

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE
METHOTREXAT-ETANERCEPT KOMBİNASYONUNUN
TEDAVİ EDİCİ VE KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Semih AKAR

BOLU
2014

T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
İZZET BAYSAL TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE
METHOTREXAT-ETANERCEPT KOMBİNASYONUNUN
TEDAVİ EDİCİ VE KORUYUCU ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. Semih AKAR

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ

BOLU
2014

ÖZET

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE METHOTREXAT-ETANERCEPT KOMBİNASYONUNUN TEDAVİ EDİCİ VE KORUYUCU ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Giriş: Travmatik omurilik yaralanması (TOY) ani ve beklenmedik şekilde oluşan; son derece yıkıcı, sakatlayıcı; kişisel ve toplumsal açıdan yüksek maliyetlere; psikolojik ve sosyolojik sorunlara neden olan bir olay olarak tanımlanabilir.

Gelişen tıbbi bakım, morbidite ve mortaliteyi iyileştirmiş olmasına rağmen, nöronal hasarın sınırlanması ve rejenerasyonun uyarılması amacıyla yapılan farmakoterapideki gelişmeler ise hala sınırlıdır.

Preklinik çalışmalarda başarılı tedavi modalitelerinin çoğunun, klinik çalışmalarda sınırlı başarı elde etme nedenlerinden birisi, primer mekanik yaralanmanın tetiklediği sekonder dejeneratif yanıtın karmaşıklığıdır. Çünkü birçok monoterapi sekonder yaralanma mekanizmasının yalnızca bir aşamasını etkilemektedir. Oysa başarılı tedavi bu mekanizmanın birçok aşamasında etkili olmalıdır. Bu nedenle kombine tedavi uygulamaları klinik ve deneysel bazda daha öncelikli düşünölmeye başlanmıştır. Bu çalışma SKY'ında Etanercept+Methotrexat(MTX) kombinasyonunun eş zamanlı kullanımının sinerjik bir etki yaratıp yaratmadığını anlamak için gerçekleştirilmiştir.

Methot: Bu çalışmada klip kompresyon yöntemi kullanılarak oluşturulan omurilik yaralanmaları histolojik(Luxol fast hematoxilen-eozin ve TUNEL boyama yöntemleri) ve nörolojik muayene yöntemleri (Eğik düzlem ve motor skora) kullanılarak Etanercept, methotrexat ve etanercept+methotrexat kombinasyonlarının ikincil hasar üzerindeki koruyucu ve tedavi edici etkinlikleri araştırıldı. Çalışmada 30 adet sprague Dawley cinsi dişi erişkin rat kullanıldı. Anesteziyi takiben T7-9 (torakal) mesafesinden yapılan cilt insizyonu ve paravertebral adaleler sıyrıldı. Grup 1(kontrol), grup 2 (laminektomi+kord basısı),grup 3 (laminektomi+kord

basısı+etanercept), grup 4 (laminektomi+kord basısı+methotrexat), grup 5 (laminektomi+kord basısı+etanercept+methotrexat) verilen 6'şar rattan oluşan toplam 5 grup oluşturuldu. Deneklerin 1, 3, 5 ve 10. günlerde eğik düzlem ve motor skorları değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirme için 10. gün sakrifiye edildiler.

Bulgular: Her iki monoterapi grubunun travma grubuna göre klinik bulgulara istatistiksel anlamda belirgin düzelme ve buna uyumlu şekilde histolojik bulgulara istatistiksel anlamda nekroz ve apoptozis oranlarında belirgin baskılanma sağlanmıştır. Her iki monoterapi grubunun karşılaştırmalarında klinik ve histolojik bulgulara göre aralarında istatistiksel anlamda farklılığın olmadığı, ancak etanercept lehine kısmi bir farklılığın olduğu görülmüştür. Kombine terapi grubunun travma grubu ile karşılaştırılmasında klinik bulgular ve apoptozis açısından istatistiksel anlamda kombine tedavi lehine; mono terapiler ile karşılaştırılmasında ise kombine tedavinin histolojik (nekroz ve apoptozisin baskılanması) olarak istatistiksel anlamda monoterapi gruplarına üstünlük sağlamasına karşın klinik anlamda bu farklılığın görülmediği ortaya konmuştur.

Sonuç: Gerek çalışmamızdaki denek sayısının; gerekse literatürde yapılan çalışma sayısının çok sınırlı olması methotrexat+etanercept kombinasyonunun etkilerinin net olarak ortaya konmasına engel olmaktadır. Bu nedenle daha fazla sayıda deneysel ve klinik çalışmanın yapılması gereklidir.

Anahtar kelimeler: Laminektomi, rat, omurilik basısı, etanercept, methotrexat, travma

ABSTRACT

EVALUATION OF THERAPEUTIC AND PRESERVATIVE EFFECTS OF ETANERCEPT-METHOTREXATE COMBINATION IN EXPERIMENTAL RAT SPINAL INJURY MODEL

Introduction: Traumatic spinal injury (TSI) is defined as a sudden, devastating, debilitating event which causes highly valued personal and social costs; and physiological, sociological problems.

Even though advancements in medical care have improved rates of morbidity and mortality, progress in pharmacotherapy which has been developed to stimulate regeneration and restrict neuronal damage, is still limited.

One reason for treatment modalities, which have been successful in preclinical trials, to end up with limited results in clinical studies, is the complexity of the secondary degenerative response which has been triggered by the primary mechanical injury. Most of the mono-therapies affect, only one stage of the secondary injury mechanism; whereas a successful treatment should be effective in many stages. Therefore combined therapy practices are being prioritized in clinical and experimental trials. This study is designed to understand if Etanercept+Methotrexate combination in TSI has any synergistic effects or not.

Methods: In this study with the use of histological (Luxol fast hematoxylin-eosin and TUNEL dying) and neurological examination (Inclined plane and motor scoring) methods; preservative and therapeutic efficacies of Etanercept, Methotrexate and Etanercept+Methotrexate combination in secondary injury are being investigated on spinal injury models which have been created by clip compression technique. 30 Sprague Dawley breed mature female rats were exploited in this study. Following the anesthesia, with a skin incision through the space between T7-T9 (thoracal vertebrae), paravertebral muscles were dissected; and five groups, 6 rats in each, were comprised: group 1 (the control group), group 2 (laminectomy + cord compression), group 3 (laminectomy + cord compression + Etanercept), group 4

(laminectomy + cord compression + Methotrexate) and group 5 (laminectomy + cord compression + Etanercept + Methotrexate). Subjects were evaluated at days 1, 3, 5 and 10 for their inclined plane and motor scores. All were sacrificed at day 10 for the histopathological examination.

Findings: Regarding the clinical findings, in each mono-therapy group with respect to trauma group, a significant recovery, and in correspondence to that a significant reduction of necrosis and apoptosis rates in histological results were found. When two mono-therapy groups were compared, there was no significant difference in clinical and histological manners, whereas a partial difference was observed in favor of Etanercept. In comparison of combination therapy group verses trauma group, a significant difference in the favor of combination therapy -regarding the clinical findings and apoptosis- was found. When compared with the mono-therapies, combination therapy is found to be significantly superior to mono-therapy groups in histological aspect (necrosis and apoptosis reduction), whereas this superiority cannot be kept in clinical sense.

Results: Neither the number of subjects in our trial nor the quantity of studies in the literature is efficient enough to clearly manifest the effects of Methotrexate + Etanercept combination in TSI. Therefore more experimental and clinical studies are needed to be accomplished.

Keywords: Laminectomy, rat, spinal cord compression, etanercept, methotrexate, trauma.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan hocalarım Prof. Dr. Nezih ÖZKAN'a, Prof. Dr. Rüçhan ERGÜN'e, Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ'ye, Yrd. Doç. Dr. Yaşar DAĞISTAN'a, Dr. Ömer POLAT'a, Dr. Veli ÇITIŞLI'ya ;

Tez yazımı boyunca desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ'ye, tezimin histopatolojik incelemesindeki katkılarıyla Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT'a;

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Güven KILIÇ'a, Serkan ŞİMŞEK'e, Kutlu SARI'ya, Seçkin Emre CANCAN, Necdet Selim KAYA'ya, hemşire Ümmühan YİĞİT'e;

Sevgi ve saygılarımı sunarım.

Dr. Semih AKAR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİL VE RESİMLER	xi
GRAFİKLER	xiii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	1
2.1 Tarihçe.....	2
2.2 Omurilik Yaralanma Modelleri.....	3
2.3 Klinik Nörolojik Muayene Derecelendirmesi.....	5
2.4 Nörolojik Değerlendirme	6
2.5 Spinal Kord Travması Lezyonun Bütünlüğü	13
2.6 Spinal Kord Anatomisi.....	15
2.6.1 Ms iç yapısı	18
2.6.2 Spinal kordun kanlanması:	25
2.7 Omurilik Yaralanmasının Fizyopatolojisi.....	26
2.8 Etanercept.....	33
2.9 Methotreksat (MTX).....	34
3.GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1 Gruplar	36
3.2 Anestezi	37

3.3 Cerrahi.....	37
3.4. Klinik Nörolojik Muayene	38
3.5 Histopatolojik Değerlendirme	39
3.5.1 Işık mikroskopik değerlendirme:	40
3.5.2 İmmunhistokimyasal İnceleme	43
3. 6 İstatiksel değerlendirme	46
4. BULGULAR.....	46
4.1 Işık Mikroskopisi Görüntüleri.....	61
KAYNAKLAR	76
EKLER	

SİMGELER VE KISALTMALAR

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick end Labeling

T 7-9: Torakal Vertebralar

L 11: Lomber vertebralar

ASIA: American Spinal Injury Association

S: Sakral Vertebra

AVM: Arterio Venöz Malformasyon

C: Servikal

BT: Bilgisayarlı Tomografi

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

Tr: Traktus

N: Nervus

Nuc: Nucleus

TNF α : Tümör Nekrous Faktör

IL: İnterlökin

ATP: Adenozin Trifosfat

Na: Sodyum

Ca: Kalsiyum

K: Potasyum

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

SOD: Super Oksit Dismutaz

PAF: Platelet Aktive Edici Faktör

TNFR: Tümör Nekrous Faktör Reseptör

Ig: İmmunn Globulin

MTX: Metotreksat

DNA: Deoksirbonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

İP: İntraperitoneal

PVD: Cbatticon solüsyonu

HE: Hematoksilen Eozin

TdT: Teminal deoksinükleotidel Transferaz

PBS: Fosfat Tampon Solüsyonu

TOY: Travmatik Omurilik Yaralanması

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Araştırmacılar ve uyguladıkları spinal kord yaralama modelleri ile ilgili örnekler.	4
Tablo 2: Kas kuvveti derecelendirmesi.....	7
Tablo 3: Motor seviye sınıflaması için kullanılan temel kaslar	8
Tablo 4: Temel duyuusal nirengi noktaları	9
Tablo 5: İskelet kasları ve onların en önemli spinal inervasyonları.....	10
Tablo 6: Duyu değerlendirme ölçeği	11
Tablo 7: ASİA nörolojik özürölülük derecesi.	12
Tablo 8: Drummond ve Moore kriterleri	38
Tablo 9: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik- Düzlem(Inclined Plane) Derecelerinin karşılaştırılması ($p < 0,05$)	49
Tablo 10 : Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor Fonksiyon Skorlarının karşılaştırılması ($p < 0,05$)	53
Tablo 11: Mann-Whitney-U testi ile eğik düzlem sonuçlarının , nekroz ve apoptotik hücre sayısının Gruplar arası ikili karşılaştırması.	55
Tablo 12: Mann-Whitney-U testi ile motor skor sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması	56
Tablo 13: Wilcoxon testi ile grup içi Eğik Düzlem verilerinin karşılaştırılması.	57
Tablo 14: Wilcoxon testi ile grup içi Motor skor verilerinin karşılaştırılması	57
Tablo 15: Hemotoksilen eozin boyama ile grublara göre nekroz skorları	58
Tablo 16: Tunnel boyama yöntemi ile apoptotik hücre sayıları	59
Tablo 17: Kruskal- Wallis testi ile 10. gün Nekroz ve Apoptoz sonuçlarının karşılaştırılması ($p < 0,05$)	59

