93,94). NASCIS-1 çalışmasında 330 akut spinal travmalı hastaya ilk 48 saat içinde MP uygulanmıştır. Bu çalışma, verilen dozun hayvan deneylerindeki düşük olması ve plasebo

grubunun olmayışı sebebiyle eleştirilere maruz kalmıştır. Bu nedenle NASCIS-2 çalışmasında naloksan veya plasebo grubu oluşturulmuş ve daha yüksek doz verilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda eğer ilk 8 saat içinde yüksek doz MP infüzyon tedavisine başlanırsa plaseboya göre anlamlı farklılık oluşacağı gösterilmiştir (95). 1990'ların başında NASCIS-2 ve NASCIS-3 çalışmalarında, spinal hasarlı insanlarda, hasardan sonra ilk 8 saat içinde metilprednizolon uygulandığında istatistiksel olarak anlamlı gelişmeler bulunmuştur (93). NASCIS-3 çalışmasında ilk 8 saatte başlayan MP tedavisinin 24 saat ve 48 saat infüzyonu karşılaştırılmıştır. Bu çalışmanın da ilk sonuçları 1997 yılında yayınlanmıştır. Bu çalışma, 48 saat infüzyonun 24 saatlik uygulamaya göre üstünlüğünün olmadığını göstermiştir (96,97). Etkisi bilinen metilprednizolon'un bu çalışmada kullanılmasının amacı diğer ilaçlar ile karşılaştırılmasıdır.

7.2. Agmatin

Agmatin, L-arjinin'den arjinin dekarboksilaz (ADK) enzimi ile dekarboksilasyonu sonucu oluşan bir bileşik olup, glutamat'ın NMDA reseptör antagonisti ve NOS-inhibitör aktivitesi olan bir nörotransmitter-nöromodulatördür (98,99,100,101). Agmatin (4-(aminobütil)guanidin) agmatinaz (agmatin üril-hidrolaz) enzimiyle pütresin ve üreye hidrolize edilir (102,103) (Şekil 6). Agmatin uzun zamandır bakteri, bitki ve omurgasızlarda pütresin prekürsörü olarak bilinmekteydi (104). Pütresin, spermin ve spermidinin öncül maddesidir, agmatinin de bu organizmalarda poliaminlerin oluşumunda metabolik ara ürünüdür. Son zamanlarda agmatin, ADK ve Agmatinaz'ın memelilerin dokularında eksprese edildiği keşfedilmiştir (105). Memelilerin beyinde, agmatin lokal olarak sentezlenir ve bölgesel nöronlarda depolanır (106). Özellikle, agmatin hipokampusteki piramidal nöronlar üzerinde eksitator sinapslar yapan akson terminallerindeki sinaptik veziküllerle ilişkilidir (107). Agmatin; aderenal kromafin hücrelerden katekolamin salınımını stimule etmekte (105), sıçanlara intrasisternal enjekte edildiğinde arteriyel kan basıncını artırmakta (108), insülin salınımını uyarmakta (109), hipotalamustan LHRH salınımını artırmakta (110), morfine tolerans gelişimini engelleyerek morfin yoksunluk sendromunun tüm semptomlarını baskılamaktadır (111). Adrenerjik ve imidazolin reseptörlerinin ligandı olduğu bilinmektedir (112). NMDA reseptör

antagonisti ve NOS inhibitörü olan agmatin nörotransmitter-nöromodulatördür (99). Agmatin NMDA reseptör kanallarını konsantrasyon ve voltaja bağlı şekilde selektif olarak bloke eder ve hipokampal nöronlarda glutamatla birlikte kolokalize olur (67). Şekil 6’da sentezin basamakları şematize edilmiştir (113).



Şekil 6. Agmatin Sentezlenmesinin Basamakları (113)

7.3. Rapamisin

Rapamisin, sirolimus olarak da bilinmektedir. Pasifik okyanusunda, *Rapa Nui*-Paskalya Adası'ndan alınan toprak numunesinde bulunan *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinin ürünü olarak keşfedilmiştir. Önceleri antifungal olarak bilinse de, immun baskılayıcı özelliğinin keşfedilmesiyle, günümüzde organ nakli hastalarında reddi önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Antiproliferatif etkiye sahip olması nedeniyle kanser tedavisinde de rolü olabileceği düşünülmektedir (114). Kardiak cerrahide, stentlerin açık tutulması, kornea yanıkları tedavisi gibi pekçok alanda değişik denemeler yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Rapamisin ile yapılan son güncel bir çalışmada Harrison ve arkadaşları, rapamisinin farelerin ömrünü uzattığını bulmuşlardır (115). Rapamisin 1999 yılında FDA onayı almıştır ve

kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Rapamisin, immunosupressif kompleks oluşturmak üzere hücrelerde immunofilin, FK bağlayıcı protein-12 (FKBP-12)'e bağlanır. Rapamisin-FKBP-12 kompleksi memelilerde düzenleyici bir kinaz olan "Target of Rapamisin" (TOR)'a bağlanarak aktif hale gelmesini önler. TOR'un aktif hale gelmesinin önlenmesi ile hücre siklusunun G1 fazından S fazına geçmesi önlenir. **mTOR** (*mammalian target of rapamycin*), translasyon ve hücre bölünmesini düzenleyen bir serin/treonin kinaz'dır. mTOR, büyüme faktörleri ve besin maddeleriyle düzenlenen protein sentezi de dahil olmak üzere çoklu sinyalleri birleştirir. mTOR'un inhibisyonu; hücre çoğalmasının inhibisyonuna, immunosupresyon ve otofaji indüksiyonuna yol açar. Otofaji, hücre içeriğinin bozulması, protein sentezi ile yıkımı arasındaki dengeyi koruyan yapıdır ve aminoasit eksikliğinde indüklenmektedir. Rapamisin, immunosupresif immunofilin bağlayıcısıdır ve nörotrofik ve nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir (116,117,118). Steiner ve arkadaşları, 1997 yılında yaptıkları çalışmada, rapamisinin PC12 hücreleri ve sensoryal nöronal kültürlerde arka kök ganglionlarında nörit büyümesini desteklediğini göstermişlerdir. İmmunofilin ligandlarının nörotrofik potansiyelinin FKBP-12 veya siklofin üzerinden olduğunu belirtmişlerdir. Ratların, rapamisinin analogu olan FK506 ile tedavisiyle hasarlanmış siyatik sinirde fonksiyonel ve morfolojik iyileşme gösterdiğini savunmuşlardır. Periferik sinir yaralanmalarında iyileştirici etkileri tanımlanan (119) rapamisinin medulla spinalis yaralanmalarında etkileri konusunda çok sınırlı çalışma bulunmaktadır.

7. MATERYAL METOD

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 2008/300-59 sayılı onayı alınarak gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan sıçanlar Düzce Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen 30 adet Spraque Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Denekler normal oda sıcaklığında (22 C°), 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Standart palet sıçan yemi ile ad libitum beslendiler, musluk suyu içtiler. Bakımları düzenli olarak yapıldı. Deneyde toplam 5 grup oluşturuldu.

Grup 1: (Sham-Kontrol Grubu) (n=6): Bu gruptaki ratların paravertebral kasları kesilerek, medulla spinalis T₇₋₈₋₉ seviyelerinde açıldı, laminektomi sonrası bası uygulanmadan kapatıldı.

Grup 2: (Hasar Grubu) (n=6): Paravertebral kaslar kesilip medulla spinalisin T₇₋₈₋₉ seviyelerinde laminektomi yapıldı. Medulla spinalis segmentine, duramater intakt bırakılarak 1 dakika boyunca anevrizma klipi ile Rivlin ve Tator'un klip kompresyon yöntemiyle bası uygulandı. Klip süre sonunda çıkarıldı ve katlar aslına uygun kapatıldı.

Grup 3: (Hasar+Metilprednizolon Grubu) (n=6): Anevrizma klipi ile bası uygulanan ratlara operasyon sonrasındaki 5 dakika içinde ve devam eden 7 gün boyunca metilprednizolon intraperitoneal (İP) olarak 30 mg/kg verildi.

Grup 4: (Hasar+ Rapamisin Grubu) (n=6): Bası uygulanan hayvanlara 7 gün boyunca oral gavajla rapamisin (Rapamune®, 1 mg, Wyeth, Amerika Birleşik Devletleri) 1 mg/kg dozunda verildi.

Grup 5: (Hasar+Agmatin Grubu) (n=6): Aynı sürede bası uygulanan hayvanlara 50 mg/kg dozunda Agmatin(sigma) intraperitoneal olarak 7 gün boyunca uygulandı. Tedavi gruplarında ilaçların ilk dozları operasyon sonrasında vakit kaybetmeden verildi. Deney süresi olan 7.günde gruplardaki sıçanların vücut ağırlıkları tartıldı. Anestezi altında biyokimyasal tetkikler için intrakardiyak kan alınarak sakrifiye edildi. Medulla spinalis vertebralardan serbestleştirilerek çıkarıldı. Lezyon oluşturulan bölge “**core area**” olarak kabul edildi. Belirli aralıklar ile alınan kesitlerin aynı seviyede olması ve dokuda oluşan değişikliklerin daha sağlıklı değerlendirilmesi için her denekten 5mm uzunluğunda “core” alanı alınarak tespit edildi. Bu alanın 1cm kaudali ve rostrali de alınarak proksimal ve distal parçalardaki değişikliklerin incelenmesi için saklandı. Doku örnekleri, ışık mikroskopik tetkikler için %10'luk formaldehite, Elektron mikroskopik tetkikler için % 2,5'luk glutaraldehit solüsyonuna (pH: 7.25) kondu. Dokuda lipid peroksidasyonunu göstermek amacıyla MDA ve antioksidan Glutatyon peroksidaz ölçümleri için doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkanıp, kurularak eppendorf tüplere alınarak -80 C°'de saklandı. Alınan kan örneklerinde de serbest oksijen radikallerini belirlemek için antioksidan enzimler olan Katalaz ve Süperoksitdismutaz için ölçümler yapıldı.

Cerrahi işlem

Ratlara 100 mg/kg Ketamin (Alfamine %10, 100 mg/ml, 10 ml, Alfasan, Hollanda) ve 10 mg/kg Ksilazin (Alfazyne %2, 20 mg/ml, 30 ml, Alfasan, Hollanda) intramuskuler enjeksiyonuyla anestezi yapıldı. Yüzüstü-prone pozisyonda yatırılan ratın sırt bölgesi traşlandı ve polividin iyot ile saha temizliği yapıldı. Spinöz çıkıntıların kılavuzluğunda torakal 7-8-9 seviyelerinden deriye insizyon yapıldı. Paravertebral kaslar kesildi. Laminektomi yapılarak medulla spinalis açığa çıkarıldı. Duramater intakt bırakılarak anevrizma klibi ile 60 saniye bası oluşturuldu. Klip kaldırıldığında bası yerinde kontüzyon olduğu gözlemlendi. Daha sonra katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı. Hayvanlar uyandığında paraplejinin olduğu gözlemlendi. Sonraki günlerde günlük yara bakımı yapıldı. Günde iki defa mesanelerine bastırarak idrarları yaptırıldı. Haftanın sonuna doğru alt ekstremitelerde kaslarında atrofi olduğu gözlemlendi.

Biyokimyasal İnceleme

Alınan kan örnekleri, 4000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edilerek biyokimyasal tetkikler için -80 C°'de plazma olarak çalışılacağı güne kadar saklandı. Plazmadan Johannson ve arkadaşlarının yöntemine uygun olarak Katalaz (Cayman, Catalase assay kit, Catalog no:707002, lot no:196248, 96 test) ve Süperoksit dismutaz (Cayman, Superoxide Dismutase Assay Kit, Catalog no:706002, lot no:0411309, 96 test) enzimleri çalışıldı. MDA ve Glutasyon peroksidaz ölçümleri için doku örnekleri serum fizyolojik ile yıkanıp, kurularak eppendorf tüplere kondu ve hızlıca -80 C°'de saklandı. Çalışılacağı gün dokular çözüldü, MDA için serum fizyolojikte, glutasyon peroksidaz için soğuk olarak hazırlanan 50mM tris HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, ve 1mM DTT karışımında her gram için 5-10ml olacak şekilde homojenize edildi. Homojenatlar kitlerin içindeki prosedüre uygun olarak çalışıldı. Sonuçlar, katalaz enzim aktivitesi için nmol/min/ml, GPx için nmol/min/ml, MDA için nmol, SOD için ise U/mL olarak ifade edildi.

Işık Mikroskopik İşlemler:

1. %10luk formaldehite alınan doku örnekleri, solüsyonlar değiştirilerek 48 saat süre ile tesbit edildi.
 2. Daha sonra akan musluk altında yıkandı.
 3. % 70'lik alkolde iki saat bekletildi.
 4. %80'lik alkolde iki saat bekletildi.
 5. % 96'luk alkolde bir saat bekletildi.
 6. % 96'luk alkolde bir saat bekletildi.
 7. % 100'lük alkolde bir saat bekletildi.
 8. % 100'lük alkolde bir saat bekletildi.
 9. Ksilol I'de bir saat bekletildi.
 10. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
 11. Eşit miktarlarda hazırlanmış Ksilol-parafin karışımında 64°C'de etüvde 30 dakika bekletildi.
 12. Parafin I'de 64°C'de etüvde üç saat bekletildi.
 13. Parafin II'de 64°C'de etüvde üç saat bekletildi.
 14. Takip edilen dokular silikon bloklama kaplarına gömülerek etiketlendi ve sertleşmesi için buzdolabına konularak parafin bloklar hazırlandı.
- Sertleşen bloklardan Leica® RM 2125 RT mikrotom aleti ve Leica® mikrotom bıçakları kullanılarak 4-5 µm kalınlığındaki parafin kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu, hasar alanlarını değerlendirmek için hematoksilen-eozin, Luxol Fast Blue boyaması, apoptozisi göstermek için TUNEL yöntemi ile immunhistokimyasal boyama yapıldı.

Hematoksilen-Eozin Boyama

Parafin kesitler 60°C'de etüvde bekletildi.

1. Ksilol I'de 2 dakika bekletildi.
2. Ksilol II'de 2 dakika bekletildi.
3. İki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletildi.
4. İki defa %96'luk alkolde 1'er dakika bekletildi.
5. Akan suda yıkandı.
6. Hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildi.
7. Akan suda yıkandı.
8. Asit alkole 2 kere daldırıldı.

9. Akan suda yıkandı.
10. Amonyaklı suda 10-15 saniye bekletildi.
11. Akan suda yıkandı.
12. %80'lik alkolde 1 dakika bekletildi.
13. Eozin boyasında 1 dakika bekletildi.
14. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi.
15. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi.
16. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

Myelin boyaması

Kluver ve Barrera'nın 1953 yılında yayınladıkları makaledeki yöntemlerine uyularak myelin boyaması yapıldı (120).

Luxol Fast Blue solüsyonu:

Luxol Fast Blue 0.25 gr.

%95'lik alkol 250 ml.

içinde çözülür. Her 100 ml. İçin 0.5ml. %10'luk asetik asit eklenir.

Kristal viyole solüsyonu:

Kristal viyole 0.25 gr.

Distile su 250 ml. İçinde çözülür. Kullanmadan önce 0,15-0,20 %10'luk glisial asetik asit eklenir, 57 °C etüvde ısıtılır.

Lityum karbonat solüsyonu:

Lityum karbonat 0.1 g.

Distile su 200 ml. İçinde çözülerek kullanılır.

Boyama prosedürü:

1. Deparafinizasyon işleminden geçirilen kesitler, % 95'lik alkole alınır.
2. Luxol fast blue boyasında 60°C'lik etüvde bir gece bekletilir.
3. % 95'lik alkole alınıp boya artıkları giderilir.
4. Distile suda yıkanır.
5. Lityum karbonatta 10 sn. tutulur.
6. %70'lik alkole alınır.
7. Bu aşamada kesitlere mikroskopta bakılarak gri madde renksiz, beyaz madde yeşilimsi mavi olana kadar lityum karbonat ve alkol aşaması tekrarlanır.
8. Distile suya alınır.
9. Kristal viole solüsyonunda 6 dk. bekletilir.

10. % 95'lik alkolde birkaç defa bekletilir.
11. Absolü alkole alınır.
12. Ksilende 2 defa bekletildikten sonra lamelle kesitler kapatılır.
13. Sonuçta myelin mavi, sinir hücreleri pembe-mor görülürler.

İmmunhistokimyasal İnceleme

TUNEL boyaması

Hazırlanan parafin bloklardan polizimli lamlara (Menzel Glaser) 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Medulla spinalis dokularında apoptotik hücreleri göstermek için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) yöntemi ile In Situ Cell Death Detection Kit, POD (ROCHE, ABD, 50 test, cat no: 11 684 817 910, lot no: 10854100) apoptoz kiti kullanılarak immün işaretleme yapıldı.

Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinukleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinukleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile ters boyama yapılarak deney sonlandırılır.

Polizimli lamlara 4-5 µm kalınlığında alınan kesitler 1 gece boyunca 37 °C'lik etüvde bekletildi. Ertesi sabah 2 saat 54 °C'lik etüvde bekletilen dokular ksilene alındı.

1. Üç kere 5'er dakika ksilende bekletildi.
2. Etüvde kurutulan dokuların etrafı etüvden çıkınca pappen ile çizildi.
3. On dakika %100'lük alkolde bekletildi.
4. On dakika %96'lık alkolde bekletildi.
5. On dakika %90'lık alkolde bekletildi.
6. On dakika %80'lik alkolde bekletildi.
7. On dakika %70'lik alkolde bekletildi.
8. Üç dakika distile suda bekletildi.
9. Fosfat tampon solüsyonunda (PBS) yıkandı.
10. Lamlar, içinde 200 ml. 0.1 M sitrat buffer pH 6.0 olan dayanıklı plastik kaba konarak 350 W'ta 5 dakika mikrodalgada kaynatıldı.
11. PBS içinde kesitler iki defa yıkandı.