ŞEKİL VE RESİMLER

Şekil 1: Dura ve araknoid membran , subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin.. 16 omurilikten çıkışı, ve ligamentum dentikulatum gösterilmiştir. (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD)	16
Şekil 2: Serebral ,serebellar ve Omurilik dokusu bütün olarak gösterilmektedir.	17
(Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD)	17
Şekil 3: Medulla spinaliste yer alan başlıca lif ve traktuslar	18
Şekil 4: Omuriliğin sonlandığı kısım (1) ,Filum terminale interna (2), dura (3), ... 19 subaraknoid aralık (4).	19
Şekil 5: Omuriliğin arter ve venleri.	26
Resim 1: Klip kompresyon ile spinal kord hasarı oluşturulması.	38
Resim 2: Sham grubuna ait normal medulla spinalis kesiti. Luxol fast blue.....	61
Resim 3: Sham grubuna ait görüntü. Hematoksilen&Eozin	61
Resim 4: Sham grubuna ait kesitte apoptotik hücreler (→). TUNEL yöntemi.....	62
Resim 5: Spinal kord hasarı yapılan gruba ait görüntü. Lezyon alanında doku bütünlüğü kaybı, ödem görülmektedir. Beyaz maddede vakuolize akson yapıları göze çarpmaktadır. Luxol Fast Blue.	62
Resim 6: Spinal kord hasarı yapılan gruba ait görüntü. Lezyon alanı-core area bölgesinde doku bütünlüğünün kaybı, ödem, inflamatuvar hücrelerin artışı görülmektedir. Hematoksilen&Eozin	63
Resim 7: Spinal kord hasarı oluşturulan grupta artmış apoptotik hücreler görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.	63
Resim 8: Spinal kord hasarı yapıp etanercept verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.....	64
Resim 9: Spinal kord hasarı yapıp mtx verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.....	64

Resim 10: Spinal kord hasarı yapıp eta+ mtx verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.....	65
Resim 11: Spinal kord hasarı yapıp etanercept verilen gruba ait görüntü. Lezyon alanı-core area (*) bölgesinin daha sınırlı olduğu görülmektedir. Hematoksilen&Eozin.....	65
Resim 12: Spinal kord hasarı yapıp etanercept+mtx verilen gruba ait görüntü. Lezyon alanı-core area (*) bölgesinin daha sınırlı olduğu görülmektedir. Hematoksilen&Eozin.....	66
Resim 13: Mtx verilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.	67
Resim 14: Etanercept verilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.....	67
Resim 15: Etanercept + mtx verilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.....	68

GRAFİKLER

Grafik 1: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik-Düzlem derecelerinin karşılaştırılması.....	50
Grafik 2: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik-Düzlem derecelerinin karşılaştırılması.....	50
Grafik 3: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor fonksiyon skorlarının karşılaştırılması	54
Grafik 4: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor fonksiyon skorlarının karşılaştırılması	54
Grafik 5: Mann-Whitney-U testi ile eğik düzlem sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması	55
Grafik 6: Mann-Whitney-U testi ile motor fonksiyon sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması	56
Grafik 7: Mann-Whitney-U testi ile Gruplar arası nekroz ve apoptotik hücre sayısının ikili karşılaştırması.....	60

1.GİRİŞ

Spinal kord injurisi komplet ya da inkomplet olsun, kordun önemli fonksiyonlarında (motor, duyu, otonomik ve refleks) kaybına neden olmakla birlikte aynı zamanda sonuçları açısından büyük bir sosyal problemdir. Akut spinal kord yaralanması 20-40/1.000.000 oranında izlenir. Spinal kord injurisi sonrası hayatta kalanların yarısından fazlası normal yaşantısına geri dönememektedirler. Spinal kord travmalı hastaların yaklaşık yarısı komplet yaralanmaya sahiptir ve lezyon altında istemli motor ya da duysal fonksiyon korunmamıştır. Yaklaşık 2/3' u servikal bölgededir (1). Akut omurilik yaralanmasının tedavisi için harcanan çabalar, çağdaş yaklaşıma olumlu katkılarda bulunmaktadır fakat kalıcı ve evrensel bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. (2,3,4). Akut spinal kord yaralanmasına bağlı oluşan hasarın meydana gelmesinde iki mekanizma olduğu hipotezi ileri sürülmektedir. Bunlar birincisi primer-mekanik yaralanma ikincisi ise primer yaralanma tarafından başlatılan birçok faktörün etikili olduğu sekonder hasarlanma olarak bildirilmektedir (5). Aynı zamanlı mekanik doku hasarından kaynaklanan primer yaralanma nekrotik hücre ölümü ile sonuçlanır. Sekonder dejenerasyon, yaralanma ile tetiklenen bir olaylar kaskadı, endojen hücre ölümü yollarının aktivasyonunun sonucudur (1). Nöronal yaralanmada deneysel ve klinik araştırmaların büyük kısmı sekonder yaralanmayı önlemek ya da azaltmaya yöneliktir (6).

Bizim çalışmada amacımız etanercept+metotreksat ve bunların kombinasyonunun spinal kord yaralanmasında koruyucu ve tedavi etkilerini görmektir.

2.GENEL BİLGİLER

Spinal kord injürisi toplumda mortalite ve morbiditeye önemli katkıda bulunur. Yaklaşık 200.000 kişi şu anda ABD'de spinal kord yaralanması ile yaşamaktadır (7,8). Yıllık insidansı milyonda 28-50 yeni vaka olduğu tahmin edilmektedir (7,9,10,11). Travmatik spinal kord yaralanmasında kas iskelet sistemi

(inkomplet veya komplet parapleji veya tetrapleji), üriner sistem, gastrointestinal sistem (11-14), etkilenebilir. Aynı zamanda depresyon ve anksiyete gibi psikolojik yan etkileri bulunmaktadır(15,13). Spinal kord yaralanmalarının ortalama yıllık maliyeti yıl başına 15000-3000\$(16), tahmini ömür boyu maliyeti ise yaralanma şiddetine bağlı olarak 500000\$-3000000\$ arasındadır (10-11).

Spinal kord yaralanması nedenleri:

- Motorlu araç kazaları: %46 (17,7,9,18,10,11). Emniyet kemeri kullanımı %60 oranında omurilik yaralanması riskini azaltır.
- Düşme %22 (17,7,9,18,10,11)
- Şiddet %16 (17,7,18,10,11)
- Spor %12 (17,7,10,11)

Akut omurilik yaralanması tedavisine yönelik araştırmalar sonucunda henüz kalıcı ve anlamlı derecede etkili bir tedavi protokolü geliştirilebilmiş değildir. (2,4,3). Spinal kord yaralanmalarında ilk yaralanma sonucunda dış etkenlerle oluşan kompresyon, patlama kırıkları, laserasyon, ezilme sonucu omurilikte oluşan hasar primer hasar tanımlanır(19). Spinal kord yaralanmasında en etkin tedavi kaçınılmaz olan çarpma etkisiyle başlayan ikincil hasarın önlenmesidir.

2.1 Tarihçe

Spinal kord injurilerinin tıbbi tarihçesine ilk olarak eski mısırdaki Edwin Smith papirüslerinde rastlanmaktadır.(20,21). Piramitlerin inşaatı sırasında 48 travmanın altısında İmhotep (22) tarafından omurilik yaralanması saptanmıştır. Boyun travması olan 33 no'lu vakada ekstremiteler hareketsizliğinden, idrar kaçırma ve lezyon seviyesinin distalinde duyu kaybı tespit edilmiştir. İmhotep boyun travmalarını tedavi edilemez olarak tanımlamıştır.

Hipokrat (M.Ö 460-377), Hipokrat tahtasını ve traksiyon uygulamasını omurga bozukluklarını düzeltmek amacıyla geliştirmiştir(23). Hipokrat bu hastalarda dizüri, konstipasyon cilt sorunlarından da bahsetmiştir.

Galen (MS 130-201) ilk defa hayvan deneyleri yapmıştır. Cerrah Paulus (MS 625-690) basıyı kaldırmak amacıyla laminektomiye tanımlamıştır (24,25,26).

16.yy'da Pare odundan bir düzenek kurmuş ve spinal dislokasyonları düzeltmeyi amaçlamıştır.(27)

1646 Hildanus spinöz çıkıntılara çivi takıp çekerek servikal fraktür ve dislokasyonlarda düzeltmeyi ve traksiyonu hedeflemiştir.

1762 Louis lomber bölgede alt ekstremitelerde güçsüzlüğe neden olan metal parçayı çıkartmış ve tam iyileşme bildirmiştir.

Lundberg omurilik yaralamalarıyla ilgili ilk deneysel çalışmaları 1890-1897 yılları arasında yapmıştır(28).

Schamus deneysel tavşan omurilik yaralanmasında patolojik değişiklikler incelemiştir. (29)

Santiago Ramon Cajal merkezi sinir sistemi yapısını tanımlayarak 1906 yılında Nobel ödülünü almıştır.

1911 Allen omurilik üzerine ağırlık düşürerek hasar oluşturma tekniğini anlatmıştır.

1978 yılında Tator, klip kompresyon modelini geliştirmiştir(30,31,32). Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir.

2.2 Omurilik Yaralanma Modelleri

Deneysel omurilik yaralanma modellerinde insan travma modeline benzer kolay uygulanabilir ve standardize edilebilir hayvan travma modellerine ihtiyaç vardır. İnsan spinal kord yaralanmasına biyomekanik olarak benzemeli, travma sonrası spinal korda benzer morfolojik ve patolojik özellikler gösterebilmeli, gelişebilecek fonksiyonel iyileşme insanlarda görülebilecek iyileşmeye benzer özellikte olmalıdır.

Travmatik omurilik yaralanmalarının çoğunu vertebraların yada diskin travmaya bağlı olarak dislokasyon yada patlama kırığı oluşturur. Buna bağlı olarak spinal kord üzerine akut kompresyon veya lacerasyon oluşmaktadır.

Spinal kord yaralanmaları ile ilgili ilk çalışma 1890-1897 yılları arasında Lundberg tarafından yapılmıştır. 1911 yılında Allen tarafından standardize edilmiş ilk model çalışma yapılmıştır. Dura üzerine dik açı ile belli yükseklikten, belli ağırlık tüp içinden düşürülerek travma oluşturulmuştur. Ağırlık düşürme modeli olarak tanımlanmıştır. Dezavantajı ise posterior kord lezyonu oluşturmaktadır.

1978 yılında Tator ve Rivlin tarafından klip kompresyon modeli geliştirilmiştir. Bu modelde anevrizma klipsleri ile klibe edilmekte ve bu sayede değişik şiddet ve süre ile travma oluşturulmaktadır. Avantajı spinal kordun tamamını travmaya uğratarak ayı zamanda iskemiye yol açmasıdır.(5,30)

Günümüze kadar epidural aralığa parafin enjeksiyonu, klemp yada parmak ile kord kompresyonu , bone wax kullanımı, forsepsi ile kordun travması, balon kompresyon modeli gibi çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.(33,34,35,36,37)

Tablo 1: Araştırmacılar ve uyguladıkları spinal kord yaralama modelleri ile ilgili örnekler(38).

Araştırmacı	Tarih	Model
Galen	2.yüzyıl	Omurilik insizyonu
Watson	1891	Köpekleri yüksekten düşürme
Allen	1911	Omurilik üzerine ağırlık düşürme
McVeigh	1923	Omurilik üzerine parmakla basma
Tarlov	1953	Epidural aralıkta balon
Fontaine	1954	Klemp ile omuriliği sıkıştırma
Rivlin	1978	Omuriliğe anevrizma klipi
Watson	1986	Omuriliğe lazer ile insizyon
Benzel	1990	Omuriliği klemp ile sıkıştırma
Stokes	1990	Elektromekanik kontüzyon

Deneyisel akut spinal travma modelleri;

2.2.1 Travmatik yaralanma

- Akut kinetik kompresyon: Kaf klip balon impaktör
- Akut statik kompresyon: Ağırlık uygulama
- Çarpma veya ağırlık düşürme
- Akselerasyon-deselerasyon
- Distraksiyon
- Transseksiyon

2.2.2 Non travmatik yaralanma

- İskemi
- Tümör kompresyon
- Kimyasal ve fotokimyasal
- Laser indüksiyon

Deneyisel spinal kord yaralanmasında iyileşmenin takibi için çeşitli parametreler geliştirilmiştir. Tralov sistemi klinik nörolojik muayene derecelendirilmesi için kullanılan subjektif bir yöntemdir. (39)

Inclined plane (eğik düzlem) 1977 yılında rivlin ve ark. Tarafından geliştirilmiştir. Objektif bir testtir.