12. Kitin içinden çıkan *label* solüsyonundan 100 µl. Negatif kontrol için ayrıldı. (Negatif kontrol için 50 µl. Label solüsyonu TUNEL reaksiyon karışımı yerine kullanıldı.)
13. Kalan 450 µl. *label* solüsyonuna 50 µl. enzim solüsyonunun tamamı konup 500 µl.'ye tamamlanarak TUNEL reaksiyon karışımı yapıldı. İyice karıştırıldı.
14. Kesit etrafındaki bölge kurulandı.
15. Örnek üzerine 50 µl. TUNEL reaksiyon karışımı kondu. Buharlaşmayı önlemek için üzeri parafilm veya plastik lamel kapatılarak 60 dakika 37C°'de nem kabininde inkübe edildi.
16. Süre sonunda kesitler PBS ile 3 defa yıkandı.
17. Örneklerin etrafı kurulandı.
18. Örneklerin üzerine 50 µl. Converter POD damlatıldı. Buharlaşmayı önlemek için üzeri parafilm veya plastik lamel kapatılarak 30 dakika 37C°'de nem kabininde inkübe edildi.
19. Süre sonunda kesitler PBS ile 3 defa yıkandı.
20. 50-100 µl. DAB Substrat eklenerek 10 dakika 15-25 C°'de inkübe edildi.
21. Distile su ile 3 defa yıkandı.
22. *Metil green*'le zıt boyama yapıldı.
23. Distile su ve musluk suyunda bekletildi.
24. Alkol ve ksilende bekletildi.
25. Entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.
26. Apoptotik hücreler ışık mikroskopla analiz edildi.

Elektron mikroskopik blok hazırlanması

1. Alınan medulla spinalisin kore parçası trimlenerek küçük parçalara ayrıldı.
2. Glutaraldehit solüsyonunda (%2,5, pH: 7,25) 24-48 saat buzdolabında dokular tespit edildi.
3. Dokular tespit sonrası A+B solüsyonu ile 4 defa yıkandı.

Sodyum fosfat tamponun hazırlanması:

A Solüsyonu:

Sodyum monobazik fosfat (NaH_2PO_4)	1,186 gr.
Distile su	100 ml.

B Solüsyonu:

Mono potasyum fosfat (KH_2PO_4)	0,907 gr.
Distile su	100 ml.

ile karıştırıldı. A solüsyonundan 20 ml. B solüsyonundan 80 ml. alıp 100 ml. ye tamamlandı. Bu solüsyondan 8 ml. atılarak yerine 8 ml. glutaraldehit (Merck) koyuldu. Bu yeni karışımın pH değeri 7.2-7.4 arasında olacak şekilde 7,25 bulundu.

4. Hazırlanan % 1'lik osmiyum tetroksitten bir ölçü, A+B solüsyonundan bir ölçü alınıp hazırlanan solüsyon içinde ikinci kez tespit için buzdolabında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.

Osmiyum tetroksit hazırlanışı:

100 mg. Osmiyum tetroksit (OsO_4) (Merck) içeren ampul kırılarak 5 ml. distile su içinde hava ve ışık almayacak şekilde koyu renkli cam şişede çözöldü. Bu karışım 1 gece buzdolabında bekletildi. Osmiyum tetroksit çok toksik olduğu için uygun şartlarda saklanıp, kullanım sonrasında da yine uygun şartlarda imha edilmesi gereken bir kimyasaldır.

5. A+B ile 2 kez yıkandı.

6. Etil alkol serilerinde tutuldu.

%50 alkolde 15 dakika bekletildi.

%60 alkolde 15 dakika bekletildi.

%70 alkolde 15 dakika bekletildi.

%80 alkolde 15 dakika bekletildi.

%90 alkolde 15 dakika bekletildi.

%96 alkolde 15 dakika bekletildi.

%96 alkolde 15 dakika bekletildi.

%100 alkolde 30 dakika bekletildi.

%100 alkolde 30 dakika bekletildi.

7. Dokular propilen oksit içinde 10 dakika bekletildi.

8. Gömme materyalinde 1 gece bekletildi.

Gömme materyali: 2,5 ml. Araldit 2,5 ml. DDSA yarı yarıya karıştırıldı. Aynı yönde bagetle 15 dakika köpürtmeden karıştırılıp hazırlandı.

9. Ertesi gün, taze hazırlanmış araldit karışımına dokular konarak 2 saat oda ısısında, 2 saat 40°C'lik etüvde bekletildi.

10. Araldit karışımı jelatin kapsüllere kondu, dokular gömüldü, etiketlenerek bloklama yapıldı.

Araldit karışımının hazırlanışı:

Araldit CY212

5 ml.

2-Dodecenyl succinic anhidrit (DDSA), sertleştirici	5 ml.
Benzil dimetil amin (BDMA) , hızlandırıcı	0,2 ml.
Dibütilfitalat, plastikleştirici	0,2 ml.

11. 40°C'lik etüvde 24 saat

12. 60°C'lik etüvde 48 saat bekletildi, etüv kapağı etüv soğumadan açılmadı.

Hazırlanan araldit bloklardan 1µm kalınlığında yarı ince kesitler ultratomda alınarak Toluidin Mavisi-Pironin ile boyandı. Işık mikroskopta incelenerek uygun alanlar işaretlendi. 300-700 Å kalınlığında ince kesitler gridler üzerine alındı. İnce kesitler kurşun sitrat-uranil asetat ile boyandı. Kesitler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Zeiss 9EM elektron mikroskobunda incelendi.

İstatistiksel Değerlendirme

Yapılan çalışma sonrası elde edilen hayvan ağırlıkları ve biyokimyasal veriler, Graphpad 3.0 istatistik programı kullanılarak, One Way Anova Testi ve Post Hoc Tukey testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

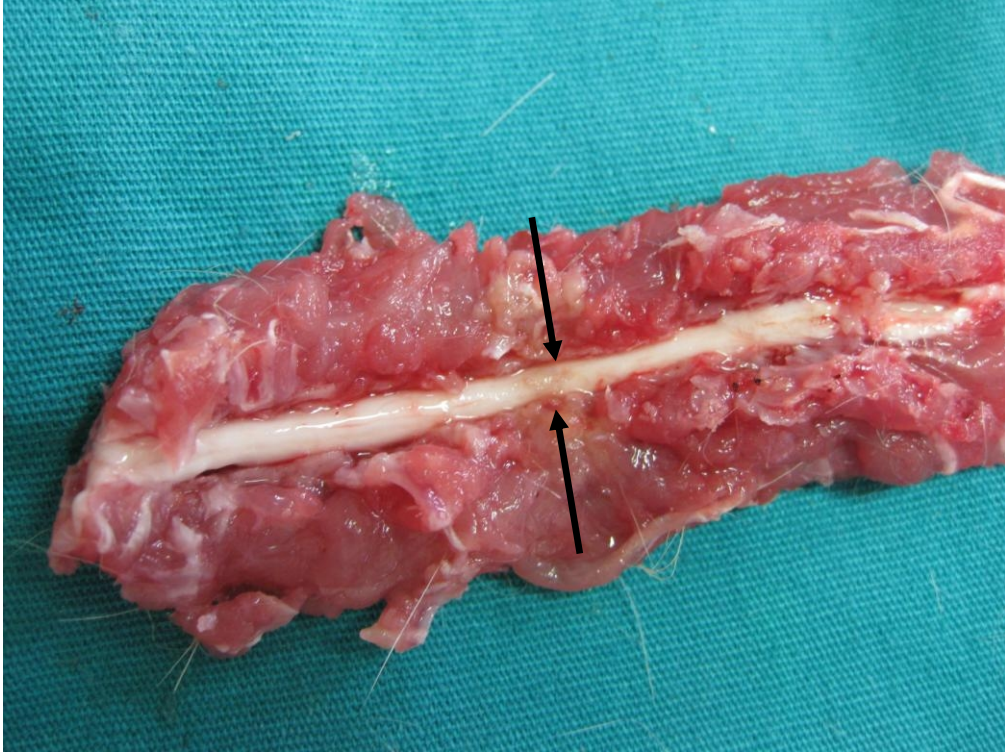
8. BULGULAR

Spinal kord basısı sonrasında anestezinin etkisi geçtiğinde hayvanlarda arka ayaklarını sürüme gözlenerek ratlarda alt ekstremitelerde parapleji olduğu görüldü. Deney süresi olan 7 günün sonlarına doğru alt ekstremitelerde belirgin atrofi gözlemlendi. Deney öncesi ve sonrasında tartılan deneklerin vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 1).

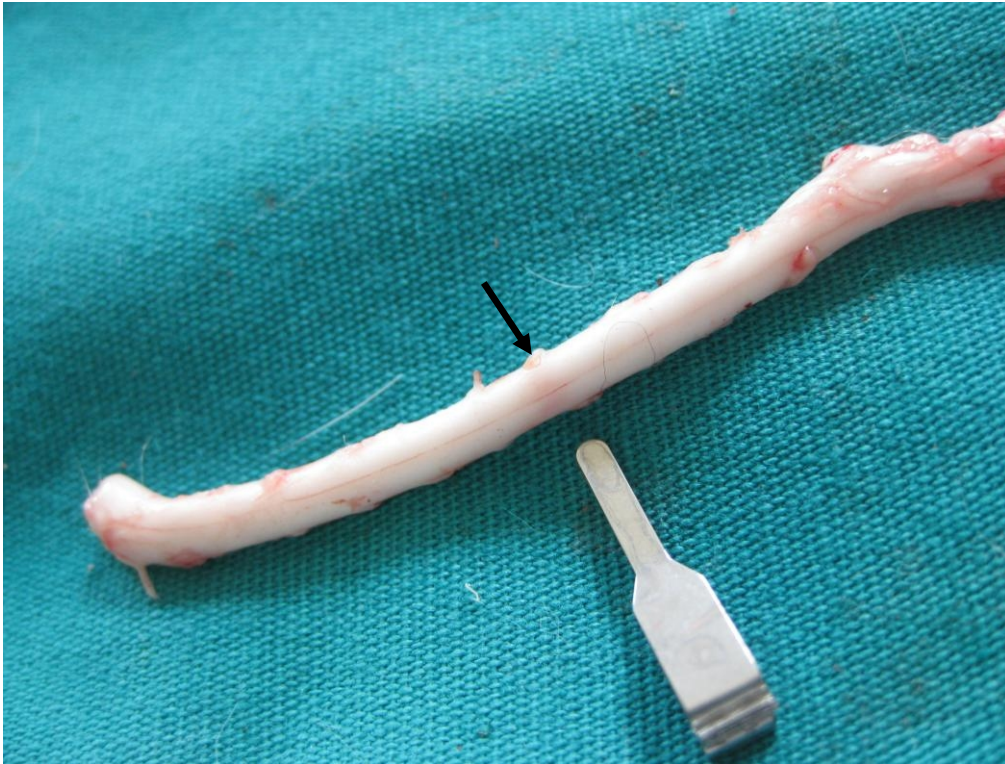
Tablo 1. Deneklerin vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

Grup	Sham	Hasar	MP	Rapamisin	Agmatin
İlk ağırlık(gr)	241,5±20,07	305,3±70,31	179,2±11,78	179,4±14,72	175,2±7,430
Son ağırlık(gr)	232,3±12,84	300,8±69,00	175,6±9,450	176,4±15,04	171,6±8,989

Hayvanlar kurbanı edildikten sonra, çıkarılan medulla spinalis yapılarında hasar alanlarında makroskopik olarak ödem ve kanama görüldü (Şekil 7, Şekil 8).



Şekil 7. Hasar alanında ödem görülmektedir (→).



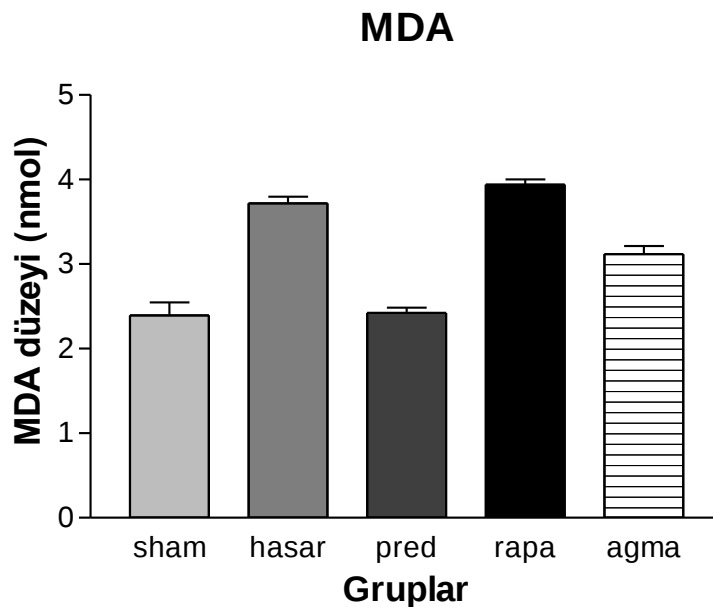
Şekil 8. Hasar alanında kanama görülmektedir (→).

9.1. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplarda dokuda MDA, glutatyon peroksidaz düzeylerine, plazmada ise; katalaz ve süperoksit dismutaz düzeylerine bakıldı. Elde edilen değerler aşağıda bulunan Tablo (2,3,4,5) ve grafiklerde (1,2,3,4) gösterilmiştir.

Tablo 2. Dokuda tespit edilen MDA değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	Hasar ($\pm$ SD)	Hasar+MP ($\pm$ SD)	Hasar+ Rapamisin ($\pm$ SD)	Hasar+ Agmatin ($\pm$ SD)
MDA nmol	2,395 $\pm$ 0,3742	3,720 $\pm$ 0,1888	2,422 $\pm$ 0,1519	3,942 $\pm$ 0,1439	3,117 $\pm$ 0,2401



Grafik 1. Tüm gruplar için ölçülen MDA değerleri

Sham kontrol grubuyla, hasar, rapamisin ve agmatin grupları arasında anlamlı fark görüldü.

$P < 0.001$

Hasar grubuyla metilprednizolon grubu arasında anlamlı fark vardı. $P < 0.001$

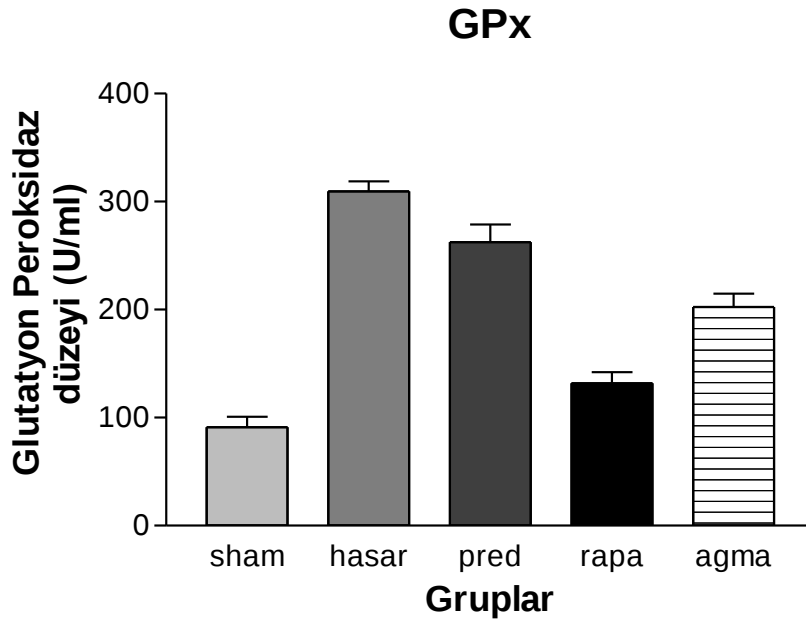
Hasar grubuyla agmatin grubu arasında anlamlı fark vardı. $P < 0.01$

Metilprednizolon verilen grupla diğer rapamisin ve agmatin verilen ilaç grupları arasında anlamlı fark görüldü. $P < 0.001$

Hasar grubunda MDA değerlerinde artış olması, beklendiği gibi, lipid membranların hasarını göstermektedir. İlaç gruplarından, metilprednizolon ve agmatin MDA'yı anlamlı olarak düşürdüğü, lipid peroksidasyonunu azalttığı saptandı. Rapamisinin MDA üzerinde olumlu bir etkisi olmadığı görüldü. MDA seviyesinin düşürülmesinde en etkili olan ilaç metilprednizolon olup MDA sham kontrol grubu değerlerine yakın olarak tespit edildi.