2.3 Klinik Nörolojik Muayene Derecelendirmesi

2.3.1 Klinik muayene

2.3.1.1 Subjektif: Tarlov motor skalası

Tarlov (39) tarafından tanımlanan şekilde değerlendirildi. Buna göre;

1. Hareket yok.

2. Arka bacaklarında minimal istemli hareket var; arka ayakları üzerinde duramıyor.

3. Ayakta durabiliyor; ancak yürüyemiyor.

4. Yürüyebiliyor; ancak arka bacaklarında bir miktar spastisite ve inkoordinasyon var.

5. Normal motor hareket.

2.3.1.2 Objektif: Inclined plane:

Rivlin ve Tator (40) tarif edildiği biçimde şekilde yapıldı. Hayvan eğik bir düzlem üzerine yatay yerleştirilerek, bu eğik düzlemin yatay düzlemle olan açısı gittikçe artırıldı; hayvanın 5 sn. boyunca düşmeden durabildiği en yüksek derece, o hayvanın eğik düzlem derecesi olarak kabul edildi.

2.3.2. Histolojik Muayene

2.3.3 Görüntüleme

2.3.4 Anjiyografi

2.3.5 Spinal kord kan ölçümü

2.3.6 Aksonal tarayıcılar ile değerlendirme

2.3.7 Biyokimyasal testler

2.3.8 Nörofizyolojik değerlendirmeler

2.4 Nörolojik Değerlendirme

Lezyon seviyesinin değerlendirilmesi , kemik spinal kanal ile spinal kord ve sinirler arasındaki ilişki hakkında aşağıdaki kavramların bilinmesini gerektirir.

Sekiz çift servikal sinir ve yedi servikal vertebra var olduğu için servikal sinirler 1'den 8'e kadar aynı numaralı vertebra'nın pediküllerinin üstünden çıkar. Torakal lomber ve sakral sinirler aynı numaralı vertebra'nın pediküllerinin altından çıkarlar (41).

ASIA (american spinal injury association) Motor Puanlama Sistemi

Vücutun üzerindeki 10 temel motor segmenti sol ve sağ olmak üzere 0-5 arası bir puanla (Tablo 2) ayrı ayrı toplam 100 puan üzerinden değerlendirme esasına dayanan bir sistemdir(41).(Tablo 3). Not: kasların büyük çoğunluğunun inervasyonu komşu iki spinal seviyeden sağlanır, Tablo 3 da listelenen seviyeler bu iki segmentten altta olanlarıdır. Motor gücü ≥ 3 ise bir segmentin sağlam olduğu düşünülür.

Tablo 2: Kas kuvveti derecelendirmesi

Derece	Kuvvet
0	Hiçbir kontraksiyon yok(total paralizi)
1	Titreşme yada hafif kontraksiyon (palpe edilebilir yada
2	görülebilir)
3	Yer çekimi elimine edildiğinde aktif hareket
4	Yerçekimine karşı aktif hareket
5	Dirence karşı aktif hareket
NT	Normal kuvvet
	Test edilemeyen grup

Tablo 3: Motor seviye sınıflaması için kullanılan temel kaslar

Sağ (derece)	Segment	Kas	Test edilen hareket	Sol (derece)
0-5	C5	Biceps	Önkol fleksiyonu	0-5
0-5	C6	Bilek ekstensörleri	Bileğin yukarı kaldırılması	0-5
0-5	C7	Triseps	Önkol ekstansiyonu	0-5
0-5	C8	Fleksör digitorum profundus	Orta distal falanks fleksiyonu	0-5
0-5	T1	El intrinsikleri	Küçük parmak abduksiyonu	0-5
0-5	L2	İliopsoas	Uyluk fleksiyonu	0-5
0-5	L3	Kuadriseps	Bacığın (dizden) ön uzatılması	0-5
0-5	L4	Tibialis anterior	Ayak dorsifleksiyonu	0-5
0-5	L5	Extensör hallucis longus	Ayak başparmak dorsifleksiyonu	0-5
0-5	S1	Gastroknemius	Ayak planta fleksiyonu	0-5
50		Olası toplam puan		50
Toplam:100				

Tablo 4: Temel duyuşal nirengi noktaları

Seviye	Dermatom
C2	Oksipital tuberens
C3	Supraklavikular foss
C4	Akromiyoklavikular eklemin üzeri
C5	Antekübital fossanın yan yüzü
C6	Başparmak,dorsal yüz, proksimal falanks
C7	Orta parmak, dorsal yüz, proksimal falanks
C8	Küçük parmak,dorsal yüz, proksimal falanks
T1	Antekübital fossanın medial(ulnar) tarafı
T2	Aksillanın apeksi
T3	3.interkostal mesafe
T4	4.interkostal mesafe (memebaşı hizası)
T5	5.interkostal mesafe (T6 ve T8 arası)
T6	6. interkostal mesafe (ksifoid çıkıntı)
T7	7. interkostal mesafe (T6 ve T8 arası)
T8	8. interkostal mesafe (T6 ve T10 arası)
T9	9. interkostal mesafe (T8 ve T10 arası)
T10	10. interkostal mesafe (göbek)
T11	11. interkostal mesafe (T10 ve T12 arası)
T12	Orta noktada inguinal ligamnet
L1	T12 ve L2 arasındaki mesafenin ortası
L2	Orta-ön uyluk
L3	Medial femoral kondil
L4	Medial malleol
L5	3.metatarso-falangeal eklemdede ayak sırtı
S1	Topuğun yan tarafı
S2	Orta hatt popliteal fossa
S3	İskial kabarıklık
S4-5	Perianal bölge

Tablo 5: İskelet kasları ve onların en önemli spinal inervasyonları

Kısım	Kas	Test edilen hareket	Refleks
C1-4	Boyun kasları		
C3,4,5	Diyafram	İnspirasyon, TV, FEV1, VC	
C5,6	Deltoid	Kol abduksiyonu >90	
C5,6	Biseps	Önkol fleksiyonu	Biseps
C6,7	Ekstensör karpi radialis	Bilek ekstansiyonu	Supinator
C7,8	Triseps,ekstensör digitorum	Dirsek ve parmak ekstansiyonu	Triseps
C8,T1	Fleksör digitorum profundus	Kavrama (distal falanks fleksiyonu)	
C8,T1	El intrinsikleri	Küçük parmak abduksiyonu, başparmak adduksiyonu	
T2-T9	İnterkostal kaslar*		
T9-T10	Üst abdominaller	Beevor işareti†	Abdominal cilt refleksleri ‡
T11-T12	Alt abdominaller		
L2-L3	İliopsoas, adduktörler	Uyluk fleksiyonu	Kremaster refleksi§
L3-L4	Kuadriseps	Diz ekstansiyonu	İnfrapatellar (dizde sıçrama)
L4-5	Medial hamstringler, tibialis anterior	Ayakbileği dorsifleksiyonu	Medial hamstringler
L5-S1	Lateral hamstringler, posterior tibialler, peronealler	Diz fleksiyonu	
L5-S1	Ekstensör digitorum, ekstensör hallucis longus	Ayak başparmak ekstansiyonu	
S1-S2	Gastroknemius, soleus	Ayağın bilekten plantar fleksiyonu	Aşiller (ayak bileğinde sıçrama)
S2-S3	Fleksör digitorum, fleksör hallucis		
S2-3-4	Mesane, barsağın distal kısmı	Rektal muayene sırasında kasılma	Anal cilt refleksi,bulboka vernöz ve priapizm Δ

† **Beevor işareti:** Lezyon seviyesindeki karın kaslarını değerlendirmek için kullanılır. Hasta başını fleksiyona getirmek suretiyle yataktan kaldırılır. Distal abdominal kaslar (yaklaşık T9 altı) daha yukarı seviyedeki abdominal kaslardan zayıf ise o zaman umblikus yukarı doğru hareket eder..eğer her iki adale grubu zayıf ise bu işaret yardımcı değildir.

‡ **Abdominal cilt refleksi:** Keskin objelerle karnın bir kadranının çizilmesi altta yeralan kas yapısının kasılması ile sonuçlanır. Üst abdominal refleks: T8-9, alt abdominal refleks T10-12. bu bir kortikal reflekstir.bu refleks cevabın varlığı distal torakal seviyenin daha üzerinde gelişmiş inkomplet spinal kord yaralanmasını gösterir.

§ **Cremaster refleksi:** L1-2 yüzeyel cilt refleksidir.

Δ **Anal cilt refleksi:** Anüsün göz kırpması şeklinde hareketidir. Normal refleks, anüs bölgesinde cilde uygulanan rahatsız edici uyarının istemsiz anal kasılma ile sonuçlanmasıdır.

Bulbokavernöz refleks: Penis shaftının çimdiklenmesi veya foley kateterin kuvvetli çekilmesine cevap olarak anal sfinkterin kasılmasıdır. Kateter balonunun hareketi ile ortaya çıkan durumdan ayırt edilmelidir. İnkomplet yaralanmanın işareti olarak kabul edilir., ancak refleksin tek başına varlığı prognozun iyi olacağının göstergesi değildir.

Priapizm: Spinal travma sonrası varlığı sempatik tonus kaybı ve parasempatik tonusun hakimiyeti ile sonuçlanan spinal kord hasarını gösterir. Kaybedilen fonksiyonun geri dönüşü için kötü prognostik belirleyicidir. (41)

Duyu Seviyesinin değerlendirilmesi :

Tablo-4 de tanımlanan 28 temel nokta sol ve sağ tarafa hafif dokunma ile ve iğne ile tablo-6’de gösterilen derecelendirme ölçeği kullanılarak ayrı ayrı puanlanır.

Tablo 6: Duyu değerlendirme ölçeği

Derece	Tanım
0	Yok
1	Bozuk (kısmi veya değişik algılama)
2	Normal
TE	Test edilemez

Rektal muayene

1. Eksternal anal sfinkter muayene edenin parmağının yerleştirilmesi ile test edilir.

a-algılanan duyu var veya yok olarak kaydedilir. Hastanın herhangi bir şey (sensoriyal) hissetmesi hasarın duyu bakımından tam olmadığını ortaya koyar.

b-istirahat sfinkter tonusu ve varolan istemli sfinkter kasılması not edilir.

2. Bulbokavernöz refleksi. (41)

ASIA nörolojik özürlülük ölçeği

ASIA nörolojik özürlülük ölçeği Frankel nörolojik performans ölçeğinden uyarlanmış ve tablo-7’te gösterilmiştir.

Tablo 7: ASIA nörolojik özürlülük derecesi.

Sınıf	Komplet(tam) hasar: Sakral(S4-5) segmentlerde korunmuş hiçbir motor veya duyu fonksiyonu yok
A	İnkomplet(kısmi) hasar: Nörolojik seviyenin altında korunmuş (S4-5 sakral segmentleride içeren) hiçbir motor fonksiyon yok ancak duyu korunmuş.
B	İnkomplet(kısmi) hasar: Nörolojik seviyenin altında korunmuş(S4-5 sakral segmentleride içeren) hiçbir motor fonksiyon yok ancak duyu korunmuş
C	İnkomplet(kısmi) hasar: Nörolojik seviyenin altında korunmuş motor fonksiyon (nörolojik seviyenin altında temel kasların yarısından fazlasının kas derecesi 3’den küçüktür).
D	İnkomplet(kısmi) hasar: Nörolojik seviyenin altında korunmuş motor fonksiyon (nörolojik seviyenin altında temel kasların yarısından fazlasının kas derecesi 3 ve 3’den büyüktür).
E	Normal: Duyu ve motor fonksiyon normal

2.5 Spinal Kord Travması Lezyonun Bütünlüğü

Kısmi inkomplet lezyon: Yaralanma seviyesinin 3< segment altında herhangi bir motor ve duyu fonksiyonu varlığı, (41) korunan uzun traktus fonksiyonunu belirtilerine bakılır.