Tablo 3. Dokuda tespit edilen Glutatyon peroksidaz değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	Hasar ($\pm$ SD)	Hasar+MP ($\pm$ SD)	Hasar+ Rapamisin ($\pm$ SD)	Hasar+ Agmatin ($\pm$ SD)
GPx U/ml	91,29 $\pm$ 23,02	309,7 $\pm$ 22,51	262,6 $\pm$ 39,78	132,0 $\pm$ 25,02	202,5 $\pm$ 30,31

**Grafik 2. Tüm gruplar için llen GPx değerleri**

Dokuda llen glutatyon peroksidaz düzeylerinin gruplararası karşılaştırmasında;

Sham ve hasar grubu arasında anlamlı fark gözlendi. $P < 0.001$

Sham ile metilprednizolon ve agmatin grubu arasında anlamlı fark gözlendi. $P < 0.001$

Hasar grubuyla rapamisin tedavi grubu arasında anlamlı azalma gözlendi. $P < 0.001$

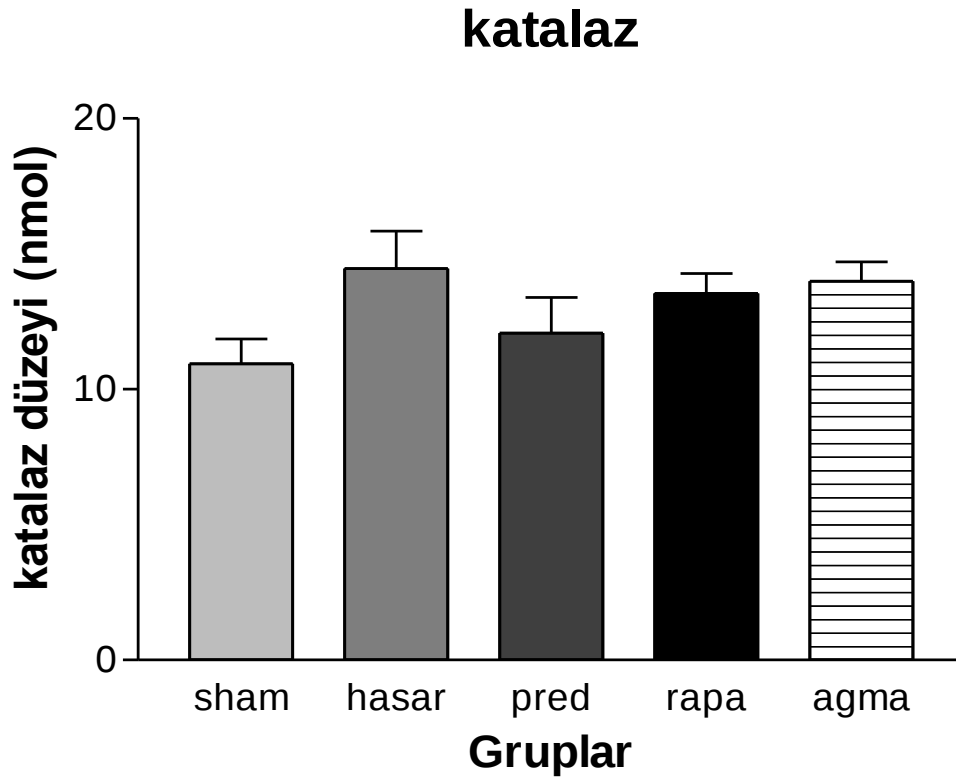
Hasar ile agmatin grubu arasında anlamlı azalma gözlendi. $P < 0.001$

Prednizolon ile rapamisin grubu arasında anlamlı fark bulundu. $P < 0.001$

Sham grubu ile karşılaştırıldığında glutatyon peroksidaz değerlerinin hasar grubunda anlamlı olarak arttığı görüldü. Bu sonuç hasarda serbest oksijen radikallerinin artmış olduğunu göstermekteydi. Rapamisin ve agmatinin GPx değerlerini anlamlı olarak azalttığı ancak sham kontrol grubuna göre ykseklіęin devam ettiği görüldü. Özellikle rapamisin etkisi daha fazla saptandı, değerler sham kontrol grubuna yakındı. Metilprednizolon, GPx değerini rapamisin ve agmatine göre daha az düşürmüştü.

Tablo 4. Plazmada tespit edilen Katalaz değerleri

Grup	Sham ($\pm$ SD)	Hasar ($\pm$ SD)	Hasar+MP ($\pm$ SD)	Hasar+ Rapamisin ($\pm$ SD)	Hasar+ Agmatin ($\pm$ SD)
Katalaz nmol	10,94 $\pm$ 2,237	14,47 $\pm$ 3,351	12,07 $\pm$ 3,244	13,54 $\pm$ 1,784	14,00 $\pm$ 1,727

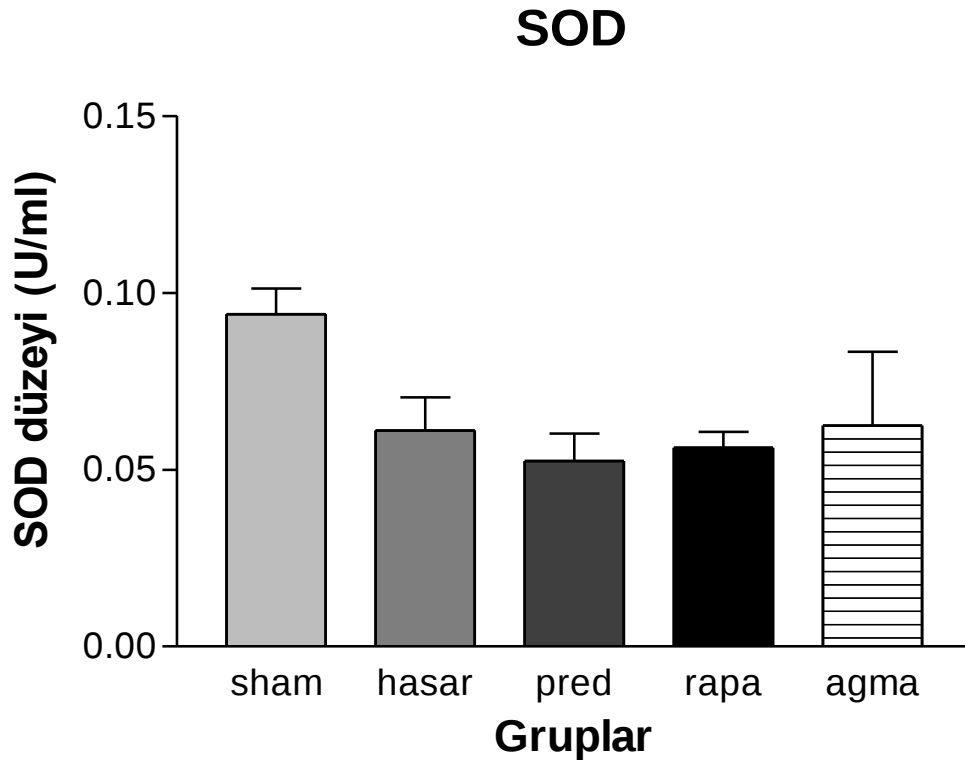


Grafik 3. Tüm gruplar için ölçülen katalaz değerleri

Sham kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hasar ve tedavi gruplarında katalaz değerlerinde artış görüldü. Agmatin verilen grup değeri hasar grubuna çok yakındı. Metilprednizolon ile tedavi edilen grup katalaz düzeyinde daha fazla azalma tespit edildi. Gruplardaki katalaz düzeylerindeki bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Tablo 5. Plazmada tespit edilen Süperoksit dismutaz (SOD) değerleri

Gruplar	Sham ($\pm$ SD)	Hasar ($\pm$ SD)	Hasar+ MP ($\pm$ SD)	Hasar+ Rapamisin ($\pm$ SD)	Hasar+ Agmatin ($\pm$ SD)
SOD düzeyi	0,09392 $\pm$ 0,02521	0,06106 $\pm$ 0,03974	0,05242 $\pm$ 0,02671	0,0562 $\pm$ 0,01427	0,06242 $\pm$ 0,07238

**Grafik 4. Tüm gruplar için ölçülen SOD değerleri**

SOD değerlerinde, sham kontrol grubuna göre hasar ve diğer gruplarda azalma saptandı. İlaç gruplarından agmatin bir miktar SOD’u yükseltse de anlamlı fark yaratacak düzeyde değildi. Gruplar arası SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

9.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Sham kontrol grubuna ait medulla spinalis yapılarının bütünlüğünü koruduğu, herhangi bir yapısal bozulmanın olmadığı görüldü (Şekil 9,10,11).

Hasar oluşturulan grupta medulla spinalis bütünlüğünün bozulduğu, gri ve beyaz maddelerin ayırt edilemediği, yaygın ödemin olduğu, miyelin yapılarının bozulduğu tespit edildi (Şekil 12,13,14). Gri ve beyaz maddeyi kapsayan hasar alanında ödemli bölgeler, hücre ve miyelın kaybı, inflamatuvar hücre artışı (Şekil 15), yarı ince kesitlerde ise hasar alanındaki akson ve miyelın bozulmaları, akson çekilmeleri, miyelınlerde vakuolizasyon, çok sayıda makrofaj belirgin olarak tespit edildi (Şekil 16).

Metilprednizolon kullanılan deneklerin medulla spinalis yapılarında hasarlı alanın daha küçük bir alanda devam ettiği (Şekil 17), hem gri hem de beyaz maddede kanama odakları (Şekil 18), miyelınlerde bozulma bu grupta da bulunmaktaydı. Yarı ince kesitlerde, hasarlı alanda akson ve miyelın bozulmaları belirgindi. Bozulmuş alanların arasında küçük çaplı aksonların çevresinde ince miyelın kılıflar yer almaktaydı (Şekil 19). Bu grupta makrofajlar daha az sayıda saptandı.

Rapamisin verilen grupta hasar alanı daha küçük boyutlarda izlendi. Beyaz maddede vakuolizasyon bulunmaktaydı, kanama alanları metilprednizolon grubuna göre daha az olarak saptandı (Şekil 20). Yarı ince kesitlerde bozulmuş miyelın ve akson yapıları ve büyük çaplı çok sayıda makrofaj tespit edildi (Şekil 21,22).

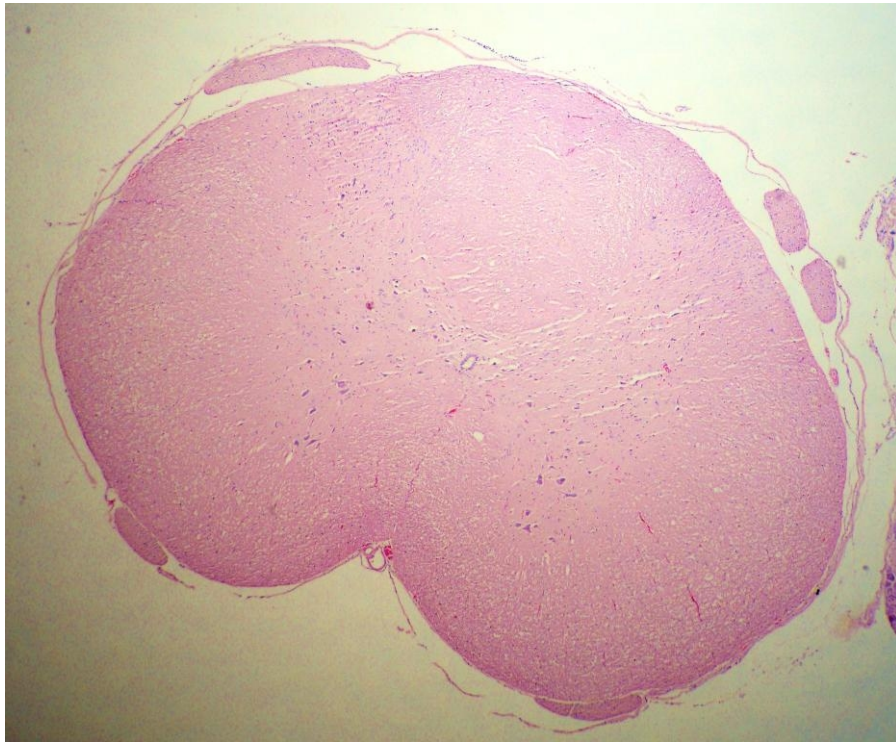
Agmatin grubunda hasar alanı hasar grubuna göre daha küçük olmasına karşın rapamisin ve metilprednizolon grubuna göre daha genişti (Şekil 23). Beyaz maddede vakuolizasyon, dejenere akson ve miyelın yapıları bu grupta da bulunmaktaydı (Şekil 24,25). Yarı ince kesitlerde gri maddede nöron yapılarının normal görünümde olduğu, Nissl cisimciklerinin bozulmadığı gözlemlendi (Şekil 26). Beyaz maddede miyelınli aksonların arasında uzantılı astrosit hücreleri (Şekil 27) ayırt edildi.

Sekonder lezyon alanlarının hasar ve tedavi gruplarında karşılaştırılmasında aynı, birbirine yakın sayıdaki kesitler kullanıldı. Metilprednizolon, rapamisin ve agmatin ile tedavi edilen gruplarda sekonder lezyon alanının hasarlı gruba göre çok daha küçük olduğu tespit edildi. Agmatin grubunda sekonder lezyon alanı rapamisin ve metilprednizolona göre daha büyüktü. Hasar ve rapamisin gruplarında lezyon alanlarında kanama, metilprednizolon ve rapamisin grubuna göre daha az olarak görüldü.

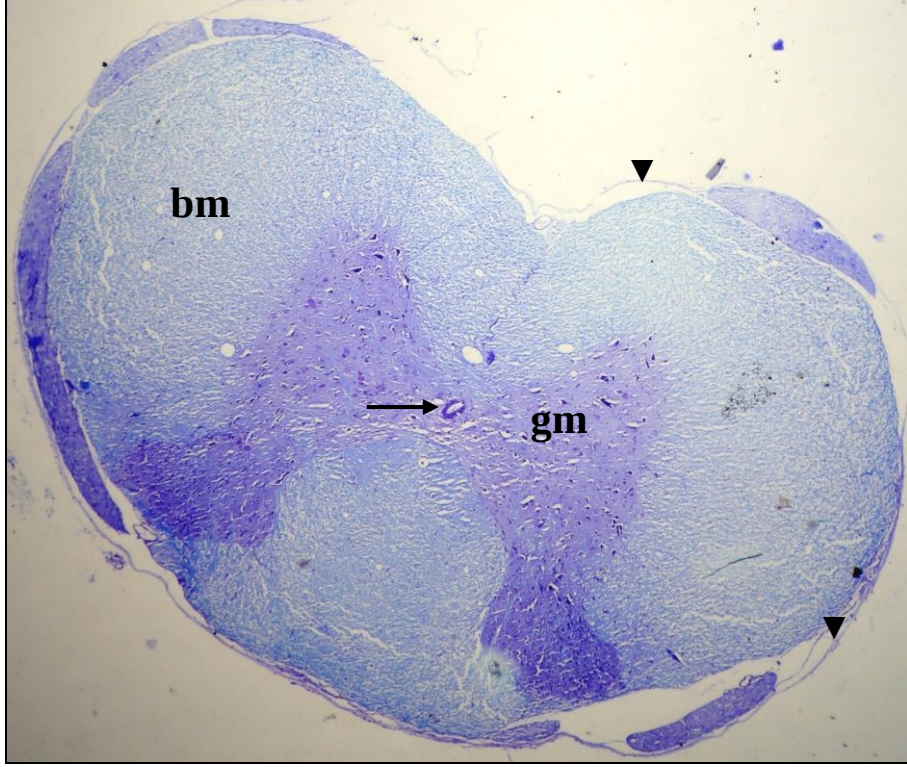
Apoptotik hücre tanımlamak için TUNEL boyaması uygulanan gruplar incelendiğinde sham, hasar, metilprednizolon ve agmatin grubuna ait medulla spinalis yapılarında apoptotik hücre saptanmadı (Şekil 28, Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31). Rapamisin ile tedavi edilen grupta beyaz maddede çok sayıda apoptotik hücreler tespit edildi (Şekil 32).

Elektron Mikroskopik bulgular:

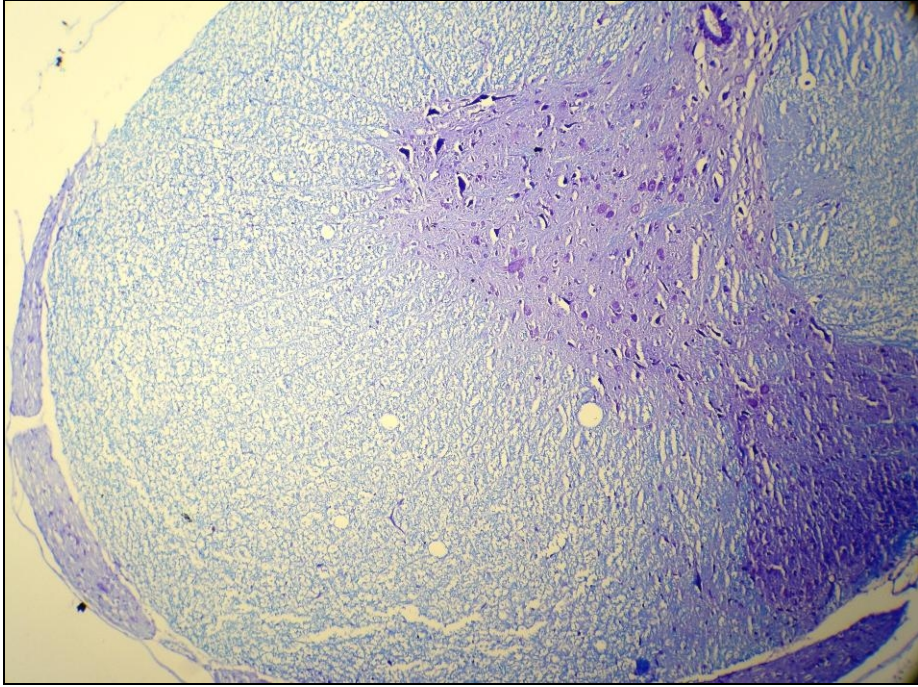
Hasar grubunda akson ve miyelin yapılarında ileri derecede bozulma, geniş ödemli alanlar görüldü (Şekil 34). Rapamisin grubunda parçalanmış miyelin lamellerinin akson içine uzandığı, akson içinde granüler madde birikiminin olduğu tespit edildi (Şekil 35). Agmatin grubunda miyelin tabakasında ayrılmalar, aksonlarda çekilmeler izlendi. Mitokondrilerde şişme gözlenmedi (Şekil 36). Metilprednizolon grubunda miyelinli liflerin görünümü agmatin grubuna benzemekteydi. Farklı çaplarda miyelinli aksonlar izlendi (Şekil 37). Rapamisin grubunda GER yapısı aktif belirgin olan nöronlar izlendi (Şekil 38).



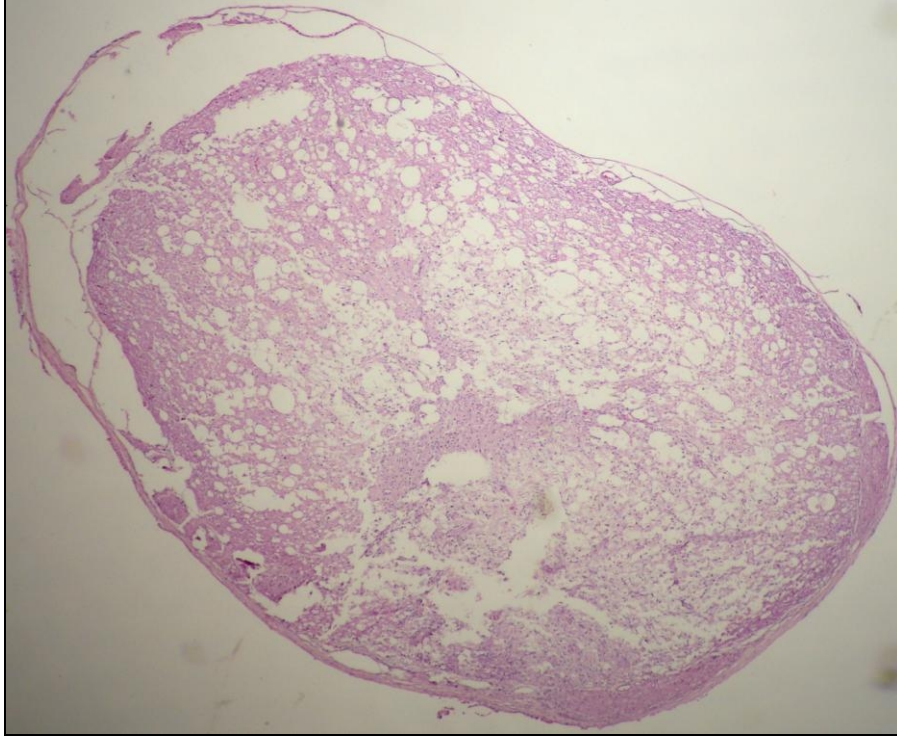
Şekil 9. Sham grubuna ait görüntü, Hematoksilen Eozin, x4



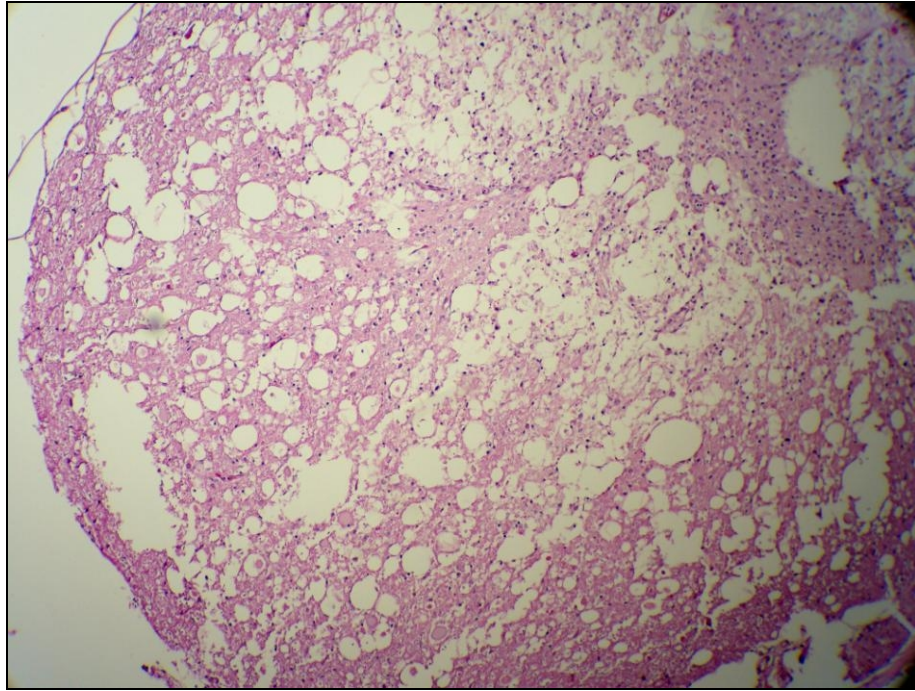
Şekil 10. Sham grubuna ait medulla spinalis kesiti. Kanalis sentralis (→), gri madde (gm), beyaz madde (bm) ve duramater (▼). Luxol Fast Blue, x4



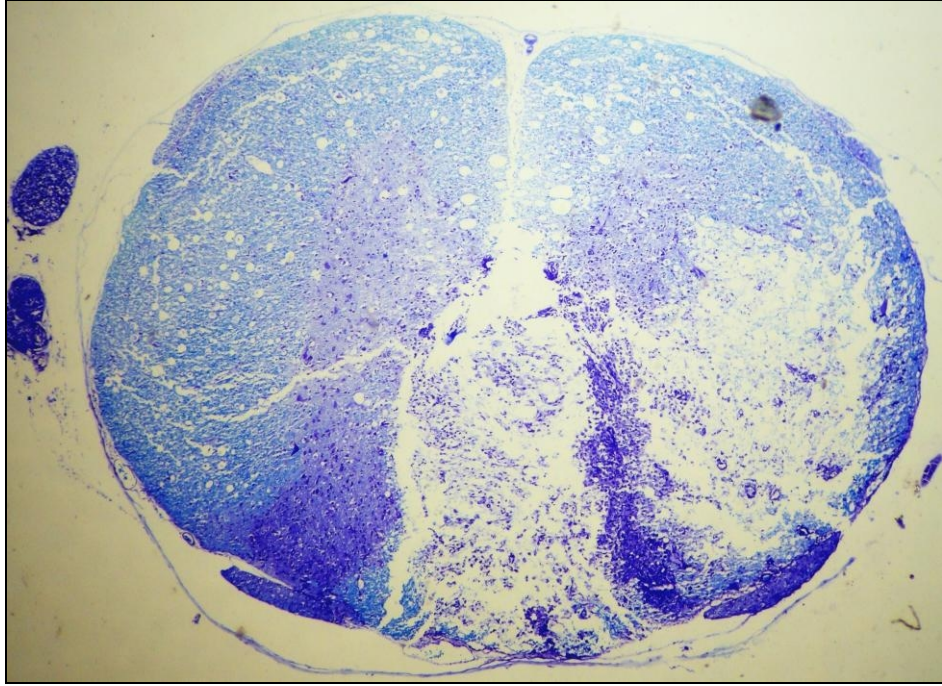
Şekil 11. Sham grubu, Luxol fast blue, x10



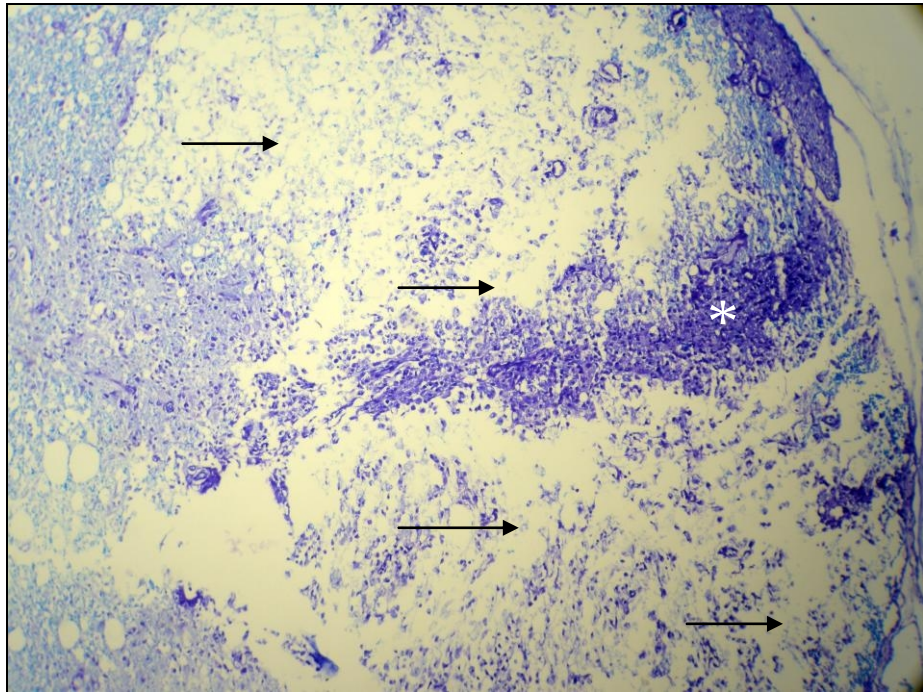
Şekil 12. Hasar grubunda bozulmuş beyaz ve gri madde bölümleri görülmekte. Gri madde sınırları seçilememektedir, ödemli alanlar belirgin olarak görülmektedir. HE, x4 (2550 μm 'den geçen kesit)



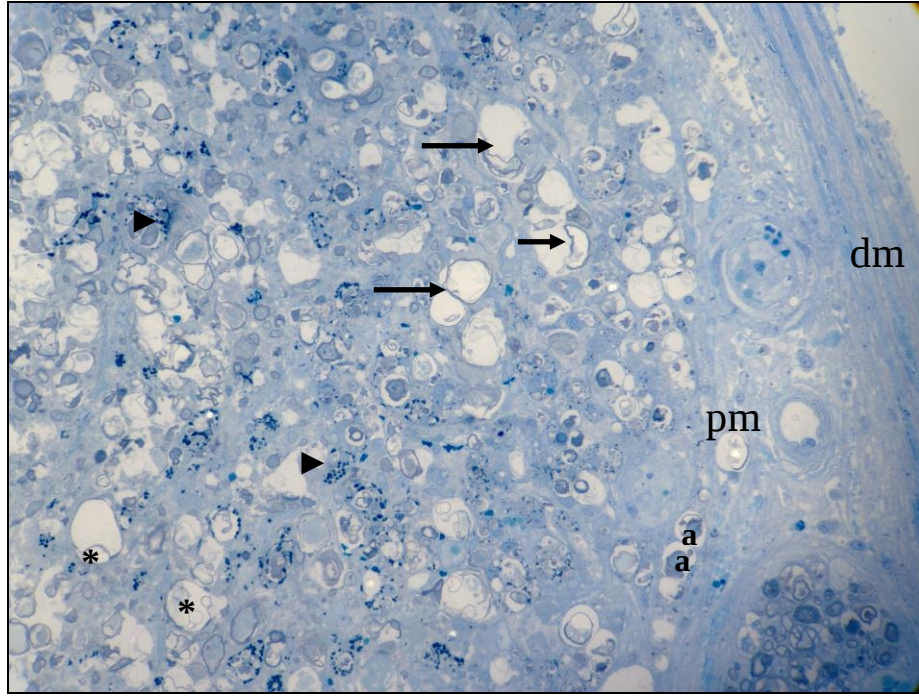
Şekil 13. Hasar grubunun vakuolize görünümü. HE, x10



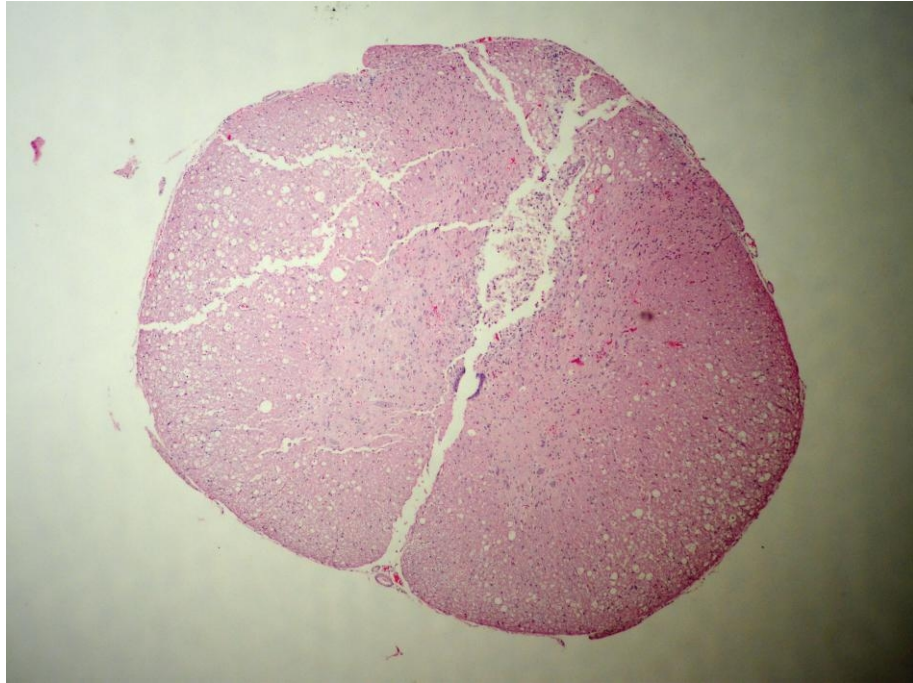
Şekil 14. Hasar grubunda bozulmuş miyelin yapıları ve ödem görülmektedir. Luxol fast blue, x4



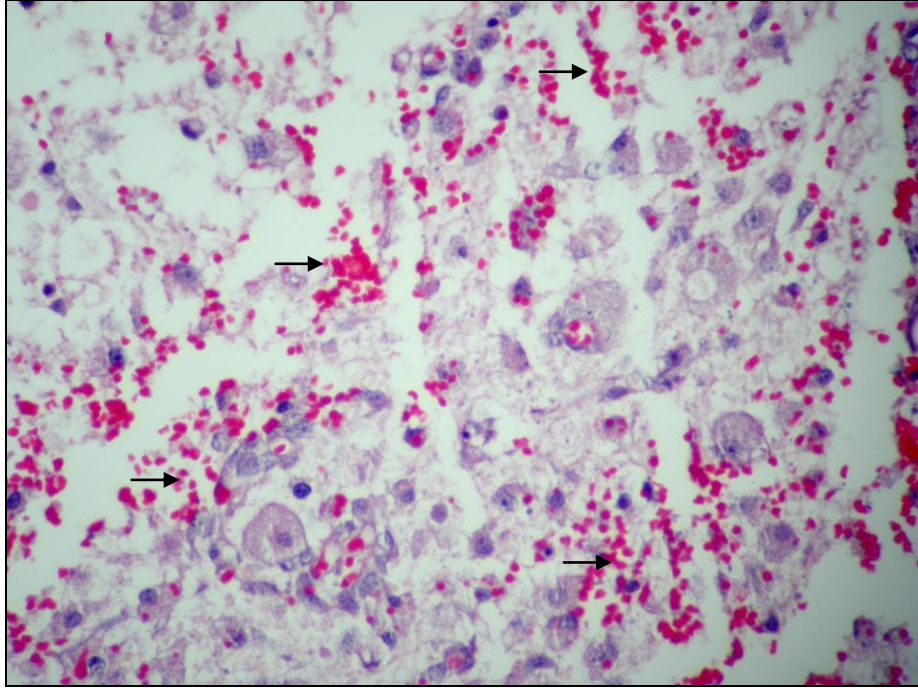
Şekil 15. Hasar grubuna ait ödemli alanlar(→) ve inflamatuvar hücre artışı(*) görülmekte. Luxol fast blue, x10



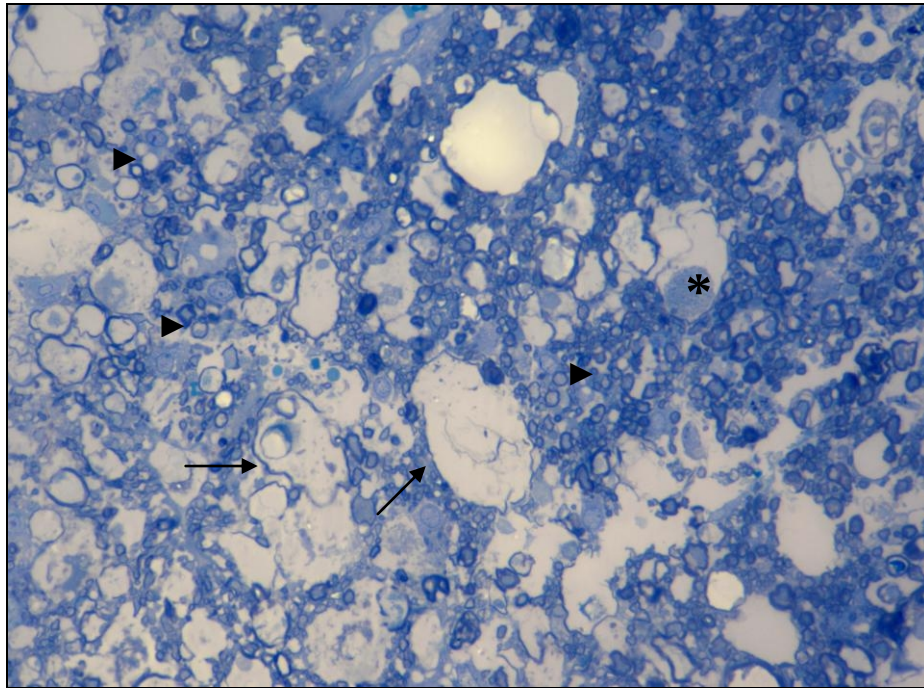
Şekil 16. Hasar grubunda beyaz maddede bozulmuş akson ve myelin yapıları(→), miyelinde vakuolizasyon (*), aksonda çekilmeler (a) ve çok sayıda makrofaj (▴) dikkat çekmektedir. Duramater (dm), piamater (pm), Toluidin blue-Pironin, x40



Şekil 17. Metilprednizolon grubunda hasar varlığını daha küçük bir alanda sürdürmektedir. (2500 µm'den geçen kesit) HE, x4



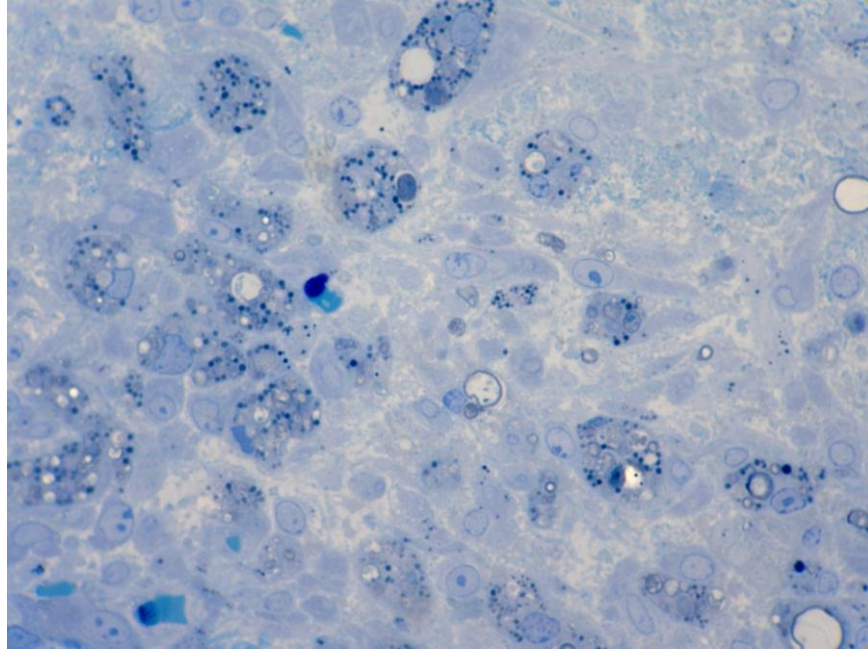
Şekil 18. Metilprednizolon grubunda gri ve beyaz maddede yaygın kanama alanları görülmekte (→). HE, x40