Tam olmayan lezyon belirtileri:

- Alt extremitelerde duyunun (pozisyon duyusu dahil) veya istemli hareketin varlığı
- Sakral korunma: anüs etrafında duyarlılık, istemli rektal sfinkter kasılması veya istemli ayak parmak fleksiyon varlığı
- Bir yaralanma sadece sakral refleksler korunmuşsa inkomplet olarak değerlendirilemez.

2.5.1 Kısmi yaralanma çeşitleri:

2.5.1.1 Santral kord sendromu: İnkomplet yaralanmalardan en sık görülenidir. Spinal kanalın en merkez bölgesi vasküler sınır (watershed) alanıdır ve bu nedenle ödemden kaynaklanan hasara ileri derecede duyarlıdır. Servikal bölgede üst ekstremiteler giden lifler alt ekstremitelere göre daha medialde yerleşmiştir.

Klinik bulgular(41):

1. Motor : Alt ekstremiteleri daha az etkileyen , üst ekstremitelerde belirgin güçsüzlük,
2. Duyu: Lezyon seviyesinin altında değişik derecelerde bozulma olabilir.
3. Myelopati bulguları: Sfinkter disfonksiyonu (genellikle üriner retansiyon)

Prognoz: hematomyelisi olmayan spinal kord kontüzyonlu hastaların yaklaşık %50'sinde bağımsız hareketi sağlayabilecek yeterlilikte motor ve duyu gelişimi gözlenmekle birlikte tipik olarak belirgin spastisite oluşur. Üst ekstremiteler fonksiyonu genellikle iyi değildir ve ince motor kontrol sıklıkla kötüdür. Mesane ve barsak kontrolü sıklıkla düzelir. Bu durumdaki yaşlı hastalar cerrahi tedavi olsun

yada olmasının genç yaştaki hastalar kadar iyi gelişim göstermez. 50 yaş üzeri hastaların %41'i, genç hastaların ise %97'si yürüyebilecek duruma gelir(41).

2.5.1.2 Brown-sequard sendromu

Spinal kordun yarı kesisi sendromu olarak adlandırılır. Genellikle penetran bir travmanın sonucudur. Travmatik spinal kord yaralanmalarının %2-42'de görülür(41). Aynı zamanda radyasyon myelopatisi, spinal epidural hematoma, geniş servikal disk herniasyonu(41), omurilik tümörleri, spinal AVM(Arterio venöz malformasyon)'ler ve servikal spondilozdan kaynaklanan spinal kord basısı ile oluşabilir.

Kontrateral bulgular: Disosiyasyon duyu kaybı

- Lezyonun 1-2 segment aşağısında başlayan, lezyon distalinde ağrı ve ısı duyusunun kaybı(spinalotamik yol lezyonu)
- Sağlam kalan ipsilateral ve kontrateral yollar (anterior spinalotamik yol) nedeniyle korunmuş hafif dokunma

İpsilateral bulgular:

- Arka kolon fonksiyon kaybı (propriocepsiyon ve vibrasyon duyusu)
- Lezyon seviyesinin altında motor paralizi (kortikospinal traktus lezyonu nedeniyle)

Prognoz: Bu sendrom inkomplet spinal kord yaralanmaları arasında prognozu en iyi olanıdır. Bu durumdaki hastaların %90'ı bağımsız şekilde hareket edebilme kabiliyetini, anal ve üriner sfinkter kontrolünü kazanmaktadır.

2.5.1.3 Anterior kord sendromu

Anterior spinal arter tarafından beslenen bölgede gelişen spinal kord enfarktıdır. Anterior spinal arterin tıkanması (oklüzyonu), yer değiştiren yada kayan kemik bir parçadan veya travmatik disk herniasyonundan kaynaklanan anterior spinal kord basısının sonucu olarak ortaya çıkabilir.

Prezentasyon:

1-parapleji veya kuadripleji (C7'den daha yüksekse)

2-lezyon seviyesinin altında dissosiyasyon duyu kaybı

a-ağrı ve ısı duyusunun kaybı(spinotalamik yol lezyonu)

b-korunmuş iki nokta diskriminasyonu, pozisyon hissi, derin duyu hissi

Tanıda ve cerrahiye karar vermede myelografi, BT ve MRG'den bir veya daha fazlası kullanılır.

Prognoz ; inkomplet spinal kord yaralanmaları içinde en kötü prognoza sahip olanıdır. Hastaların yaklaşık %10-20'sinde fonksiyonel motor kontrolde iyileşme olur. Duyu fonksiyonu, yaralanmayı (yanık , dekübit ülseri) önlemeye yardım edecek kadar geri dönebilir.(41)

2.5.1.4 Posterior kord sendromu

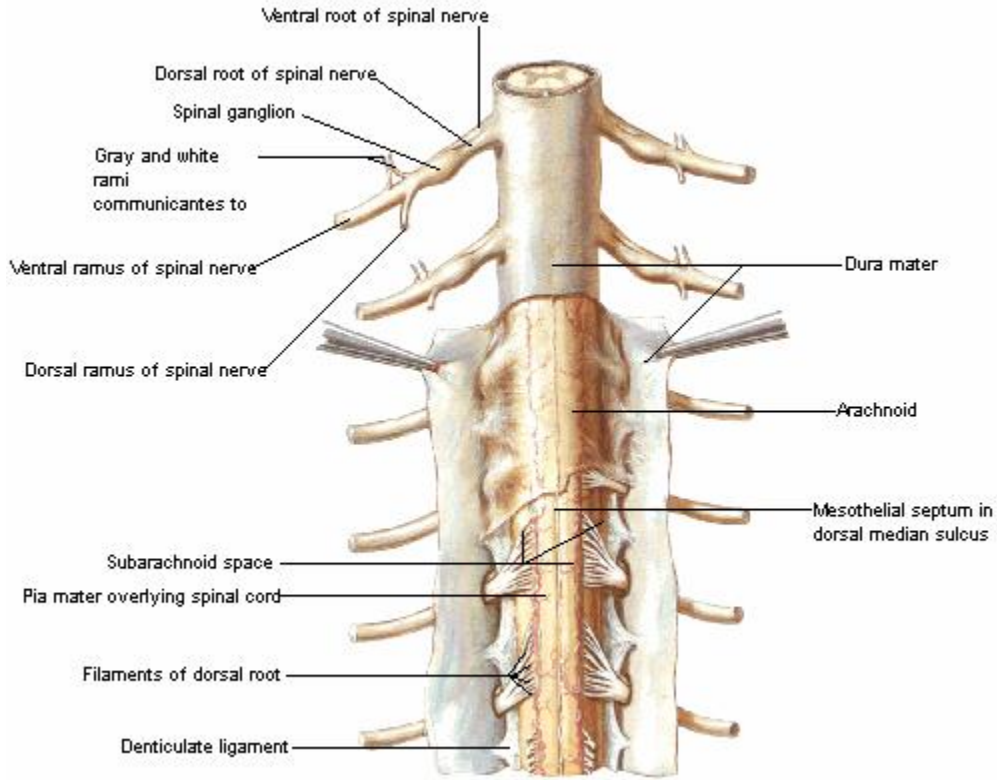
Nispeten nadir görülür. Boyun,üst ekstremiteler ve gövdede (sıklıkla yanıcı vasıfta) ağrı ve parestezilere neden olur. Hafif üst ekstremiteler parezisi olabilir. Uzun traktus bulguları minimaldir.

Tam komplet lezyon: yaralanma seviyesinin 3< segment altında herhangi bir motor ve/veya duysal fonksiyonun korunmaması. İlk muayenede tam kord yaralanması olan hastaların yaklaşık %3'ü ilk 24 saat içinde birmiktar düzelme gösterecektir. Tam omurilik yaralanmasının 24 saatten daha uzun sürmesi hiçbir distal fonksiyonun geri dönmeyeceğinin işaretidir(41).

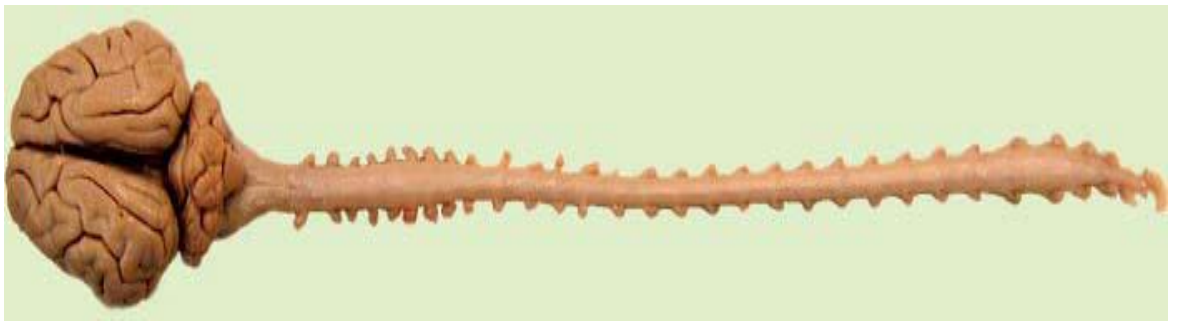
2.6 Spinal Kord Anatomisi

Merkezi sinir sisteminin canalis vertebralis içindeki bölümü olan medulla spinalis ortalama 40-45 cm uzunluğunda 1cm çapında ve 30 gr ağırlığındadır. Başlıca fonksiyonları; vücudun büyük bölümünden gelen impulslar medulla spinalis'den geçerek beyine ulaşır, istemli hareketleri başlatan impulslar yine medulla spinalis'den geçerek iskelet kaslarına gider, birçok organın otonomik innervasyonuna sağlayan lifler buradan geçer.

Medulla spinalis conus medullaristen aşağıya doğru filum terminale olarak uzanır. Medulla spinalis meninges adlı 3 kat zarla kaplıdır;dıştan içe doğru dura mater, arachnoidea ve pia mater. Ms 33 segmentten oluşur ve 31 çift spinal sinir bulundurur.



Şekil 1: Dura ve araknoid membran , subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin omurilikten çıkışı, ve ligamentum denticulatum gösterilmiştir. (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD) (42)



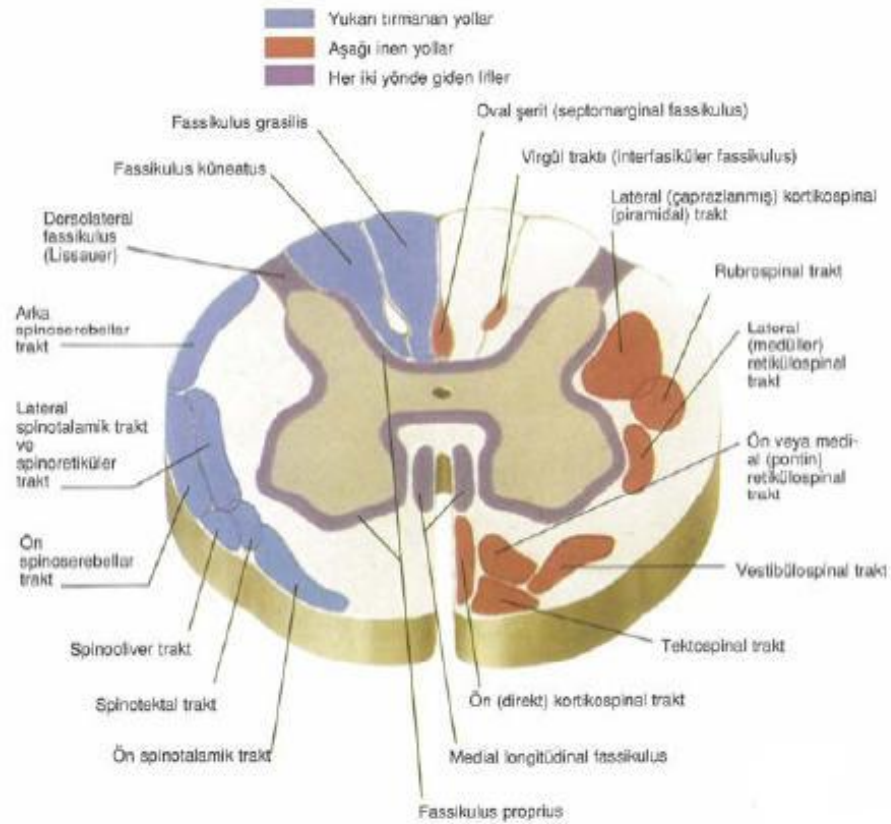
**Şekil 2: Serebral ,serebellar ve Omurilik dokusu bütün olarak gösterilmektedir.
(Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD)(42)**

2.6.1 Ms iç yapısı

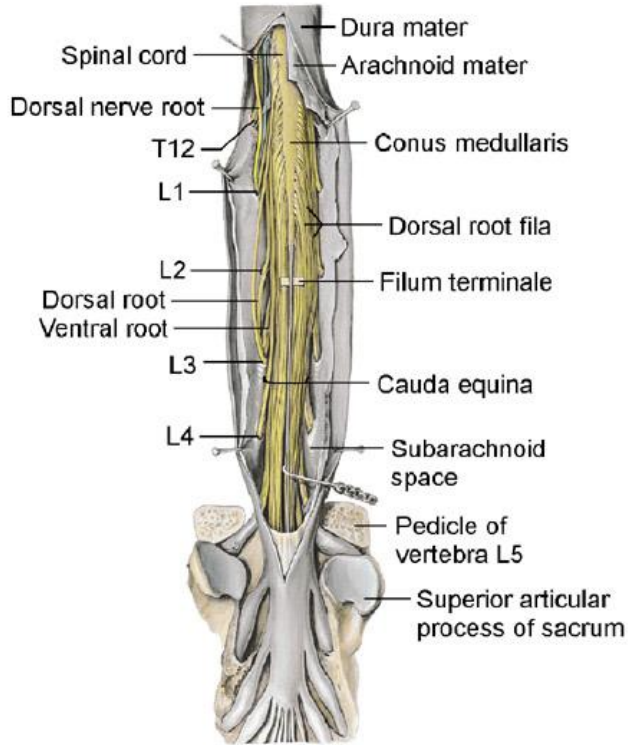
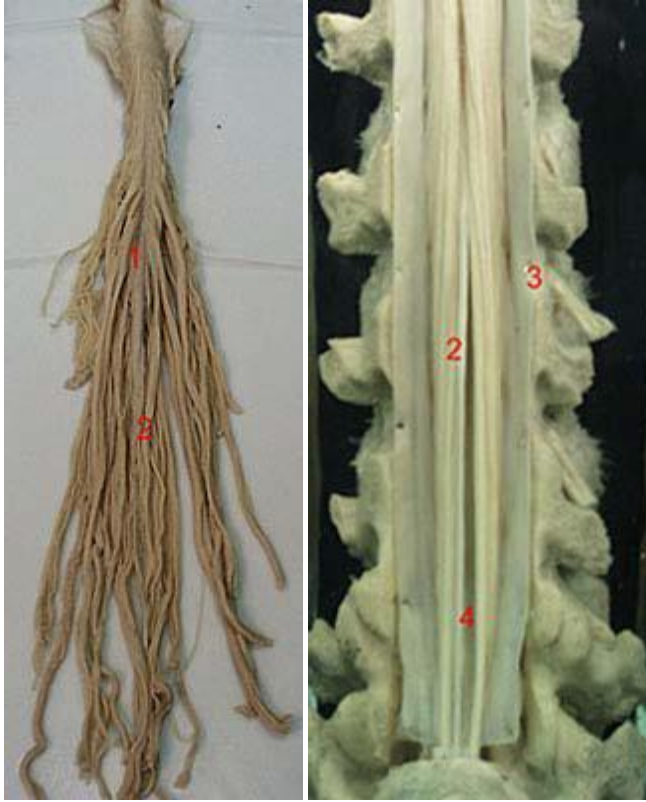
Hem yapı hemde fonksiyon bakımından farklı iki bölümden oluşur. iç kısımda gri cevher (substantia grisea), dış kısımda beyaz cevher (substantia alba) bulunur. Gri cevherin esasının hücre gövdeleri ve myelinsiz lifler, beyaz cevherde özellikle myelinli sinir lifleri oluşturur. Gri cevher hücre kümeleri (nucleus) ve sütunlardan (columna), beyaz cevher ise yollar (tractus) ve lif demetlerinden (fasciculus) meydana gelmiştir.

Gri cevher birkaç çeşit hcre topluluğundan oluşmuştur. Nöron tipleri nissl boyaması ile boyanma şekillerine göre sınıflandırılmış olup 10 adet lamina oluşturur. Bunlara rexed laminaları denir.

Beyaz cevherde aynı yere giden aynı fonksiyonu gören veya aynı orjinli lifler birlikte seyrederek , demetler şeklindeki traktusları oluştururlar. Beyaz cevher medulla spinaliste bulunduğu yere göre funiculus anterior, funiculus lateralis ve funiculus posterior olarak 3 gruba ayrılır.



Şekil 3: Medulla spinaliste yer alan başlıca lif ve traktuslar (43).



Şekil 4: Omuriliğin sonlandığı kısım (1) ,Filum terminale interna (2), dura (3), subaraknoid aralık (4).(42)

2.6.1.1 Funiculus anteriorda bulunan yollar

1. İnen yollar

a. Tr.corticospinalis (pyramidalis) anterior: Beyinde gyrus postcentralis'de bulunan piramidal hücrelerden başlayan 1.nöron medulla oblongatada çapraz yapmadan aşağı iner. Sonlanacağı medulla spinalis segmentinde commissura alba anteriordan karşıya geçerek çapraz yapar ve çoğu bir ara nöron aracılığı ile, çok azıda doğrudan ön boynuz motor nöronlarla sinaps yapar. 2.motor nöron medulla spinalisi ön kökten terk ederek boyun ve göğsün üst kısmında bulunan iskelet kaslarına gider.

b. Tr.Vestibulospinalis: 1.nöronu medulla oblongatada bulunan nuc.vestibularis lateralis (dieter)'den başlar, çapraz yapmadan aşağı inerek servikal ve lumbosakral segmentlerdeki somatomotor nöronlarla, bir ara nöron aracılığı ile , çok azıda doğrudan bağlantı kurar. Buradan başlayan 2. nöron aksonları yine ön kökten medulla spinalisi terk ederek aynı taraftan iskelet kaslarında sonlanırlar. Kas tonusunun ayarlanmasına ve vücudundengesinin sağlanmasına yardımcı olur. Ekstensör kasların hareketini kolaylaştırır, fleksörlerinkini ise inhibe eder.

c.Tr. Reticulospinalis(anterior): formatio reticularisin ponsdaki bölümünden çıkan 1. nöronun hemen hepsi aynı tarafta çok az birbölümde sonlanacağı segment yakınında commissura alba anteriordan karşıya geçerek medulla spinalisin tümü boyunca aşağı iner ve bir ara nöron ile ön boynuz motor hücrelerinde sonlanır. Bir kısım lifleri n.phrenicus ve n.intercostalis'lerin motor çekirdeklerinde sonlanır. Bu yol istemli hareketleri ve refleks aktivitesini etkiler. Ekstremitelerin koordineli birşekilde hareketini sağlar.

d.Tr. Tectospinalis: colliculus superiordan çıkan liflerden oluşur. Ayrıca colliculus inferiordan çıkıp colliculus superiordan geçen işitme duyusu ile ilgili lifleride içerir. Colliculus superiordan çıkan liflerin çoğu hemen çaprazlaşır. Bu çaprazı decussatio tegmentalis (meynert çaprazı) adı verilir. Servikal segmentlerdeki somatomotor nöronlarla , bir ara nöron aracılığı ile bağlantı kurar. Işık ve sesle ilgili baş boyun ve üst extremitelerin hareketlerini yaptırır.

e.Tr. Olivaspinalis: nucleus olivaris inferiordan başlayan lifleri ön boynuz motor nöronlarda sonlanır.

2.Çıkan yollar

a. Tr.spinothalamicus anterior: Bu yol karşı tarafın arka boynuzundaki funiküler hücrelerin aksonlarıdır. Basınç ve temas duyuları spinal sinirlerle sulcusposterolateralisten medulla spinalise girer. Gri cevhere girerek 1-2-5 laminalardaki hücrelerde sonlanır. Daha sonra commissura alba ve griseadan karşı tarafa geçerek Tr. Spinothlamicus anterioru oluşturur. Bu yol thalamusun nuc.ventralis posterolateralis2inde sonlanır. buradan başlayan 3. nörona tr.thalamocorticalis ile gyrus postcentralise ulaşır. Basınç ve temas duyusunun yeri çeşidi şiddeti, funiculus posteriorda iletilen diskriminatif duyunun katkısı olmadığı takdirde , ancak kabaca tanımlanabilir.

3.İntersegmental yollar

a.Fasciculi proprii anteoiores: Bu lifler 5- ve 7. laminalardan çıkar, kısmen çağrazlaşır ve gri cevhere yakın olan beyaz cevherde inen ve çıkan dallarına ayrılır. Tekrar gricevhere girer ve aynı laminalarda sonlanarak segmentler arasında bağlantı kurar. Bu lifler spinal reflekslerin oluşmasında önemli rol oynar.

b.Fasciculus sulcomarginalis: görme ve denge ile ilgili baş, boyun ve üst extremitie kaslarının koordineli bir şekilde refleks harekelerini sağlar.

c.Fasciculus longitudinalis medialis: nucleus interstitialis (cajal), colliculus superior, formatio reticularis pontis ve nucleus vestibularis medialisten başlar. Konuşma esnasında dudak ve dilin koordineli bir şekilde hareket etmelerini sağlar.

2.6.1.2 Funiculus lateraliste bulunan yollar

1.İnen yollar

a.Tr.corticopinalis (pyramidalis)lateralis: Medulla spinalis tümü boyunca uzanan bu yol , istemli yapılan hareketlerde rol oynar. 1. nöronu parietal ve frontal lobdaki primer ve sekonder motor sahalarıdır. Medulla oblogatanın üst 2/3 ile alt 1/3 'ün birleştiği yerde bulunan decussatio pyramidarum 'da liflerin yaklaşık %90'ı çapraz yapar. Tr.corticospinalis onlanacağı segmente girerek arak boynuzdaki ara nöro aracılığı ile bir kısımda doğrudan ön boynuz motor hücresi ile sinaps yapar.

b.Tr.rubrospinalis (monakow huzmesi): Mesencephalonda colliculus superior hizasında bulunan nuc.ruber'den başlayan bu yolun tümü çekirdekten çıkar çıkmaz çaprazlaşır(forel çaprazı), pons ve medulla oblongatadan geçerek medulla spinalisin funiculus lateralisinde uzanır. Nuc. ruber korteks ve beyincikten aldığı duyuları tr.rubrospinalis vasıtasıyla doğrudan veya bir ara nöron aracılığı ile ilgili motor nöronlara gönderir.nuc ruberin uyarılması karşı tarafın fleksör kaslarına kolaylaştırıcı, ekstensör kaslarına ise inhibe edici etki gösterir. Tr.rubruspinalisin en önemli fonksiyonu fleksör kas gruplarının tonusunu kontrol etmektir.

c.Tr.reticulospinalis: Formatio reticularisin bulbustaki bölümünden başlar. bu yol formatio retikularisin inhibe edici bölümünden çıktığı için kaslar üzerinde inhibe edici etkisi vardır.

d.Tr.olivospinalis (helveg huzmesi): Sadece boynun üst kısmında görülebilen bu yolun varlığı ve fonksiyonu tam olarak bilinmemekle beraber, baş ve boynun hareketleri ile ilgili olduğu sanılmaktadır.

e.İnen otonomik yollar: beyin sapındaki visseral merkezlerin bu lifler aracılığı ile medulla spinalisdeki preganglionik otonom sisteme ait nöronlarla bağlantı kurdukları anlaşılmıştır.