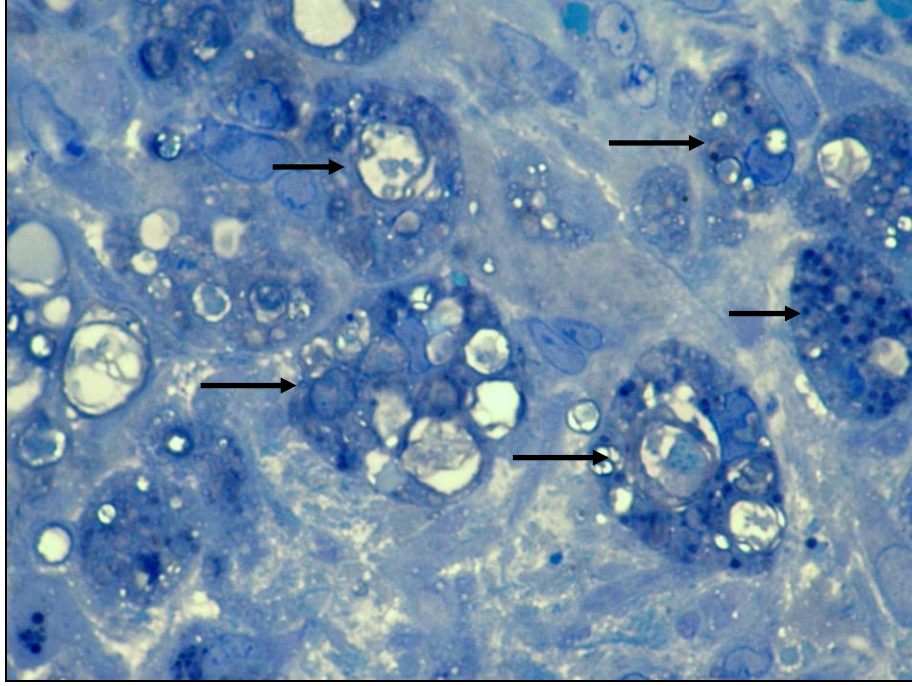
Şekil 19. Metilprednizolon verilen grupta akson çekilmeleri (*), miyelinde vakuolizasyon ve bozulmalar (→), çok sayıda küçük çaplı aksonlar (▶). Toluidin blue-Pironin, x40



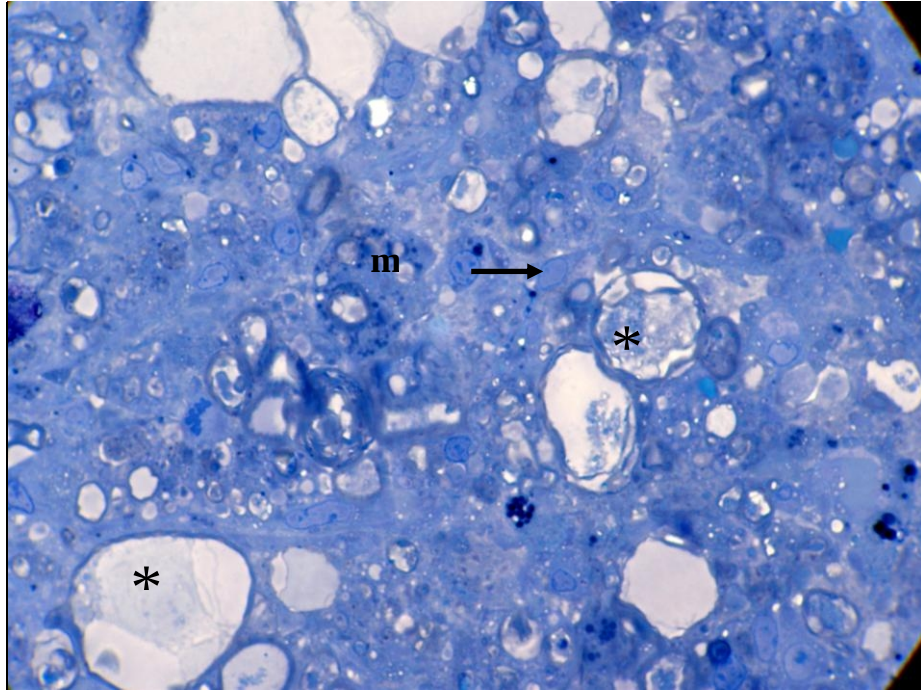
Şekil 20. Rapamisin grubuna ait medulla spinalis yapısında daha küçük bir hasar alanı, beyaz maddede vakuolizasyon görülmekte. (2500 μm 'den geçen kesit) ,HE, x4



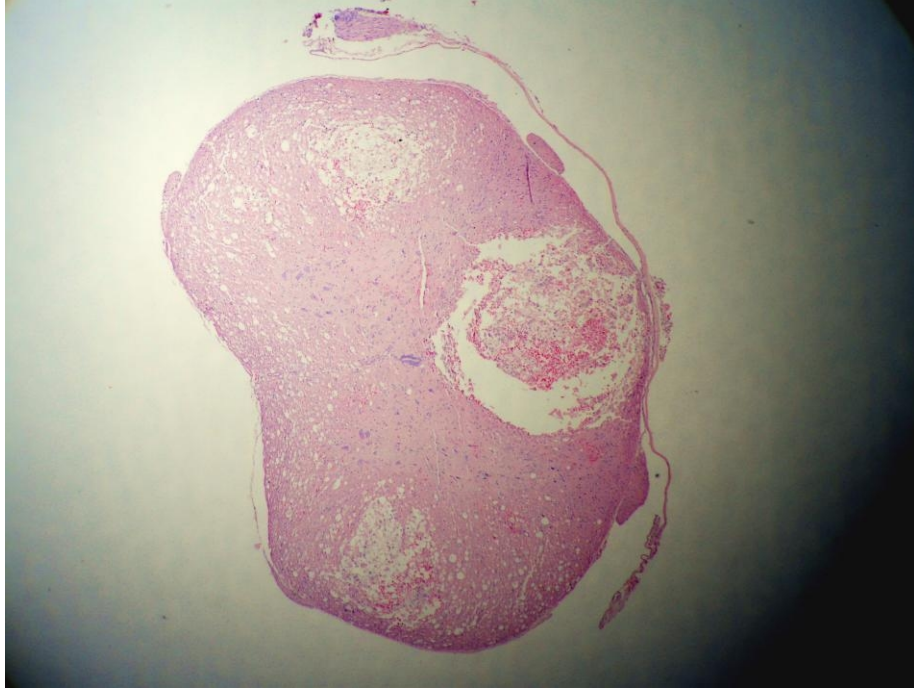
Şekil 21. Rapamisin grubunda fagositik makrofajlar görülmekte. Toluidine blue- pironin,x40



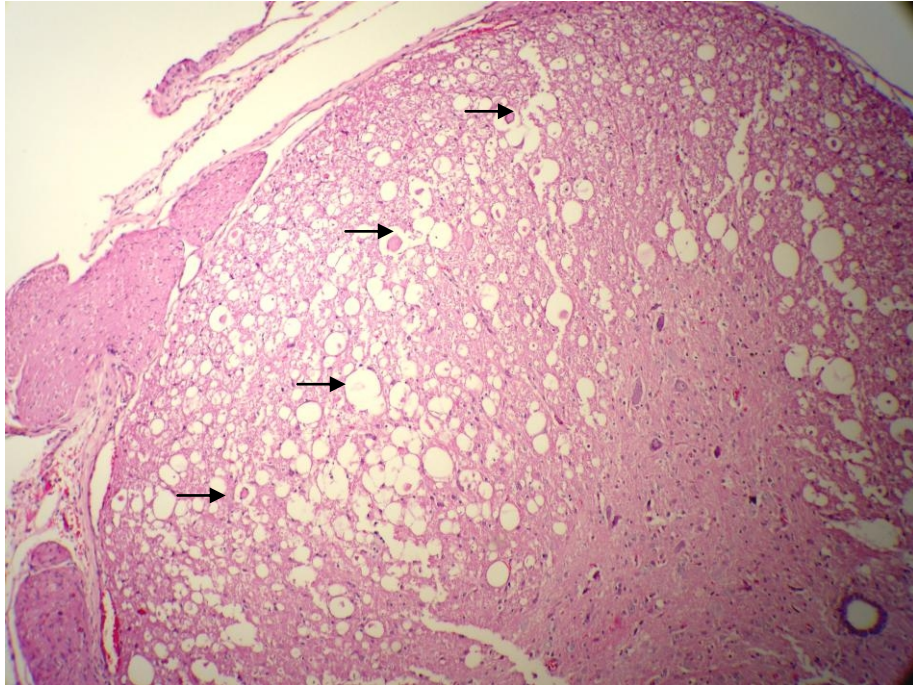
Şekil 22. Hasar ve diğer tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında rapamisin grubunda çok sayıda fagositik materyal içeren büyük makrofajlar görülmekte(→). Toluidin blue-Pironin, x100



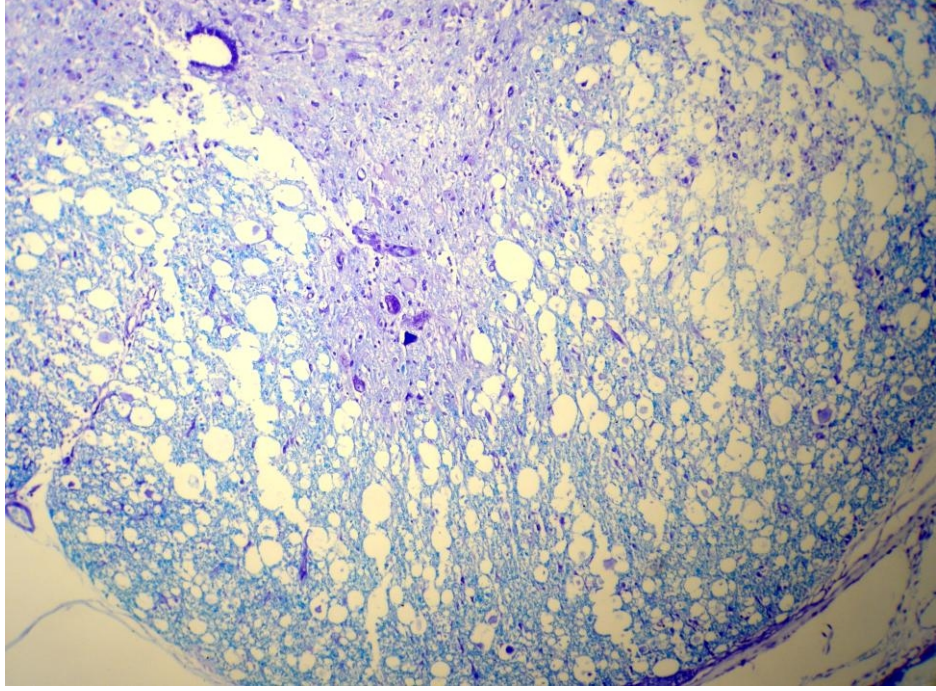
Şekil 23. Rapamisin grubunda büzülmüş akson yapıları (*), oligodendroglia hücreleri (→) yapısı bozulmuş miyelin kılıflar ve vakuollü artık miyelinleri fagosit etmiş iri makrofajlar (m) görülmektedir. Toluidin blue-Pironin, x100



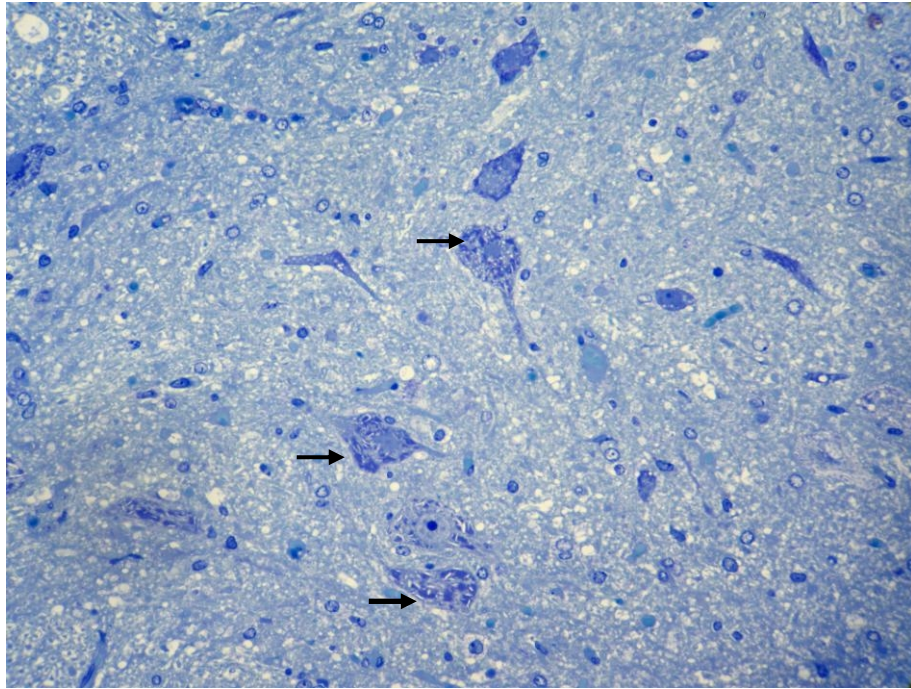
Şekil 24. Agmatin grubuna ait genel görünüm. Aynı düzeyden geçen kesitlerle karşılaştırıldığında metilprednizolon ve rapamisin grubuna göre sekonder lezyon alanı daha geniş olarak görülmektedir. (2500 μm 'den geçen kesit) HEx4



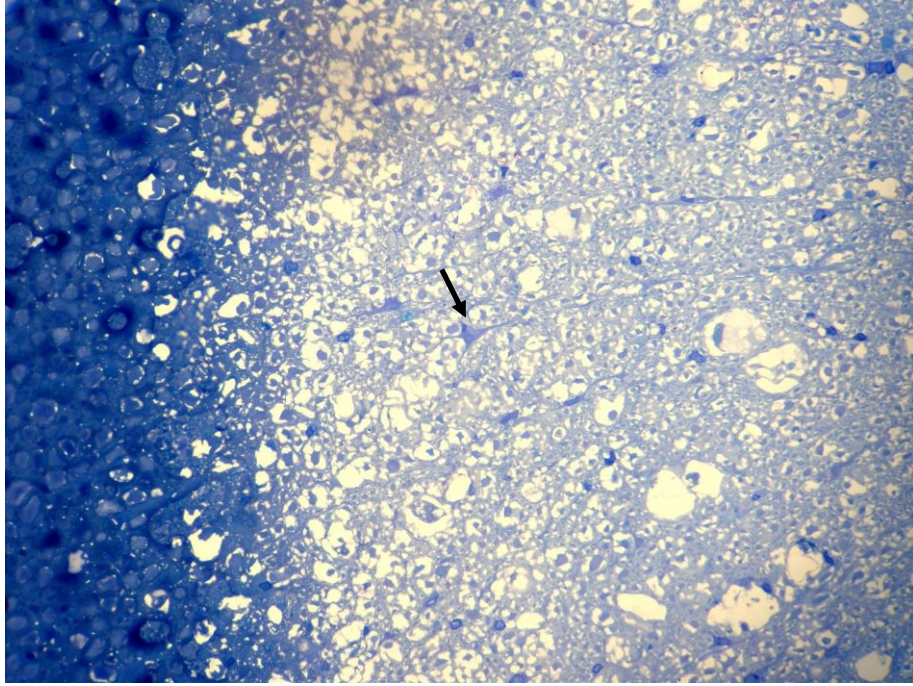
Şekil 25. Agmatin grubunda ve vakuolize görünüm, bozulmuş miyelin ve akson yapıları($\rightarrow$), korunmuş gri madde ve nöronlar, HE, x10



Şekil 26. Agmatin grubunda miyelin bozulması görülmekte. Luxol fast blue, x10



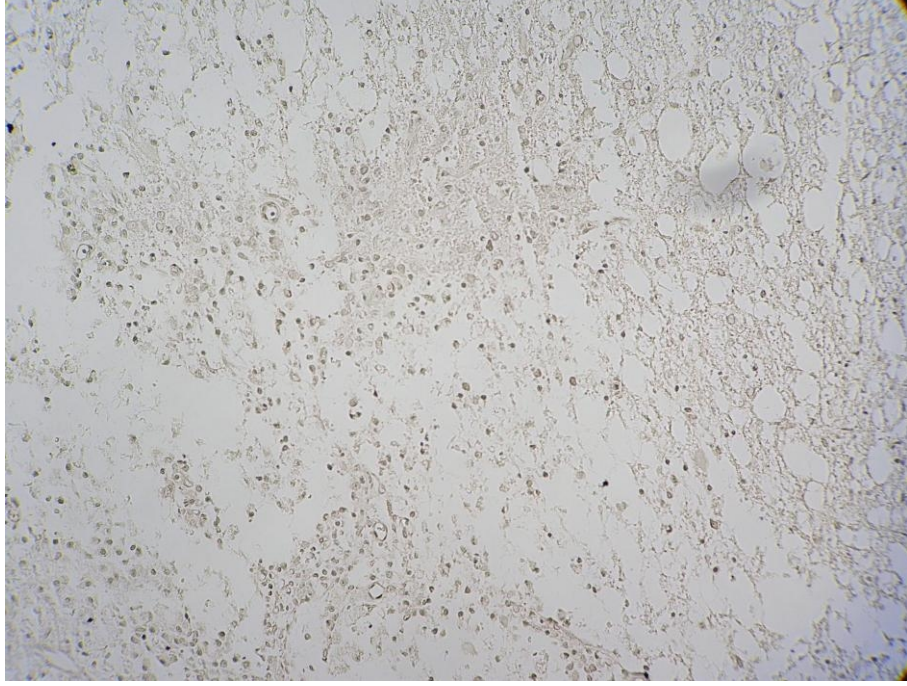
Şekil 27. Agmatin grubunda bozulmamış nöron yapıları ve belirgin Nissl cisimcikleri (→) görülmekte. Toluidin blue-Pironin, x40



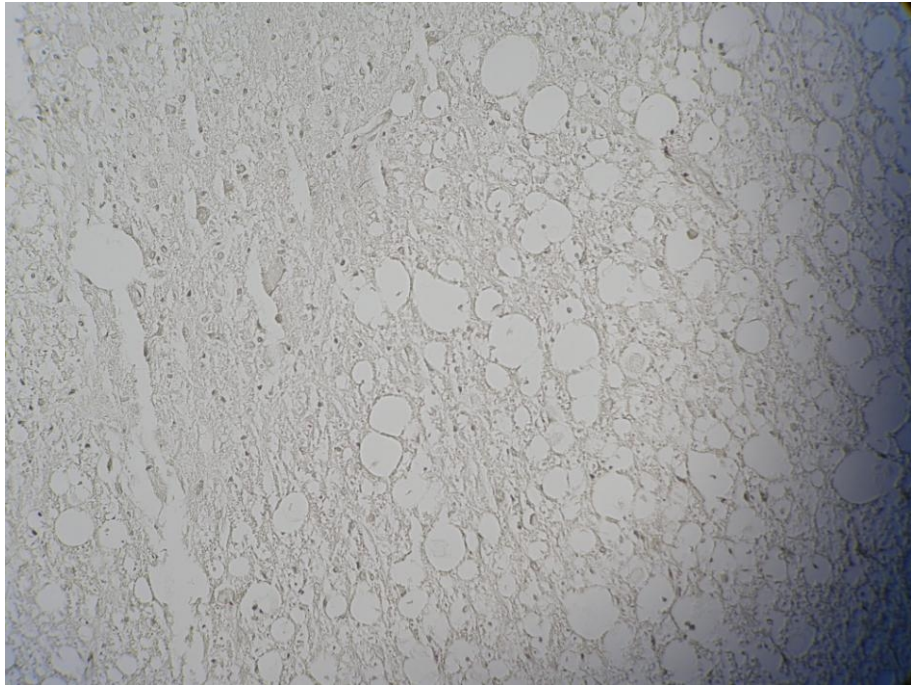
Şekil 28. Agmatin grubuna ait yarı ince kesitte miyelinli sinir lifleri arasında sitoplazmik uzantıları belirgin astrositler (→) gözlenmektedir. Toluidin blue-Pironin, x40



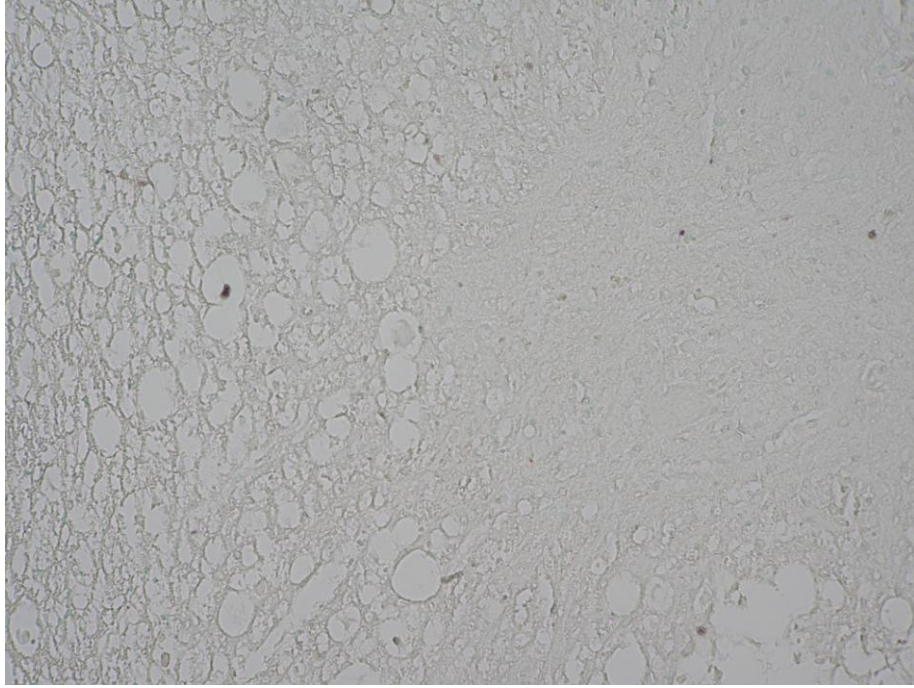
Şekil 29. Sham grubuna ait TUNEL boyamasında apoptotik hücrelerin olmadığı görülmekte, x40



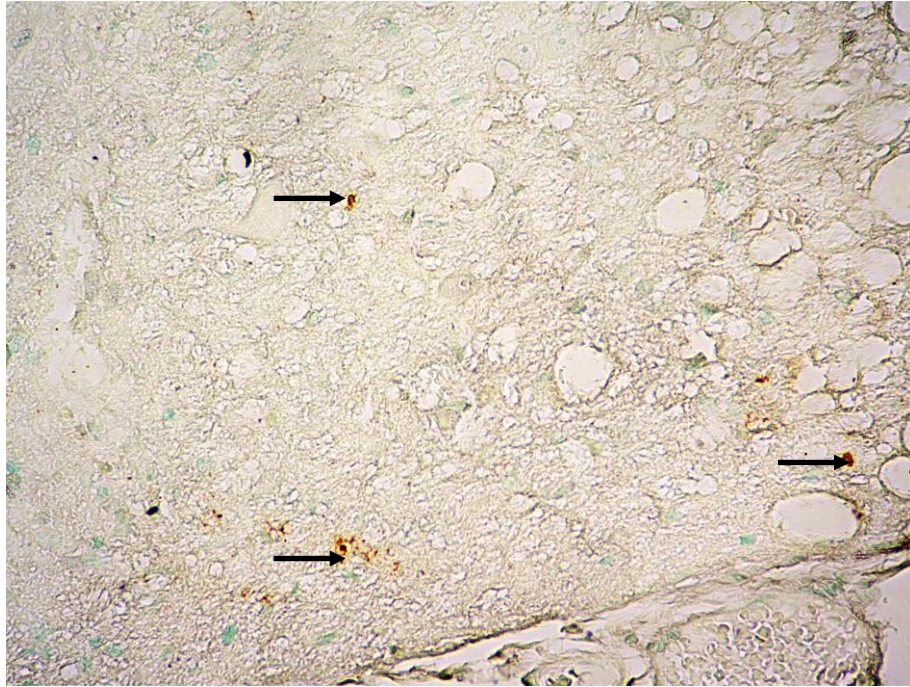
Şekil 30. Hasar grubuna ait TUNEL boyamanın olmadığı görülmekte, x40



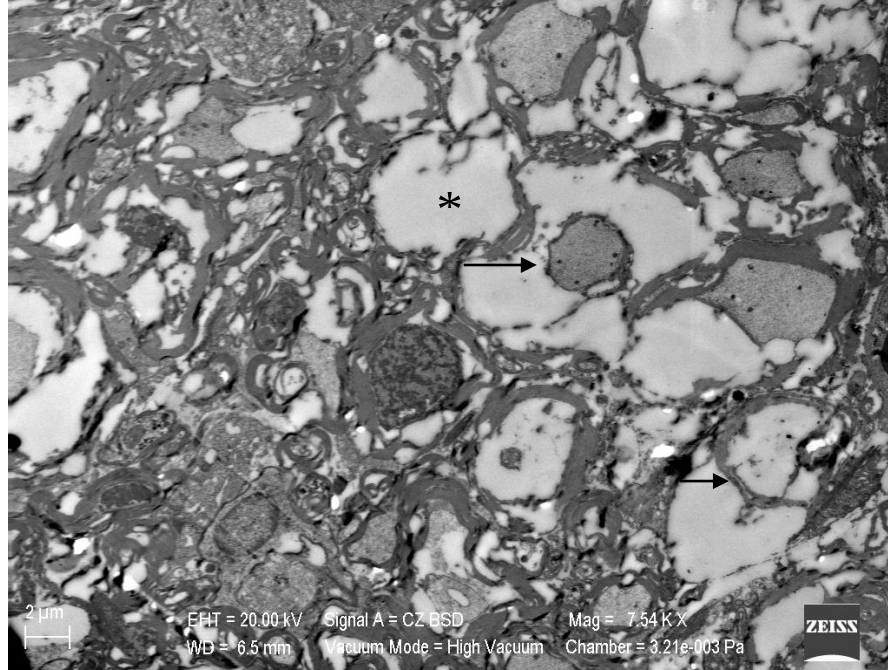
Şekil 31. Metilprednizolon grubuna ait TUNEL boyaması, x40



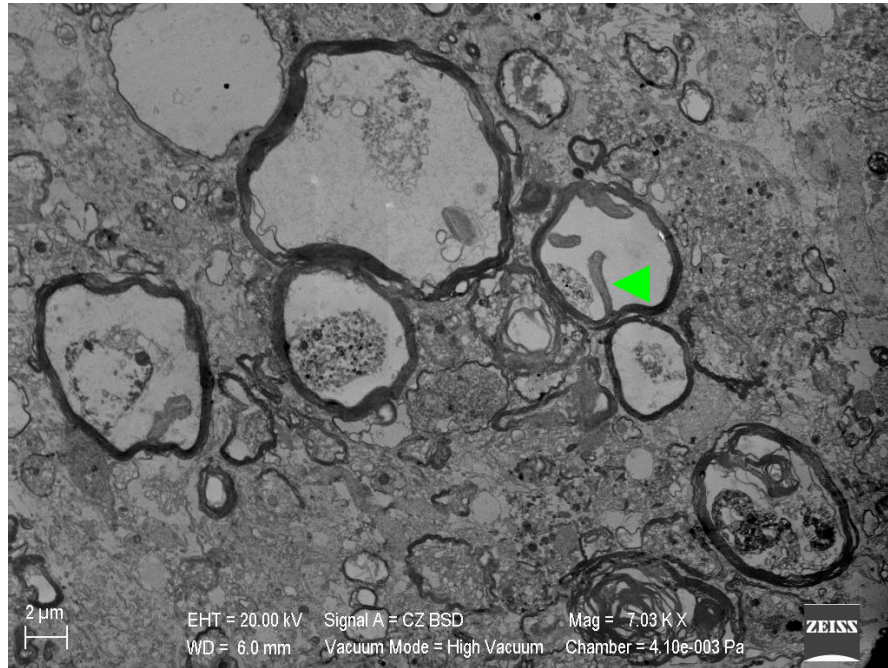
Şekil 32. Agmatin grubunda TUNEL apoptotik hücrelerin olmadığı görülmekte, x40



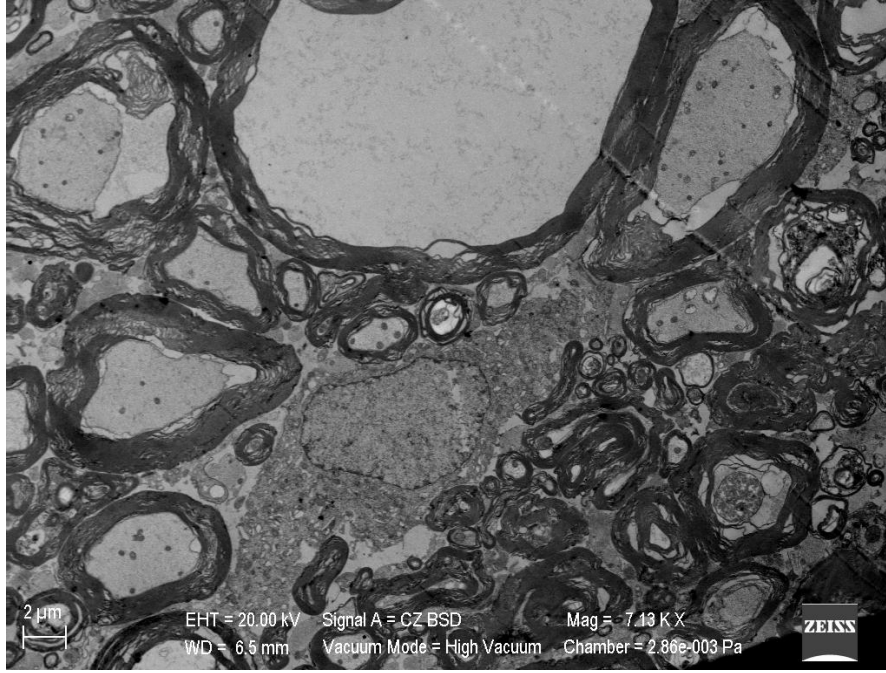
Şekil 33. Rapamisin grubunda beyaz maddedeki apoptotik glial hücreler görülmekte(→),TUNEL yöntemi, x40



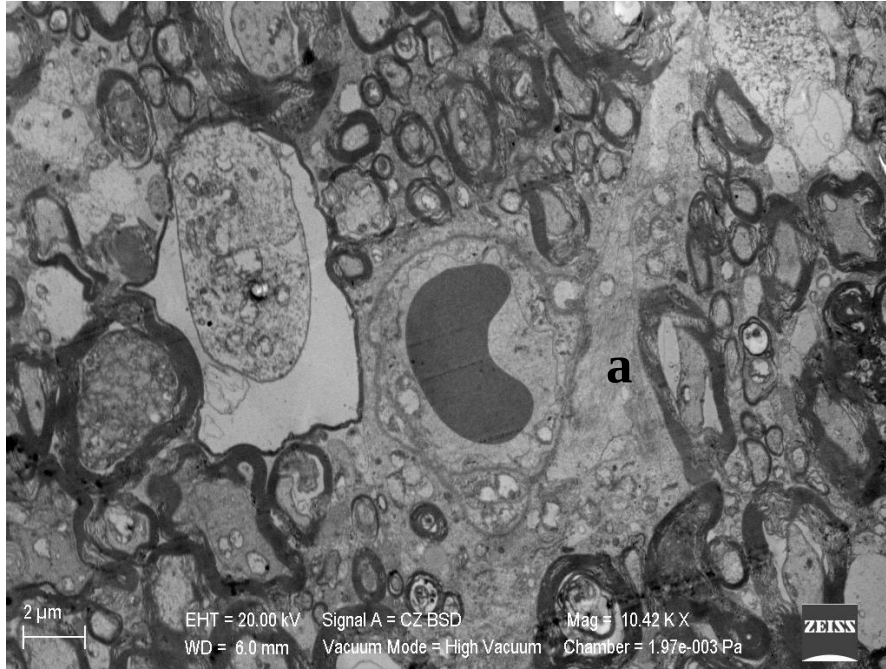
Şekil 34. İskemi grubunda ödemli alanlar (*) ve bozulmuş miyelin ve akson yapıları (→) görülmekte.



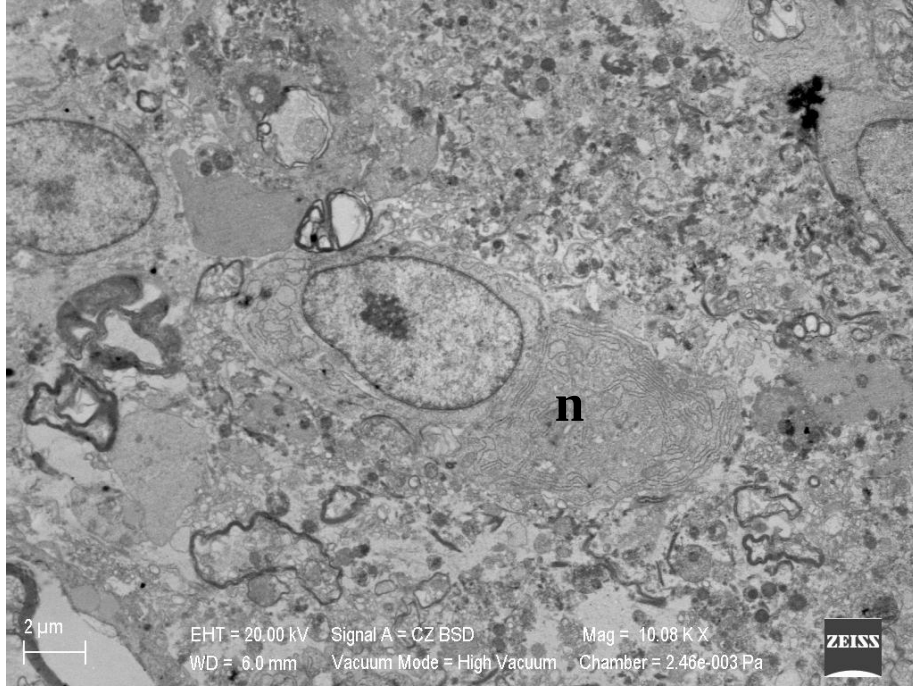
Şekil 35. Rapamisin grubunda parçalanmış miyelin lamellerin akson içine uzandığı (▲) ve granüler madde birikimleri görülmekte.



Şekil 36. Agmatin grubunda akson ve myelin yapılarının daha düzenli olduğu görülmekte.



Şekil 37. Prednizolon grubunda farklı çaplarda miyelinli aksonlarda ayrılımlar daha hafif şiddette izlenmekte. Kapiller ve komşu astrosit (a) normal yapıda görülmekte.