2.Çıkan yollar

a.Tr.spinotectalis: Bu yolu karşı tarafın arka boynuz hücrelerinin aksonalrı oluşturur. Lemniscus lateralisin iç tarafında ilerleyen bu yol, bulbus ve ponsu geçerek mesencephalondaki colliculus superiorda sonlanır. Bu yol spinovisual refleksi ile ilgili olup periferden aldığı duyuyu colliculus superiora ileterek göz , baş ve boynun tr.spinotectalisi uyaran etkene doğru refleks olarak yönelmesini sağlar.

b.Tr.spinothalamicus lateralis: Periferden alınan ve 3 nöronla kortekse giden ağrı ve ısı duyusu yollarının 2. nöronun aksonları bu yolu oluşturur. Özellikle yanık ağrısı ile ilgili duyuları taşıyan lifler, bulbusda formatio reticularis ilede bağlantı kurar. Thalamustan başlayan 3.nöron tr.thalamocorticalis aracılığı ile kortekste gyrus postcentralise ulaşır.

c.Tr.spinocerebellaris anterior (gowers): Özellikle alt ekstremiteye ait kas ve eklemlerden medulla spinalise gelen proprioseptif impulsları beyinciğe taşır. Bu duyuya, kortekse gidip algılanmadığı için şuuru proprioseptif duyuda

denilmektedir. Bu yol duyunun kaynaklandığı vücut parçasının durumu ve pozisyonu hakkında beyinciğe bilgi verir. Bununla beraber deri ve yüzeyel fasialardanda basınç ve temas duyularını getirir.

d.Tr. spinocerebellaris posterior (fleichsig): Alt ekstremité kas, kiriş ve eklemlerden aldığı şuuruz proprioseptif impulsları beyinciğe taşır. Ancak alt ekstremiteden kaynaklanan şuurlu proprioseptif duyu taşıyan liflerde bu yolla birlikte seyreder, fakat bu duyu beyinciğe değilde beyin korteksine gider. Kasların koordineli bir şekilde kontraksiyonunu ve tonusunu ayarlayarak vücudun pozisyonunun korunmasında önemli rol oynar.

e.Tr.dorsolateralis (lisseeur): Ağrı, ısı ve basınç duyusunu taşır.

f.Tr.spinooolivaris: Funiculus anterior ile lateralis arasında dış yüze yakın olarak bulunur ve duyunun farklı şekilde beyinciğe gittiği bir yoldur. Deriden yüzeyel, kas ve kirişlerde proprioseptif duyuyu alır. 3.nöronu pedunculus cerebellaris inferiorından kaynaklandığı tarafın beyinciğinin ön bölümüne girer. Beyincikteki pükünje hücrelerini uyarır.

g.Tr.spinoreticularis: Tr.spinothalamicus lateralisin lifleri ile karışmış olarak seyreder ve ağrı duyusu taşır. Bu yol özellikle ağrı ile ilgili olan eksternal ve visseral duyuların tüm çeşitlerini taşıyarak bu konuda şuurulluluğumuzun derecesi üzerinde önemli rol oynar.

3.İntersegmental yollar

a.Fasciculi proprii lateralis: columna lateralisin hemen dışında bulunur ve fasciculi proprii anterioresin aynı seyir ve bağlantısına sahiptir. Bu yolun lifleri arasında Tr.reticulospinalis ve otonom sisteme ait inen liflerde bulunur.

2.6.1.3 Funiculus posteriorda bulunan yollar

1.İnen yollar

a.Fasciculus interfascicularis

b.Fasciculus septomarginalis

Torakal bölgenin üst yarısı ile servikal bölgede, fasciculus gracilis ve cuneatus arasında sıkışmış vaziyette bulunan lifler, kesitlerde virgül

görünümündedirler. Bu nedenle bunlara Schultz'un virgül demeti (Fasciculus interfascicularis) denilmektedir. Torakal bölgenin alt yarısı ve daha aşağısında ise bu lifler , septum medianum posteriusun her iki yanında e ön bölümünde bulunur.bunada fasciculus septomarginalis denilir.torakal bölgenin al yarısında ovalimsi olduğundan, flehsig'in oval alanı ve sakral bölgedede üçgene benzediğinden philippe-gombault'un üçgeni olarak adlandırılır.

Fasciculus interfascicularis, arka köklerle medulla spinalise gelen ve arka kordonda inen ve çıkan dallarına ayrılan liflerin inen bölümlerinden oluşur. Fasciculus septomarginalis ise daha ziyade medulla spinalis segmentlerini birbirine bağlayan liflerden oluşur.

2.Çıkan yollar

a.Fasciculus gracilis (goll huzmesi): Funiculus posteriorun medial yarısında bulunan geniş bir yol olup dış tarafında fasciculus cuneatus bulunur. T6 segmentinin aşağısından gelen spinal sinir liflerinden oluşur. Bu yol alt extremité ve gövdenin alt yarısındaki kas, kiriş, bağ ve eklem kapsülünden gelen pozisyonumuzla ilgili proprioseptif duyuyu,vibrasyon duyusunu,temas ve basınç duyularının yerini,zaman aralıklarını ve uyarının cinsini kesin olarak bildiren taktil diskriminasyonunu taşır.

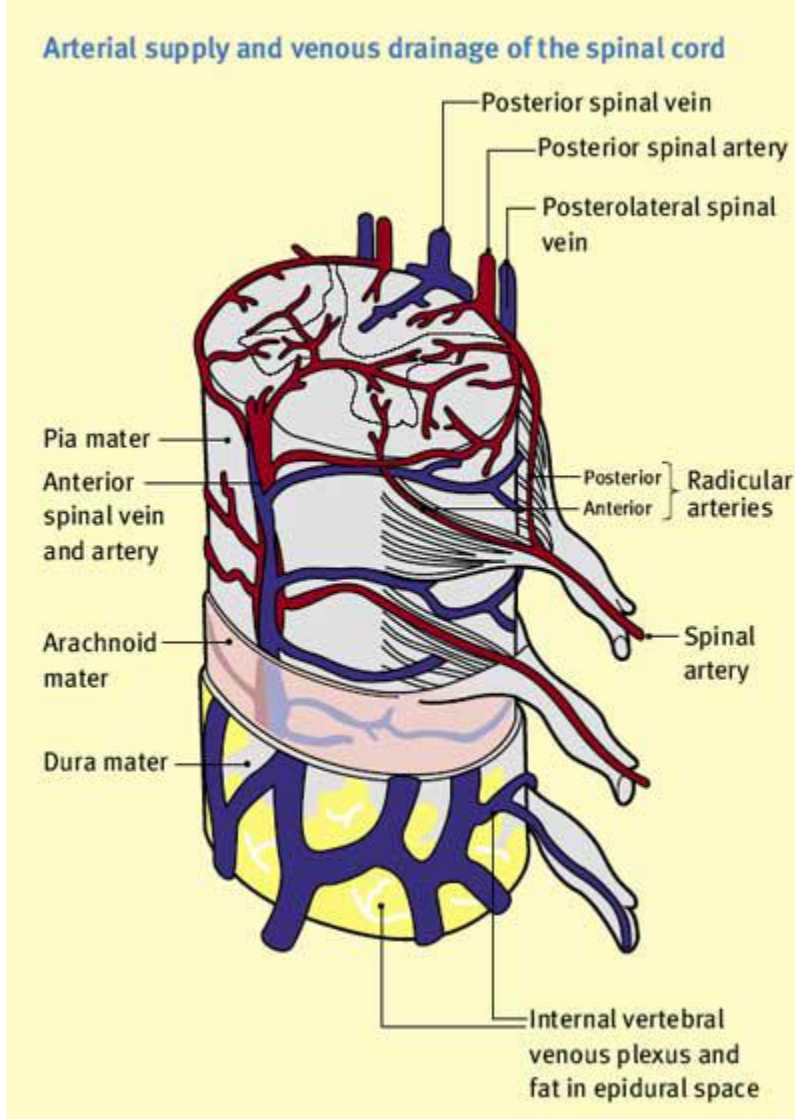
b.Fasciculus cuneatus(buradach huzmesi): Fasciculus gracilisin lateralinde bulunur. 6.torakal segmentin yukarısındaki spinal sinir liflerinden oluşması nedeniyle, ancak 6.torakal medulla spinalis segmentinin yukarısında görülür. Fasciculus gracilisin taşıdığı duyuları taşır. Sadece kaynaklandığı yerler farklıdır.

3.İntersegmental yollar

a.Fasciculus proprii posteriores: En fazla lumbal bölgede görülürler. Bu demet medulla spinalisin komşu segmentlerindeki nöronları birbirine bağlar. İntersegmental spinal refleks olayında önemli rol oynar. Kaplan arıncı kaynak(44)

2.6.2 Spinal kordun kanlanması:

Spinal kord arteria vertebralisin dalları olan anterior spinal arter, posterior spinal arterler ve her seviyede intervertebral foramenden giren radiküler arterlerden beslenir. Anterior spinal arter, fissura mediana anterior boyunca konus medullaris kadar iner ve kauda ekuina ve filum terminalede dağılan ince dallara ayrılır (55). Posterior spinal arterler, posterolateral sulkuslar boyunca bilateral aşağıya inerler ve radiküler arterlerin posterior dalları ile anastomoz yaparlar. 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 adını alır. Adamkiewicz % 80 sol interkostal lomber arterden çıkar ve T9-L2 sinir köklerine kadar ulaşır (55). Venler spinal kordda arterlere eşlik eder ve arterlerle aynı ismi alır. Longitudinal venler üst uçta internal juguler ven ve vertebral ven yoluyla vana cava superiora dökülür. Her segmentten çıkan intervertebral venler hem internal vertebral venöz pleksüs hem de foramenden kanal dışına çıkarak sakral, lumbar, interkostal ve servikal venlere ve bu yolla inferior vena kavaya dökülür.



Şekil 5: Omuriliğin arter ve venleri. (45)

2.7 Omurilik Yaralanmasının Fiziopatolojisi

Omurilik yaralanmasının medikal ve cerrahi tedavisinde önemli gelişmeler olmasına ve omurilik yaralanmasının patofizyolojisinin anlaşılmasındaki ilerlemelere rağmen omurilik yaralanması sonrası oluşan fonksiyon kaybını önlemede etkin bir tedavi henüz bulunamamıştır. Omurilik yaralanmasının patofizyolojisi akson, kan damarı ve hücre membranlarının hasarına neden olan primer mekanik hasar ile başlar. Bu primer hasar ikincil hasar ile devam eder. Burada vasküler bozulma, ödem, iskemi, eksitotoksikite, elektrolit dengesizlikleri, serbest radikal üretimi, inflamasyon ve geç apoptotik hücre ölümü oluşur. Birçok

farmakolojik ajan denenmiş ve laboratuvarında gösterdikleri başarının aksine hiçbir nörolojik fayda göstermemiştir.

2.7.1 Birincil hasar

Bu fazda omurilik yaralanması ile sonuçlanan travma, omuriliğin kendisini veya vertebral kolonu etkileyebilir. En sık kompresyon-kontüzyon tipi yaralanma görülür. Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon veya rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetlerin hepsi nöral elementlerde veya omurilik damarlarında gerilme ve yırtılmaya sebep olur. Primer hasar omuriliği nadiren tam kesiye uğratır. Genelde yaralanma bölgesini geçen kurtulmuş aksonlar mevcuttur;(46,47,48,49,50). Bu aksonlar tedavideki hedefimizdir.

2.7.2 İkincil hasar mekanizmaları

İkincil hasar süreci hemen, akut orta ve kronik fazlar olarak sınıflanabilir. Hemoraji ve hızlı nekrozu takiben astrositler ve mikrogliya reaktif hale gelir, inflammatuar hücreler göç eder. Yaralanmadan haftalar sonra skar doku ve kavite oluşur, beyaz cevherde wallerian dejenerasyonun değişik evreleri gözlenir (51).

2.7.2.1 Yaralanmadan hemen sonraki faz (0-2 saat)

Yaralayıcı olayın kısa süreli sonuçları görülür. Omurilikte ilk değişiklik omuriliğin şişmesidir. Santral gri cevherdeki hemoraji nedeniyle hücreler, hücre membranlarını mekanik yırtılmalarına bağlı yada iskemi nedeniyle hızla nekrotik hücre ölümüne giderler. Mikrovasküler yapının yırtılması çevre beyaz cevherde peteşial kanamalara yol açar. Hemoraji ve şişme omurilik iskemisi oluşturur. Buda birkaç segment kaudale ve rostrale uzanır.(52,53). Bu dönemde mikrogliyal hücrelerin yaralanmadan sonra hemen aktive olması ile proinflammatuar sitokinler (TNF- α -IL-B) dakikalar içinde aktiflenir(54). Eksitotoksik glutamatda yaralanmadan dakikalar sonra eksitotoksik seviyeye ulaşır.

2.7.2.2 Erken akut faz (2-48 saat)

Omurilik yaralanmasından sonra subpial bölgede kalan aksonlarda fonksiyonel ileti bozulur. Bu aksonlarda refraktör period uzar, yüksek frekanslı ileti bozulur, aktivasyon eşiği yükselir, ısı bağımlı ileti bloğu olur ve ileti hızı azalır. Miyelin yaraladığında hızlı K kanallarının aktivitesi artar, membran potansiyeli K⁺ denge potansiyeline yaklaşır ve aksonal ileti bloğu oluşur. MSS beyaz cevher yaralanmasındaki anoksi ATP(adenozin trifosfat) ve membran depolarizasyonunun kaybına neden olur. Na kanallarından hücre içine Na geçişi olur. İntrasellüler Na konsantrasyonundaki bu artış, membran depolarizasyonu ile birlikte olunca Na-Ca değiştiricinin ters çalışması ile hücre içine Zararlı miktarda Ca girişine neden olur. Kalsiyum iyon konsantrasyonu extrasellüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Omurilik yaralanmasında hücre hasarı ile membranların parçalanması, hücrede enerji yetmezliği ve bunun neticesinde Na-Ca değiştirici gibi elektrolit pompalarının iyi çalışmaması sonucunda bu büyük gradient farkı ile hücre içine Ca girişi olur. Kalsiyumun hücre ölümünde en çok rolü olan iyon olduğu düşünülmektedir. Ca iyonları hücre içinde fosfolipazları proteazları ve fosfatazları aktifleyerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur. Ca iyonları mitokondrial respiatuar enzimlere bağlandığında elektron transportunu bozarak serbest radikal oluşmasına neden olurlar. Hücreye Ca girişinin diğer yolu glutamat reseptörleridir. Glutamat reseptör blokerleri deneysel omurilik yaralanmasında nörolojik sonuçları iyileştirirler (55) .

İlk kez 1970'lerde demopoulos tarafından ortaya atılan hipoteze göre oksijen serbest radikalleri ve ürünleri ilerleyici doku hasarına neden olurlar(56). Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller enzimatik antioksidan mekanizmalar (sitokrom oksidaz sistemi, süperoksit dismutazlar, katalazlar, glutatyon peroksidazlar) yada non-enzimatik antioksidanlar (α -tokoferol, B-karoten, glutatyon, askorbik asit, urat, sistein, bilirubin,albumin), yada metal bağlayıcılar (seruloplazmin,transferin, laktoferrin) ile inaktive edilerek doku hasardan korunur. MSS(Merkezi sinir sistemi) askorbat, glutatyon ve alfa-tokoferol gibi antioksidan mekanizmlara yüksek oranda sahiptir (57). Ancak travma sonrası dokuda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır. Oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler, nukleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitler oluşturur ve bunun sonucunda daha

fazla serbest radikal oluşur. Omurilik yaralanmasından sonra kanamayı takiben hemoglobin, ferritin, yada transferinden demir açığa çıkar. Demirin katalizlediği membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu neticesinde membran parçalanır ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin yaptığı endotel hasarına bağlı olarak kna-omurilik bariyeri bozulur. Bunun sonucunda yaralanma bölgesine zararlı maddelerin birikimi olur. MSS SOD(süper oksit dispotaz) katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin az olması nedeniyle serbest radikal hasarına yatkındır. Ayrıca serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girebilen doymamış yağ asitleri ve kolesterolün fazla olması, serbest radikal oluşma reaksiyonlarını katalizleyen askorbik asit ve demirin fazla miktarda olması MSS'in travmatik ve iskemik yaralanmadan daha çok etkilenmesine neden olur. Serbest raidak tutucular pek çok omurilik yaralanması modelinde denenmiştir. Bunlardan klinik uygulama bulan sentetik steroid metilprednizolonun çok yüksek dozlarının nonspesifik serbest radikal tutucu etkileri olduğu ortaya çıkmıştır. Metilprednizolonun ilk 8 saatte uygulandığında nörolojik düzelmeyi belirgin şekilde kolaylaştırdığı gösterilmiştir.

Omurilik travmatik yaralanması sonrası inflamatuvar cevap saatler içinde başlar ve birkaç gün içinde pik değerine ulaşır.(58). Bu cevap endotel hasarı, inflamasyon mediatörlerinin salınımı, vasküler permeabilite artışı, ödem gelişimi, periferik inflamatuvar hücrelerin göçü ve mikroglianin aktivasyonu olarak gözlemlenir. Lezyon bölgesinde inflamatuvar hücre infiltrasyonu iki dalga halindedir. 1.dalgada polimorfonükleer granülosit infiltrasyonu varken, 2.dalga monosit vemakrofajlar tarafından gerçekleştirilir. Polimorfonükleer granülositler lezyon bölgesini ilk birkaç saat içinde infiltre etmeye başlar, 1.günde pik değerine ulaşır ve 3. günde kaybolurlar. Polimorfonükleer granulosit infiltrasyonu miktarı ile oluşan hemoraji miktarının korelasyon göstermesi, kan içindeki kemoatraktan maddelerin bu infiltrasyonun miktarını belirlemede önemini göstermiştir. 2. dalgada yaralanma bölgesine migrasyon gösteren periferik hücreler monosit/makrofaj ve mikrogliyal gruptur. Burada asıl fonksiyonun hücre debrisinin fagositozu olduğu düşünülmektedir(51). Bradikinin, prostaglandinler, lökotrienler, platelet aktive edici faktör ve serotonin gibi inflamasyon mediatörleri yaralanmış omurilikte lezyon bölgesinde birikirler. İnflamatuvar hücreler için kemoatraktan olan bu maddeler doku hasarının hızla ilerlemesine neden olurlar(57). Nötrofiller nötrofil protezalarının ve

serbest oksijen radikallerini serbestleştirirler. İnflamasyonun mediatörleri endotelial lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırır. Aktive olmuş nötrofil ve endotel hücresi arasında sıkı yapışmanın olduğu mikroçevreye dolaşımdaki antiproteazlar ve antioksidanlar ulaşamaz. Aktive olmuş nötrofilin başlattığı endotel hasarı ilerler (59). Metilprednizolon PAF antagonistleri, siklooksijenaz ve lipojenazların hepsi etkilerini inflamatuvar cevapları kısmen azaltarak yada tamamen inhibe ederek göstermektedir. Klorakin ve kolşisin kullanımı omurilikte iskemi sonrası inflamatuvar değişiklikleri ve doku hasarını azaltmıştır (60).

Tator ve arkadaşlarının klip kompresyon modeline göre hem yaralanma bölgesinde hemde sefal ve kaudal komşu bölgelerde arterioller, kapiller ve venüllerde kanlanma durur. İskemik bölge geniş bir gri cevher bölgesi ve gri cevher hemorajisine komşu beyaz cevherde daha belirgindir. Gri cevheri katederek beyaz cevhere ulaşan arteriollerdeki vazospazm ve tromboz ile sekonder hasar artar(5,61). Lezyon bölgesinde özellikle gri cevherde omurilik kan akımının ileri derecede azalması iskemi gelişmesi ile sonuçlanır(59).

Posttravmatik iskeminin travmadan saatler içinde kötüleşmesi, erken tedavi edilmesi halinde iskeminin önlenilebileceğini düşündürmektedir. Postravmatik omurilik iskemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir. Normal omurilikte, ortalama arterial kan basıncındaki değişikliklere rağmen omurilik kan akımını sabit tutan otoregülasyonu vardır. Omurilik yaralanmasından sonra bu otoregülasyon bozulur ve sistemik hipotansiyon nedeniyle omurilik kan akımı azalır. Ortalama arter basıncının 160 mmHg'ye yükseltilmesi omurilik kan akımını arttırmaz ancak yaralanma bölgesinin komşu bölgelerinde hiperemiye neden olur(5). Omurilik yaralanma derecesi ve posttravmatik iskemi derecesi ile motor ve somatosensorial uyarılmış potansiyeller arasında lineer ilişkinin olduğunun bildirilmesi posttravmatik iskeminin akson fonksiyonunun bozulması ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir(62).

Posttravmatik iskeminin kesin nedeni halen anlaşılamamıştır. Yaralanmayı oluşturan mekanik travma, vazoaktif aminlerin salınımı, hemoraji, trombozis, platelet agregasyonu, endotel hasarı ve şişme vazospazmı tetikleyebilir. Carlos ve harlan endotel hasarının aktive olmuş nötrofiller tarafından olduğunu öne

sürmüşlerdir (63). Endotel hasarına platelet yapışması, intravasküler oklüzyon, emboli ve vazojenik ödemin eşlik etmesi nedeni ile endotel hasarını azaltmak için antiplatelet ajanlar kullanılmıştır(64). MSS’nde hücre içine kalsiyum girişinin hücre ölümünde son basamaklardan biri olduğunun gösterilmesi, kalsiyum kanal blokerlerinin serebral vazospazmıda kullanılmasını gündeme getirmiştir. Kalsiyum kanal blokeri olan nimodipin omurilik yaralanma modelinde denenmiştir. Kan transfüzyonu ve dopamin, adrenalin ve nimodipin, dextran ve nimodipinin omurilik yaralanmasından sonra kan akımını arttırdığı ve nörolojik iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir (5).

Travmatik omurilik yaralanmasından sonraki hücre ölümü nekroza, bir kısımda apoptoza bağlanabilir(65,66,67,68). Hayvan omurilik yaralanmalarının aksine insan omurilik yaralanmasının her fazında ölen hücreler esasen nekroz ile ölürlür(66,69). Bunun aksine oligodendrositle iskemik hasara çok hassastır ve omurilik yaralanmasında esasen apoptoza giderler. Citron ve arkadaşları omurilik yaralanmasından sonra apoptozisin en üst değerine 3. günde ulaştığının göstermişlerdir(70). Bethea ve arkadaşları omurilik yaralanmasının tümör nekrozis faktör-alfa ekspresyonunu hızla arttırdığını göstermiş ve tnf – α ölüm sinyalini başlattığını düşünülmüştür(71). Apoptotik hücre ölümü aktif bir olaydır ve enerji ve protein sentezine gereksinimi vardır. Bu yüzden inhibe edilmesi amacıyla farmakolojik tedavi hedefi haline gelebilir. Fehling ve arkadaşları fas ile aktarılan apoptozun FasR ile bloke edilmesinin apoptotik hücre ölümünün önlenmesinde etkili olduğunu gösterdiler(72,73,74).

Oligodendrosit kaybı aksonal demiyelinizasyona neden olur ve sıçanda yaralanmadan 24 saat sonra en çoktur(75). Demiyelinizasyon ve aksonal hasar hücre gövdesinin ölmesine neden olur. Hayvan çalışmalarında kurtulmuş demiyelinize aksonlar vardırç remiyelinizasyon için hücre transplantasyonu, demiyelinize liflerde liflerde aksonal iletiyi arttırmak için (4-aminopiridin) iyi tedavi hedefleri olabilir(48,49,76). Diğer taraftan postmortem çalışmalar korunmuş demiyelinize aksonları insan omurilik yaralanmasında gösterememiştir(52,77).