Şekil 38: Rapamisin grubunda GER yapısı belirgin nöron (n)

10. TARTIŞMA

Spinal kordda meydana gelen travma sonrasında sekonder mekanizmalar doku hasarını büyötmektedir. Bu hasarlar, doku nekrozu ve fonksiyonel zararlar sonuçlanan biyokimyasal, patolojik olaylara yol açar. Hücre membranı parçalanması, spinal kan akımı ve metabolizmada değişikliğin yol açtığı sekonder hasar, mekanik travmanın etkilerini şiddetlendirir, lezyon genişlemesi ile sonuçlanır. Nörolojik işlev bozuklukları, primer nöronal hasardan daha çok sekonder değişikliklerden kaynaklanır. Spinal kord hasarında gelişen sekonder hasar mekanizmalarının tam olarak anlaşılmaması tedaviyi güçleştirmektedir. Spinal kordda travmatik olaylar, mekanik hasarla birlikte doku dejenerasyonu oluşturur, sonrasında iskemi, hemoraji ve ödeme sebep olurlar. Direkt lokal doku haraplanmasına ek olarak, beyin ve spinal kord hasarları; enerji tüketilmesi, Ca düzenlenmesinin bozulması, asidoz, nörotransmitter salınımının artması, aşırı serbest radikal birikimi ve artmış lipid peroksidasyonu gibi çok sayıda reaksiyona yol açarlar (121). Sekonder hasarın azaltılması veya engellenmesi için hasar alanındaki metabolik inhibisyonun oluşturulması nöroprotektif cevabı belirlemektedir. Serbest oksijen radikallerini azaltan antioksidanlar bu inhibisyonu gerçekleştirmektedir (122). Hall ve arkadaşları da nöroprotektif etkide temel mekanizmanın lipid peroksidasyonun inhibisyonu olduğunu bildirmişlerdir (123). Oksidatif hasar nörolojik hastalıklarda yaygın patolojik mekanizmadır. Serbest radikaller sadece nöral membranların lipid peroksidasyonuna değil, protein, RNA ve DNA yapısında da peroksidasyona yol açar (124). Membranı oluşturan fosfolipitler, glikolipitler, gliseridler gibi doymamış yağ asitleri ve membran proteinleri serbest radikaller için oldukça çekici makromoleküllerdir. Biyomoleküllerin tümü serbest radikallerin etki alanında olsalar da lipitler bu riske en duyarlı yapılardır. Serbest radikaller başlıca moleküler oksijenin normal metabolizma basamaklarında indirgenmesi ile açığa çıkmaktadır . Reaktif oksijen türleri insan vücudunda sürekli oluşur. Bunların çoğu yararlı fizyolojik görevleri yerine getirir. Fakat aşırı miktarlarda veya uygunsuz koşullarda oluşumu ile toksik olabilirler. Metilprednizolon, National Acute Spinal Cord Injury Studies (NASCIS) alışmaları sonucunda akut spinal kord hasarı sonrası standart tedavi olmuştur (125). Metilprednizolonun nöroprotektif etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Themid 1960 yılında glukokortikoid steroidleri

posttravmatik spinal kord ödeminde ampirik olarak kullanmıştır. Günümüzde kabul edilen mekanizmalar, lipid peroksidasyon ve inflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu, kalsiyum dengesinin korunması, spinal kord kan akışının korunması, ve inflamatuvar-immun hücrelerin düzenlenmesidir (126). Kurt ve arkadaşları yaptıkları çalışmada spinal kord hasarı yapılan ratlarda, bir TNF- α blokeri olan infliximab tedavisinin etkinliğini steroid ile tedavi edilen gruplarla karşılaştırmışlar, infliximabın steroidle birlikteki etkisinin artıp artmadığına bakmışlar. MDA'nın hasar grubunda çok artmış olduğunu, infliximab ve steroid aynı düzeyde MDA değerlerinde azalmaya neden olduğunu, ancak bu iki ilaç birlikte verildiğinde MDA düzeylerinde düşüşün çok daha anlamlı olduğunu bulmuşlardır (33). Christie ve arkadaşları, MDA seviyeleriyle ölçülen oksidatif stresin, akut spinal kord hasarı sonrasını takiben 5. güne kadar devam edebildiğini göstermişlerdir. Metilprednizolon, MDA değerini ilk 12 saatte azaltmaktadır. Metilprednizolon 1-7 gün uygulandığında ise 24 saat- 5 gün arasında, MDA seviyesine etkisinin olmadığı görülmüştür (127). Kayalı ve arkadaşları ise hasar sonrası 6.günde MDA ve SOD düzeyinde anlamlı bir fark gözlemezken glutatyon peroksidaz seviyesinin artmış olduğunu tespit etmişlerdir (128). Bizim çalışmamız sonucunda spinal hasar oluşumunun 7.gününde hasar grubunda dokuda MDA ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin arttığı, serumda SOD ve katalazın düzeylerinin anlamlı bir değişiklik göstermediği tespit edildi. Hasar grubu ile karşılaştırıldığında, metilprednizolonun doku MDA seviyesini anlamlı olarak azalttığı, sham kontrol grubu değerine yaklaştığı tespit edilmiştir. SOD ve katalaz düzeylerinde hasar grubuna benzer olarak farklılık görülmemiş, glutatyon peroksidaz seviyesini azalttığı ancak bu azalışının anlamlı olmadığı saptandı. Bu sonuçlar tedavide kullanılan metilprednizolonun spinal kord hasarındaki kabul gören etkilerinden biri olan lipid peroksidasyonu engellediğini desteklemektedir

Yapılan kaynak taramalarında, rapamisinin merkezi veya periferik sinir sistemi yaralanmalarında kullanıldığına dair çalışmalar çok az sayıda olup, biyokimyasal çalışmalara rastlanılmamıştır. Rapamisin, sitozolik proteine bağlanarak mTOR'u inhibe etmektedir. mTOR lizozomal yolla hücre içi bileşenlerinin yıkılmasını tanımlayan otofajiyi negatif etkiler, rapamisin ise mTOR'u inhibe ederek otofajiyi indükler (129). Spinal hasar oluşturulup 7. gün rapamisin ile tedavi edilen deneklerimizin biyokimyasal sonuçları değerlendirildiğinde MDA düzeyinin yüksek olduğu, hasar grubuna yakın olduğu görüldü. Glutatyon peroksidazın, hasar grubu ile

karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı, katalaz ve SOD seviyelerindeki değişiklikler ise anlamlı değişiklik göstermediği tespit edildi. Rapamisinin membran hasarına karşı önleyici etkisinin olmadığı görüldü.

Agmatin, N-metil-D-aspartat reseptörlerini (NMDAR) antagonize eder ve tüm nitrik oksit sentaz (NOS) izoformlarını inhibe eder (130,131,132). NMDAR antagonistleri ve NOS inhibitörleri spinal kord hasarındaki nöronal fonksiyonların adaptasyon değişikliklerini önler. Agmatin, glutamatın NMDA reseptör blokörü olarak etki etmektedir (101). Glutamat nöronal hasarı farklı süreçlerle şiddetlendirir. İlk olarak, intrasellüler Ca^{++} artışı yapar, proteoliz ve lipid peroksidasyonunu aktive ederek hücre membranını haraplar ve nöronal ölüme sebep olur. İkinci olarak glutamat; hücrel ödeme yapan önemli iyon değişikliklerine aracılık eder (133). Bu yüzden çok sayıda glutamat reseptör antagonistleri deneysel spinal kord hasarında kullanılmıştır (134,135). Ekzojen agmatinle tedavi non-toksiktir ve nörotoksik ve iskemik beyin hasarlarında belirgin nöroprotektif etki göstermektedir (136). Brewer ve arkadaşları, agmatinin intraspinal uygulanmasının eksitotoksik spinal kord hasarı sonrası nöroprotektif olduğunu bulmuşlardır (137). Fairbanks ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, agmatinin spinal sinir hasarı, periferik inflamasyon, eksitotoksik spinal kord hasarında ekzojen olarak uygulandığında allodini ve hiperaljeziyi hafiflettiğini göstermişlerdir (138). Agmatinin kültür nöronlarda NMDA reseptör blokajı ile glutamat bağımlı nörotoksiteye karşı koruduğuna dair kanıtlar bulunmaktadır (101). Tufan ve arkadaşları 66 dişi Wistar rat ile yaptıkları çalışmada, deneysel spinal kord hasarı modelinin 30 dakika öncesi, sonrası ve klip kompresyon uygulandığı sırada glutamatın presinaptik salınımını engelleyen antiepileptik ilaç lamotrijin vererek etkinliğini araştırmışlar. Biyokimyasal olarak hasarda artmış olan doku MDA seviyelerini azalttığı bildirmişlerdir. Plazmadaki SOD değerinin hasarda düştüğünü, glutatyon düzeylerinin ise hasarda azaldığını, tedavide armış olduğunu tespit etmişlerdir (139). Kuşcuoğlu ve arkadaşları spinal kord hasarında agmatinin MDA düzeyini anlamlı olarak azalttığını ancak kontrol düzeyine indirmediklerini bildirmişlerdir (14). Hasar oluşturulup agmatin ile tedavi ettiğimiz grupta, MDA ve glutatyon peroksidaz düzeylerinin, hasar grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ancak sham kontrol grubuna göre yüksek olduğu gözlemlendi. Bu sonuç Kuşcuoğlu ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu idi. Agmatinin lipid peroksidasyonu metilprednizolon gibi azalttığı görülmüştür. Katalaz ve SOD

değerlerinde anlamlı değişiklikler görülmedi. Glutasyon peroksidaz düzeyini rapamisininden sonra en fazla düşüren agmatin olarak tespit edildi.

Spinal kord hasarlarında travmayı takiben ilk ortaya çıkan değişiklik beyaz maddede ödem oluşmasıdır. Ödem damarların çevresinde, astrositlerde, nöronların çevresinde görülür. Kanama alanları sıklıkla görülür, hasar alanında başlangıçta nötrofiller daha sonra lenfositler ve makrofajlar çok sayıda yer alır. Nöronlarda akson, miyelinlerde bozulma, miyelin kılıfta şişme ve vakuolizasyon bulunur. İyileşme sürecinde lipid ve hemosiderin içeren çok sayıda makrofaj hasar alanında gözlenir (140,141). Hasar alanında aktive B hücreleri ve plazma hücrelerinin artışı tanımlanmıştır (142). Çalışmamızda hasar grubunda geniş bir lezyon alanının olduğu, gri ve beyaz madde yapılarının bozulduğu, artmış ödem ve başta makrofaj olmak üzere artmış inflamatuvar hücreler görüldü. Kanama alanları bulunmaktaydı. Tedavi gruplarında hasarın devam ettiği ancak hasar alanlarının daha küçük olduğu gözlemlendi. Makrofajlar rapamisin verilen grupta hasar grubuna göre çok iriydi. Agmatin ve prednizolon verilen gruplarda irileşmiş makrofajlar daha az sayıda tespit edildi. Agmatin grubunda nöronların iyi korundu, Nissl cisimciklerinin bozulmadığı tespit edildi. Gruplarda astrosit artışı, glial skar dokusu gözlenmedi. Kanama alanları özellikle metilprednizolon verilen deneklerin birinde çok sayıda izlendi. Işık mikroskopta gözlenen değişiklikler Elektron mikroskobunda ince yapı düzeyinde de tanımlandı. Hasar ve tedavi gruplarında ödem, miyelin dejenerasyonu, akson bozulmaları tespit edildi. Ancak tedavi gruplarında dejenerasyonun ve ödemin daha hafif olduğu görüldü. Yu ve Arkadaşları spinal kord hasarında kullandıkları agmatinin doku hasarını azalttığını bildirmişlerdir (143). Popovich ve arkadaşları, perifer makrofajları baskılanması sonucunda lezyon alanındaki makrofajların azaldığını bildirilmiştir. Hematojen makrofajların baskılandığı grupta intraspinal makrofaj aktivasyonunun baskılanmasıyla myelinli aksonların artmış korunumu ve nekrotik kavitenin azalması görülmüştür. Ayrıca, makrofaj baskılanmış hayvanlarda lezyon alanında hasardan 1-2 gün sonra artmış aksonal immunreaktivite görülmüştür. Bu bilgilerin ışığında, sekonder hasarla endojen tamir mekanizmaları, makrofajlarla sinir sistemi hücreleri arasındaki kompleks etkileşimlerle düzenlendiği iddia ediliyor (144). Bu çalışmada perifer makrofajların baskılanmasıyla aksonal tamirin daha iyi olduğu gösterilse de başka bir çalışmada, tam tersine hasar alanının mikrogliya ve makrofajlarca desteklenmesinin nöroanatomik onarım ve fonksiyonel iyileşmeyi

sağladığını göstermişler (145). Previtt ve arkadaşları, makrofajların hasar bölgesine gelerek, sitokin salınımı ve ortamdaki diğer nonnöronal hücrelerle etkileşimle akson rejenerasyonuna katkıda bulunduğunu bildirmişlerdir (146). Bizim çalışmamızda rapamisin grubunda hasar bölgesinde çok sayıda, büyük, sitoplazmasında fagositik materyal içeren makrofajların olduğu tanımlanmıştır. Çok sayıdaki makrofaj varlığı rapamisinin mTOR'u inhibe ederek otofajiyi indüklediğinin (129) göstergesidir. Bu yolla hasara karşı mücadelenin olması, sekonder lezyon alanının genişlemesinin engellemesi şeklinde yorumlanmıştır.

Spinal kord hasarı sonrası apoptozis gözlenmektedir. Santral sinir sistemi hasarıyla ilgili apoptozis, hasar sonrası upregüle olan birçok anahtar molekülün oluşturduğu bir komplekstir (87). Emery ve arkadaşları travmatik kord hasarı sonrası ölen 15 hastanın spinal kordlarını incelemişler ve lezyon merkezinde ve komşu beyaz madde sınırlarında apoptotik hücelere rastlamışlar (147). Lee ve arkadaşları, metilprednizolonun selektif olarak hasar sonrasında oligodendrosit apoptozisine yol açtığını bildirmişlerdir (148). Spinal kord zedelenmesinde apoptozis ile ilişkili olan Bax artışı, buna karşın Bcl-2 azalışı tanımlanmıştır (149).

Apoptozisi tanımlamak için TUNEL boyaması yapılan bu çalışmada, sham kontrol, hasar, metilprednizolon ve agmatin verilen gruplarda apoptotik hücre tanımlanmamıştır. Rapamisin verilen grupta ise beyaz maddede apoptotik hücreleri belirgin olarak ayırt edilmiştir. Rapamisinin, hücre siklusunu G1 fazında duraklattığı ve apoptozise neden olduğunu bildirmişlerdir (150).

11. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Spinal hasar oluşturulup, 7 gün metilprednizolon, rapamisin ve agmatin uygulanan bu çalışma sonucunda hasar grubuna göre tedavi gruplarında daha küçük lezyon alanlarının olması bu ilaçların sekonder zedelenmeyi belli ölçülerde engellediğini göstermiştir.
2. Biyokimyasal olarak hasarda anlamlı olarak artan MDA ile tanımlanan lipid peroksidasyonun metilprednizolon ve agmatin ile önlenmiştir. Metilprednizolonun etkisi agmatine göre daha fazla bulunmuştur. Rapamisinin etkisi ters yönde olmuştur. Hasar grubunda çok artmış olan antioksidan glutatyon peroksidazın azaltılmasında en etkili ilaç rapamisin olarak tespit edilmiştir. Katalaz ve SOD değerlerinde anlamlı fark bulunmamıştır. Hasar grubunda katalaz ve SOD değerlerinde kontrole göre anlamlı değişiklik olmadığından tedavi gruplarında da uygulanan bu doz ve sürede bir değişiklik saptanmamıştır.
3. Tedavi grupları içinde rapamisin makrofaj artışını uyarmıştır. Spinal hasar iyileşme sürecinde önemli rolü olan makrofajların artmış olması rapamisinin sekonder lezyon gelişiminin engellenmesinde daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Uygulanan dozdan farklı dozlarda ve sürelerde bu etkinin incelenmesi daha fazla bilgi edinilmesini sağlayacaktır.
4. Rapamisin verilen grupta apoptozisin belirgin olarak görülmesi, sekonder lezyonun genişlemesinin engellenmesinde, bu yolun olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

12. KAYNAKLAR

1. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 341-58.
2. Karamehmetoğlu Ş. Spinal Cord Injury and Stem Cell Therapy. *Turk J Phys Med Rehab* 2006; 52(Suppl B): B10-B11.
3. Anderson D, Prockop L, Means E, Hartley L. Cerebrospinal fluid lactate and electrolyte levels following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1976; 44: 715-22.
4. Bregman BS, Kunkel-Bagden E, Schnell L ve Ark. Recovery from spinal cord injury mediated by antibodies to neurite growth inhibitors. *Nature* 1995; 378: 498-501.
5. Bresnahan J, Beattie M, Todd F, Noyes D. A behavioral and anatomical analysis of spinal cord injury produced by a feedback-controlled impact device. *Exper Neurol* 1987; 95: 548-70.
6. Carlson G, Gorden C, Nakazawa S, Wada E, LaManna J. Perfusion limited recovery after spinal cord injury. *Spine* 2000; 25:1218-26.
7. National Spinal Cord Injury Statistical Center. Spinal Cord Injury: Facts and Figures at a Glance. Available at: www.spinalcord.uab.edu. Accessed June 2, 2005.
8. Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Rev Neuroscience* 2001; 2: 263-273.
9. Collins WF. A review and update of experimental and clinical studies of spinal cord injury. *Paraplegia* 1983; 21: 204-219.
10. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, ve Ark. Acute spinal cord injury. Part II: contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24: 265-279.
11. Faden AI, Chan PH, Longar S. Alterations in lipid metabolism, Na⁺, K⁺-ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury. *J Neurochem* 1987; 48:1809-1816.
12. Fehlings MG. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26: 52-55.
13. Veeravalli KK. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease* 2009;13: 200-12

14. Kotil K, Kuscuoglu U, Kırılı M ve Ark. Investigation of the dose-dependent neuroprotective effects of agmatine in experimental spinal cord injury: a prospective randomized and placebo–control trial. *J Neurosurg Spine* 2006; 4: 392–399.
15. Serarslan Y, Yönden Z, Özgiray E ve ark. Protective effects of tadalafil on experimental spinal cord injury in rats. *Journal of Clinical Neuroscience* 2009;17:349-352
16. Anderson DK. Chemical and cellular mediators in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9: 143–145.
17. Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 987–992.
18. Fehlings MG. Role of sodium in the pathophysiology of secondary spinal cord injury. *Spine* 1995; 20: 2187–2191.
19. Janssen L, Hansebout RR. Pathogenesis of spinal cord injury and newer treatments. A review. *Spine* 1989; 4: 23–32.
20. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 1995; 5: 407–413.
21. Ankeny DP, Popovich G. Mechanisms and implications of adaptive immune responses after traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 2009;158:1112–1121.
22. Bilgen M, Doğan B, Narayana PA. In vivo assessment of bloodspinal cord barrier permeability: serial dynamic contrast enhanced MRI of spinal cord injury. *Magn Reson Imaging* 2002; 20: 337–341.
23. Popovich PG, Stokes BT, Whitacre CC. Concept of autoimmunity following spinal cord injury: Possible roles for T lymphocytes in the traumatized central nervous system. *J Neurosci Res* 1996b; 45:349–363.
24. Whetstone WD, Hsu JY, Eisenberg M, Werb Z, Noble-Haeusslein LJ. Blood-spinal cord barrier after spinal cord injury: relation to revascularization and wound healing. *J Neurosci Res* 2003; 74: 227–239.
25. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S, Owens T. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J Neurosci* **YIL** ;23: 7922–7930.
26. Bartholdi D, Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* 1997; 9:1422–1438.

27. Lee YL, Shih K, Bao P, Ghirnikar RS, Eng LF. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem Int* 2000 ; 36: 417–425.
28. McTigue DM, Tani M, Krivacic K ve ark. Selective chemokine mRNA accumulation in the rat spinal cord after contusion injury. *J Neurosci Res* 1998; 53: 368–376.
29. Choi D, Rothman S. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death. *Ann Rev Neurosci* 1990; 13: 171–82.
30. Liu D, Xu GY, Pan E, McAdoo DJ. Neurotoxicity of glutamate at the concentration released upon spinal cord injury. *Neuroscience* 1999; 93:1383–9.
31. McDonald JW, Bhattacharyya T, Sensi SL, ve Ark. Extracellular acidity potentiates AMPA receptor-mediated cortical neuronal death. *JbNeurosci* 1998;18: 6290–9.
32. Wada S, Yone K, Ishidou Y ve Ark. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg* 1999; 91(1 Suppl): 98–104.
33. Kurt G, Ergün E, Cemil B ve ark. Neuroprotective effects of infliximab in experimental spinal cord injury. *Surg Neurol* 2009; 71: 332-336.
34. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, ve Ark. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 1984; 25: 45-52.
35. Gül Ş, Çelik SE, Kalaycı M ve ark. Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimental spinal cord injury in rats. *Surgical Neurology* 2005; 64: 355– 361.
36. Kaptanoğlu E, Solaroğlu I, Okutan O ve ark. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev* 2004; 27: 113–120.
37. Süzer T, Coşkun E, İşlekel H ve ark. : Neuroprotective effects of magnesium on lipid peroxidation and axonal function after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1999; 37: 480-484.
38. Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi, Çeviri Editörleri: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, 6.baskı, Nobel Tıp Kitabevleri. 2002: 453.
39. Sadler TW. Medikal Embriyoloji , Çeviri Editörü: Başaklar C, 7. baskı, Palme Yayıncılık,1996: 65-72.

40. Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Editör: Demir R, 1. Baskı, Palme Yayıncılık, 2006:199.
41. Standring S. Gray's Anatomy-The Anatomical Basis of Clinical Practice, 40. edition, Elsevier, 2008: 225
42. Schwartz ED, Flanders AE. Spinal Trauma: Imaging, Diagnosis, and Management. Birinci Baskı, Lippincott: Williams&Wilkins, 2007: 6-9
43. Snell RS. Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Nöroanatomî. Yıldırım M (çeviren). Birinci baskı, İstanbul: NOBEL, 2000: 166-167
44. Netter FH, Hansen JT. İnsan Anatomi Atlası. Cumhur M (çeviren). Üçüncü Baskı, İstanbul: NOBEL, 2005: 165
45. Ozan H. Ozan anatomi. Ankara: Nobel, 2004:339
46. Ross MH. Histology A Text and Atlas. 5. baskı. Lippincott: Williams & Wilkins, 2006: 342-344.
47. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 3. Baskı. Philadelphia: Saunders, 2006: 214
48. Marketos SG, Skiadas P, Panagiotis MD. Hippocrates: The father of spine surgery. Spine 1999; 24: 1381-7.
49. Carlson GD, Gorden MA. Current developments in spinal cord injury research. The Spine Journal 2002; 2: 116–128.
50. Naderi S, Zileli M, Özer AF. Omurga cerrahisinin tarihçesi, omurga ve spinal kord cerrahisi. Editörler: M. Zileli, AF. Özer, Bölüm:1, Meta, İzmir, 2002: 1-13.
51. Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma. Arc Neurol. 1972; 27: 468- 473.
52. Tator CH, Fehlings MG. Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg 1991; 75:15-26.
53. Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. Spine 2002; 27:1504-1510.
54. Xarchas K, Bourandas J. Injuries and disease of the Spine in ancient times. Spine 2003; 28:1481-1484.
55. Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. Neurochirurgie 1991; 37: 291-302.
56. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurg 1999; 44: 1027-1040.

57. Iwasita Y, Kawaguchi S, Murata M. Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* 1994; 367: 167-173.
58. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J. Acute spinal cord injury, Bölüm I: Pathophysiologic Mechanisms. *Clin Neuropharmacology* 2001; 24: 254-264.
59. Black P, Markowitz RS, Finkelstein SD, ve ark. Experimental spinal cord injury; effect of a calcium channel antagonist (nicardipine). *Neurosurg* 1988; 22:61-66.
60. Cheung JY, Boventre JV, Malis CD ve ark. Calcium and ischemic injury. *The New Engl J Med* 1986; 314:1670-1676.
61. Fehling MG, Tator CH, Linden RD. The effect of nimodipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1989; 71: 403-416.
62. Anderson DK, Poul D, Roul DS. Spinal cord injury and protection. *Annals of Emergency Med* 1985;14:147-152.
63. Janssen L, Hansebaut RR. Pathogenesis of spinal cord injury and never treatments. *Spine* 1989; 14: 23-32.
64. Schonna FAX, Kore AB, Young EE. Calcium dependence of toxic cell death. *Science* 1979; 206: 700-702.
65. Faden A, Lemke M, Simon RP, Noble LJ. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: Behavioral, anatomic and neurochemical studies. *J Neurotrauma* 1988; 5: 33-45.
66. Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci* 1997; 17: 1055-1063.
67. Young W. Koreh I. Potassium and calcium changes in injured spinal cords. *Brain Res* 1986; 365: 42-53.
68. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and Acute Spinal Cord Injury: A Reappraisal, The American Society for Experimental NeuroTherapeutics Inc. 2004; 1: 80–100.
69. Öz B. Medulla Spinalis Yaralanmalarında Patoloji, Medulla Spinalis Yaralanmaları, Logos, 2000;137-142.
70. David S, Lacroix S. Molecular approaches to spinal cord repair. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26: 411– 440.

71. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 146 –156.
72. Yiu G, He Z. Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7: 617– 627.
73. Busch SA, Silver J. The role of extracellular matrix in CNS regeneration. *Curr Opin Neurobiol* 2007; 17: 120 –127.
74. Codeluppi S, Svensson CI, Hefferan MP ve ark. The Rheb–mTOR Pathway Is Upregulated in Reactive Astrocytes of the Injured Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29: 1093–1104.
75. Lim PA, Tow AM. Recovery and regeneration after spinal cord injury: a review and summary of recent literature. *Ann Acad Med Singapore* 2007; 36: 49-57.
76. Troystman RJ. Oxygen radical mechanism of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71: 1185-1195.
77. Liao LM, Bergsneider M, Becker DP, Youmans JR. *Neurological Surgery*, 4. baskı, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997: 1549–1594
78. Barut Ş Canbolat A, Bilge T ve ark. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurgery Rev* 1993; 16: 53-59.
79. Braughler MJ. Lipid Peroxidation-Induced Inhibition of γ -Aminobutyric Acid Uptake in Rat Brain Synaptosomes: Protection by Glucocorticoids. *Journal of Neurochemistry* 2006; 44: 1282 – 1288.
80. Evereklioglu C, Er H, Doğanay S ve ark. Nitric oxide and lipid peroxidation are increased and associated with decreased antioxidant enzyme activities in patients with age-related macular degeneration. *Doc Ophthalmol* 2003 ;106:129-36.
81. Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-11.
82. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW ve ark. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1993; 268: 478-88
83. Chartrain NA, Geller DA, Koty PP ve ark. Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J Biol Chem* 1994; 269: 6765-72.

84. Kerimoğlu A, Paşaoğlu Ö, Kanbak G ve ark. Deneysel spinal kord yaralanmasında koenzim Q10'un etkinliği. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 2007; 13: 85-93.
85. Baffour R, Achanta K, Kaufman J ve ark. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and methylprednisolone on neurological function after experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1995; 83: 105–110.
86. Constantini S, Young W. The effects of methylprednisolone and the ganglioside GM1 on acute spinal cord injury in rats. *J Neuro-Surg* 1994; 80 : 97–111.
87. Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, Blades AD, Scheff1 SW. Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *Journal of Neuroscience Research* 2002; 68: 7–18.
88. Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma. *J Neurotrauma* 1991;8(Suppl 1):S31-40 discussion S1.[15]
89. Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury. *Ann Emerg Med* 1993; 22: 1022-7.
90. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg* 1992; 76: 13-22.
91. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, ve ark. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 1984; 251: 45-52.
92. Bracken MB, Shepard MJ, Hellenbrand KG, ve ark. Methylprednisolone and neurological function 1 year after spinal cord injury. Results of the National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg* 1985; 63: 704-13.
93. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, ve ark. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1405-11.
94. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF Jr, ve ark. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1-year follow-up data. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurosurg* 1992; 76: 23-31.
95. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ. Acute spinal cord injury, Bölüm II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacology* 2001; 24: 265-279.

96. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, ve ark. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA 1997; 277: 1597-604.
97. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, ve ark. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow up. Results of the third National Acute Spinal Cord Injury randomized controlled trial. J Neurosurg 1998; 89: 699-706.
98. Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C. Biological effects of arginine metabolites. Acta Physiol Scand 2000; 168: 21–25.
99. Bradley KJ, Headley PM. Effect of agmatine on spinal nociceptive reflexes: lack of interaction with α_2 -adrenoreceptor or m-opioid receptor mechanisms. Eur J Pharmacol 1997; 331: 133–138.
100. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein L, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. Biochem J 1996; 316: 247–249.
101. Olmos G, DeGregorio Rocasolano N, Paz Regalado M ve ark. Protection by imidazole drugs and agmatine of glutamate-induced neurotoxicity in cultured cerebellar granule cells through blockade of NMDA receptor. Br J Pharmacol 1999; 127: 1317–1326.
102. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. Biochem J 1996; 316: 247-249.
103. Lee TW. Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B. Brain Research 2009; 1281: 64-70.
104. Tabor CW, Tabor H. Polyamines. Annu Rev Biochem 1984; 53: 749-90.
105. Li G. Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. Science 1994; 263: 966-969.
106. Yang XC, Reis DJ. Agmatine selectively blocks the N-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther 1999; 288: 544-549.

107. Reis DJ , Regunathan S. Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors may be a novel neurotransmitter in brain. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1998; 72 : 80–85.
108. Sun MK, Regunathan S. Cardiovascular responses to agmatine, a clonidine-displacing substance, in anesthetized rat. *Clin Exp Hypertens* 1995; 17: 115-28.
109. Sener A, Lebrun P, Blachier F, Malaisse WJ. "Stimulus-secretion coupling of arginine-induced insulin release. Insulinotropic action of agmatine. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 327-30.
110. Kalra SP, Pearson E, Sahu A, Kalra PS. Agmatine, a novel hypothalamic amine, stimulates pituitary luteinizing hormone release in vivo and hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release in vitro. *Neurosci Lett* 1994; 194: 165-8.
111. Yeşilyurt Ö, Uzbay İT. Agmatine potentiates the analgesic effect of morphine by an alpha-2-adrenoceptor-mediated mechanism in mice. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 98-103.
112. Gilad GM, Gilad VH. Accelerated functional recovery and neuroprotection by agmatine after spinal cord ischemia in rats. *Neurosci Lett* 2000; 296: 97-100.
113. Arıcıoğlu F. Sinir Sisteminin Fonksiyonlarını Modüle Edebilen Yeni Bir Madde: Agmatin. *RHCP*. 2008; 5: 27-37.
114. Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M ve ark. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Natural Medicine* 2002; 8: 128-135.
115. Harrison DE. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 2009; 460: 392-395.
116. Ruan B, Pong K, Jow F ve ark. Binding of rapamycin analogs to calcium channels and FKBP52 contributes to their neuroprotective activities. *PNAS* 2008; 105 :33–38.
117. Lyons WE, George EB, Dawson TM, Steiner JP, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 promotes neurite outgrowth in cultures of PC12 cells and sensory gangli. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 91: 3191–3195.
118. Summers MY, Leighton M, Liu D, Pong K, Graziani EI. 3-Normeridamycin: A potent non-immunosuppressive immunophilin ligand is neuroprotective in dopaminergic neurons. *J Antibiot* 2006; 59: 184–189.

119. Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL ve ark. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin, and cyclosporin A. *Nat Med* 1997; 3: 421–428.
120. Kluver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the central nervous system. *J Neuropath Exp Neurol* 1953; 12: 400-403.
121. Hara H, Sukamoto T, Kogure K. Mechanism of pathogenesis of ischemia-induced neuronal damage. *Prog Neurobiol* 1993; 40: 645-670.
122. Torres S, Salgado-Ceballos H, Torres JL ve ark. Early metabolic reactivation versus antioxidant therapy after a traumatic spinal cord injury in adult rats. *Neuropathology* 2010; 30, 36–43.
123. Hall ED. Drug development in spinal cord injury: what is the FDA looking for? *J Rehabil Res Dev* 2003; 40: 81–91.
124. Titsworth WL, Liu NK, Xu XM. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 2008; 7: 254-269.
125. Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM ve ark. Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome following spinal cord injury in rats, experimental neurology. *Experimental Neurology* 2009; 220; 71-81.
126. Young W. Molecular and cellular mechanisms of spinal cord injury therapies. *Neurobiology of Spinal Cord Injury* 2000; 21:741-742
127. Christie SD, Comeau B, Myers T, ve ark. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. *Neurosurg Focus* 2008; 25: E5.
128. Kayalı, Özdağ MF, Kahraman S ve ark. The antioxidant effect of β -Glucan on oxidative stress status in experimental spinal cord injury in rats. *Neurosurg Rev* 2005; 28: 298–302.
129. Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease* 2007; 26: 86–93
130. Yang XC, Reis DL. Agmatine selectively blocks the *N*-methyl-D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 544–549.

131. Auguet M, Viossat I, Marin JG, Chabrier PE. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. *Jpn J Pharmacol* 1995; 69: 28.
132. Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, Feinstein DL, Reis DJ. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine. *Biochem J* 1996; 316: 247–249.
133. Wrathall JR, Choiniere D, Teng YD. Dose-dependent reduction of tissue loss and functional impairment after spinal cord trauma with the AMPA/kainate antagonist NBQX. *J Neurosci* 1994; 14: 6598–6607.
134. Li S, Tator CH. Effects of MK801 on evoked potentials, spinal cord blood flow and cord edema in acute spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 1999; 37: 820–832.
135. Low SJ, Roland CL. Review of NMDA antagonist-induced neurotoxicity and implications for clinical development. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2004; 42:1–14.
136. Gilad GM, Salame K, Rabey JM, Gilad VH. Agmatine treatment is neuroprotective in rodent brain injury models *Life Sci* 1995; 58: 41- 46.
137. Brewer KL, Fairbanks CA, Wilcox GL. Neuroprotective effects of intraspinal agmatine following excitotoxic spinal cord injury in rodents. *Soc Neurosci Abstr* 1998; 24 ; 577.
138. Fairbanks CA, Schreiber KL, Brever KL ve ark. Agmatine reverses pain induced by inflammation, neuropathy, and spinal cord injury. *PNAS* 2000; 79: 10584–10589.
139. Tufan K, Öztenir N, Ofluoğlu E ve ark. Ultrastructure protection and attenuation of lipid peroxidation after blockade of presynaptic release of glutamate by lamotrigine in experimental spinal cord injury. *Neurosurg Focus* 2008; 25: E6.
140. Festoff BW, Ameenuddin S, Santacruz K ve ark. Neuroprotective effects of recombinant thrombomodulin in controlled contusions cord injury implicates thrombin signaling. *Journal of Neurotrauma* 2004 ; 21; 907-92.
141. Delamarter RB, Sherman J, Carr JB. Pathophysiology of spinal cord injury. Recovery after immediate and delayed decompression. *J Bone Joint Surg Am* 1995; 77: 1042-1049.
142. Ankeny DP, Guan Z, Popovich PG. B cell produce pathogenic antibodies and impair recovery after spinal cord injury in mice. *J Clin Invest* 2009; 119: 2990-9.

143. Yu CG, Marcillo AE, Fairbanks CA, Wilcox GL, Yeziarski RP. Agmatine improves locomotor function and reduces tissue damage following spinal cord injury. *Neuroreport* 2000; 11: 3203-3207.
144. Popovich PG, Guan Z, Wei P ve ark. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 1999;158: 351–365.
145. Franzen RJ, Schoenen P, Leprince E ve ark. Effects of macrophage transplantation in the injured adult rat spinal cord: A combined immunocytochemical and biochemical study. *J Neurosci Res* 1998; 51: 316–327.
146. Prewitt CM, Niesman IR, Kane CJ, Houlae JD. Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exper Neurol* 1997; 148: 433–43.
147. Emery E, Aldana P, Bunge MB ve ark. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg.* 1998; 89: 911-20.
148. Lee HJ, Trottier R. Antiinflammatory activity of two novel derivatives of prednisolone. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1980; 27: 611-4.
149. Paterniti I, Genovese T, Crisafulli C ve ark. Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2009; 380: 179–192.
150. Kasukabe T, Okbe-Kado J, Kato N, Sassa T, Honma Y. Effects of combined treatment with rapamycin and cotylenin A, a novel differentiation-inducing agent, on human breast carcinoma MCF-7 cells and xenografts. *Breast Cancer Res* 2005; 7: 1097-1110.