2.7.2.3 Subakut faz (2 gün-2 hafta)

Bu zaman aralığı hücre tedavileri için çok uygun olabilir. Erişkin nöral prekürsör hücrelerin omuriliğe 2 hafta sonra transplantasyonu remiyelinizasyonu ve fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanırken daha geç verilen hücrelerde hayatta kalım , migrasyon ve diferantasyonu çok azdır (78).subakut fazda fagositik cevap maksimaldir. Bunun nedeni hücre artıklarının hızla temizlenmesi, bu sayede miyelin içindeki aksonal büyüme engelleyicilerin hızla uzaklaştırılması olabilir. Periferik sinir sisteminde fagositik cevabın merkezi sinir sistemine göre belirgin olarak daha fazla olması rejeneratif kapasitelerindeki farklılığı açıklayabilir.

Subakut fazda gecikmiş astrosit cevabı ile astrositler hipertrofik hale gelir ve proliferasyon olurlar. Bu astrositler gliotik skar oluştururlar. Bu skar aksonal rejenerasyona fiziksel ve kimyasal bir bariyerdir. İnsanda bu astroglial skar çok daha azdır (79). Skar oluşturma dışında astrositler yaralı omurilikte iyonik dengenin sağlanmasında, kan-beyin bariyerinin kurulmasında ve dolayısı ile ödemin çözülmesinde faydalı etkileri vardır.

2.7.2.4 Orta faz (2hafta-6 ay)

Astrositik skar ve aksonal dallanmanın devamı ile karakterize bir fazdır. Sıçan kontüzyon yaralanma modelinde kortikospinal yol aksonları yaralanmadan sonra 3 hafta ile 3 ay arasında dallanır. Retikülospinal yol se 3 ile 8 aylar arası dallanır. Bu rejeneratif çaba yaralanmış omurilikte fonksiyonel yollar kurmak için yetersiz olabilir ancak erişkin omurilik içinde rejeneratif potansiyelin olduğunun cesaret verici kanıtıdır. Farklı traktusların yaralanmaya farklı cevabı ilginç bir bulgudur.

2.7.2.5 Kronik faz (6ay<)

Yaralanmadan 6 ay sonra başlayarak ömür boyu sürer. Kronik faz lezyonun olgunlaşması ve stabilizasyonunu (skar oluşumunun devamı, kist ve sirinks oluşumu) tanımlar. Yaralanmış aksonların temizlenmesi için wallerian dejenerasyon bazen yıllar alır. Yaralanmadan 1-2 yıl sonra nörolojik defisit istikrarlı hale gelir, lezyon tam olgunlaşır. Artık lezyon nekrotik hücre ölümünden arta kalan kistik

kavitasyon ve miyelomalazidir. Omurilik yaralanmasında lezyon istikrarlı kalmayabilir ve %30 hastada geç nörolojik disfonksiyon ve nöropatik ağrı gelişebilir. Bu kronik dönemde terapötik stratejiler yaralanmış aksonların rejenerasyonuna, plastisiteyi arttırmaya , farmakolojik yaklaşımlar ile demiyelinize aksonların fonksiyonunu yada hücre tedavisi ile remiyelinizasyonunu arttırmaya yönelik olabilir. Kök hücre tedavisi ile başarı subakut dönemde uygulandığında elde edilsede bu kronik fazda başarılı kök hücre uygulaması bildirilmemiştir.

2.8 Etanercept

Etanercept rekombinan DNA teknolojisi ile üretilmiş, insan TNFR 2/p75 (tümör nekrozis faktör reseptörü) ve insan IgG1-Fc (immün globulin) proteininin birleştirilmesi ile elde edilen bir füzyon proteinidir. TNF,romatoid artrite bağlı enflamasyonda dominant sitokin işlevini görür. Etanercept,TNF'nin kompetitif inhibitörü olarak hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanmasını engeller ve biyolojik aktivitesini önler. TNF ve lenfotoksin iki ayrı hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanan pro-inflamatuar sitokinlerdir. İki TNFR'de doğal olarak membrana bağlı ve çözünen formdadır. TNF ve lenfotoksinlerin biyolojik aktiviteleri hücre yüzeyindeki TNFR'lere çapraz biçimde bağlanmaları esasına dayanır. Etanercept gibi çözülen dimerik reseptörler, monomerik reseptörlere kıyasla TNF'ye daha yüksek bir afinite gösterirler ve kendi hücre reseptörlerine bağlanan TNF'nin çok daha güçlü kompetitif inhibitörleridir.

Etanercept etkisini, TNF'nin hücre yüzeyindeki TNFR'lere bağlanmasını kompetitif olarak inhibe ederek, biyolojik aktivitelerini yok edip, TNF'ye bağlı gelişen hücresel yanıtlarını önleyerek göstermektedir. Ayrıca etanercept, TNF'nin düzenlediği veya diğer moleküllerin (örneğin, sitokinler, adezyon molekülleri veya proteinazlar) kontrol ettiği biyolojik yanıtları da değiştirebilmektedir. Etanercept, romatoid artrit, poliartriküler tip juvenil kronik artrit, psoriatik artrit, ankilozan spondilit, psoriasis vulgaris tedavisinde kullanılır. (80,81,82, 83,)

2.9 Methotreksat (MTX)

MTX özellikle neoplazmalarda kullanılan, folik asiti antagonize eden ve DNA(deoksiribonükleik asit) fonksiyonlarını etkileyen bir antimetabolittir. Antimetabolitler yapısal olarak pürin ya da pirimidinlere benzerler. Pürin ve pirimidin biyosentezinde görevli enzimleri bloke ederek DNA sentezini inhibe ederler. Hücre üzerinde en büyük toksisitesi S fazında oluşur ve toksisite derecesi maruz kalınan süre ile artar(84). Folik asit antagonistlerinin ilk defa Farber ve arkadaşları tarafından 1948’de tanımlanmasıyla kanser kemoterapisinde yeni bir dönem açılmıştır.(85) Klinikte şimdiye kadar birçok folat analogu kullanılmıştır ancak MTX en yaygın kullanılanıdır ve MTX sodyum, MTX LPF, rheumatrex, amethopterin ve NSC-740 olarak da bilinir. Kimyasal olarak folik asitin 4-amino,N¹⁰-metil analogudur. Kimyasal MTX N-[4- [[(2,4-diamino-6-pteridinyl)methylamino]benzoyl]-L-glutamic acid’dir.(86)

Etki Mekanizması

Folik asitin organizma için yararlı şekli folinik asit ve diğer tetrahidrofolat türevi koenzimlerdir. Bu koenzimler timidilatın, purinlerin, metionin ve glisin sentezinde rol oynayan tek karbon transferi reaksiyonları için gereklidir. Folik asitin dihidrofolik asit üzerinden tetrahidrofolik asite dönüşmesi için dihidrofolik asit redüktaz enzimi gereklidir. MTX dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder.(84)Tetrahidrofolat sentezinin inhibisyonu timidilat ve purin nükleotidlerinin (adenin ve guanin) biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapı taşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve ribo nükleik asit (RNA) sentezini ve enerji üretimi için gerekli ATP üretimini inhibe eder.

Farmakolojik Özellikler

MTX oral veya parenteral verilebilir. Oral biyoyararlanımı 10 mg’a kadar düşük dozlarda göreceli olarak yüksektir, yüksek dozlarda ise düşüktür. Bu nedenle 25 mg/hafta ve üzerindeki yüksek dozlara cevap vermeyen olgularda parenteral uygulama düşünülebilir. MTX romatoid artritli olgularda haftada bir uygulanır. Doz 7.5 mg/ hafta ile başlanır ve 25-30 mg/hafta’ya kadar yükseltilir. Toksisiteyi önlemek için folik asit veya folinik asit eklenir. MTX karaciğerde aktif poliglutamit ve inaktif 7-hidroksi methotreksat formlarına metabolize olur ve yaklaşık %60’ı albümine

bağlanır. Eliminasyon yarı ömrü dozla artar ve 3-15 saat arasında değişir. MTX ve metabolitleri başlıca glomerüler filtrasyon ve proksimal tübüler sekresyonla atılır. Renal fonksiyonları etkileyen ilaçlar ile birlikte verildiğinde dikkatli olunmalıdır. (87). Probenesid MTX'in tübüler sekresyonunu inhibe ettiği için kontrendikedir. Albümine daha yüksek afinite ile bağlanan aspirin, nonsteroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAİİ) ve sülfonamidler MTX'in serbest düzeyini artırır. Yüksek doz MTX ile birlikte NSAİİ kullanımı toksik ve sakıncalı olabilir. (88)

Kullanım İndikasyonları

MTX lösemi ve malignensilerde kemoterapötik ajan olarak ilk kez 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır(89).1952'de psöryazis olgularında etkinliği saptanmıştır.(90) Romatoid artritin ve diğer romatizmal hastalıkların tedavisinde yaygın ve etkin olarak kullanılmaktadır (91). MTX günümüzde sarkoidoz, refrakter inflamatuvar barsak hastalıkları ve vaskülitlerin tedavisinde de kullanılmaktadır.(92,93,94)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı tarafından Hayvan deneyleri laboratuvarı ile Histoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması süresince gerçekleştirilen tüm deneyler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 19.12.2012 tarih ve 253 karar numarasıyla onay alındıktan sonra yapılmıştır (Bkz Ek1).

Araştırma yeterli hava sirkülasyonu ve çevre ısısının sağlandığı odalarda gerçekleştirildi. Kord hasarlandıktan sonra tüm denekler uygun beslenmeleri için gruplar halinde ayrı kafeslerde tutuldu. Günde iki kez manuel kompresyonla mesaneleri boşaltıldı.

Çalışmada toplam 18 adet ağırlıkları 200-300 gr arasında değişen Spraque Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı.

3.1 Gruplar:

Çalışmamız 5 grup üzerinden planlandı:

Grup 1: (Sham-Kontrol) (n=6) :bu gruptaki ratların paravertebral adaleleri kesilerek medulla spinalis T7-9 seviyelerinde açıldı , laminektomi sonrası bası uygulamadan kapatıldı. 24. Saat 3. 5 ve 10. günlerde klinik motor muayene ve eğik düzlem test değerlendirmeleri yapıldı. 10. gün sakrifiye edilerek spinal kord doku örnekleri kurala uygun şekilde alındı.

Grup 2: (İnjury) (n=6) : paravertebral adaleler kesilip medulla spinalisin T7-9 seviyelerinde laminektomi yapıldı, medulla spinalis segmentine duramater intakt bırakılarak 1 dakika boyunca anevrizma klibi ile rivlin ve tator'un klip kompresyon yöntemiyle bası uygulandı, klip süre sonunda çıkarılacak ve katlar aslına uygun kapatıldı. 24. saat 3. 5 ve 10. günlerde klinik motor muayene ve eğik düzlem test değerlendirmeleri yapıldı. 10. gün sakrifiye edilerek spinal kord doku örnekleri kurala uygun şekilde alındı.

Grup 3 : (injury+etanercept)(n=6): anevrizma klibi ile bası uygulanan ratlara operasyon hemen sonrasında etanercept 1.25 mg/kg subkutan verildi ve 24. saat 3. 5 ve 10. günlerde klinik motor muayene ve eğik düzlem test değerlendirmeleri yapıldı. 10. gün sakrifiye edilerek spinal kord doku örnekleri kurala uygun şekilde alındı.

Grup 4: (İnjury + methotrexat) (n=6): anevrizma klibi ile bası uygulanan ratlara operasyonun hemen sonrasında methotrexat intraperitoneal (İP) olarak 0.5mg/kg verildi ve 24. saat 3. 5 ve 10 günlerde klinik motor muayene ve eğik düzlem test değerlendirmeleri yapıldı. 10. gün sakrifiye edilerek spinal kord doku örnekleri kurala uygun şekilde alındı.

Grup 5: (injury+etanercept+methotrexat)(n=6) : anevrizma klibi ile bası uygulanan ratlara operasyon hemen sonrasında 1.25 mg/kg subkutan etanercept + 0.5 mg/kg methotrexat intraperitoneal olarak verildi ve 24. saat 3. 5 ve 10. günlerde klinik motor muayene ve eğik düzlem test değerlendirmeleri yapıldı. 10. gün sakrifiye edilerek spinal kord doku örnekleri kurala uygun şekilde alındı.

3.2 Anestezi :

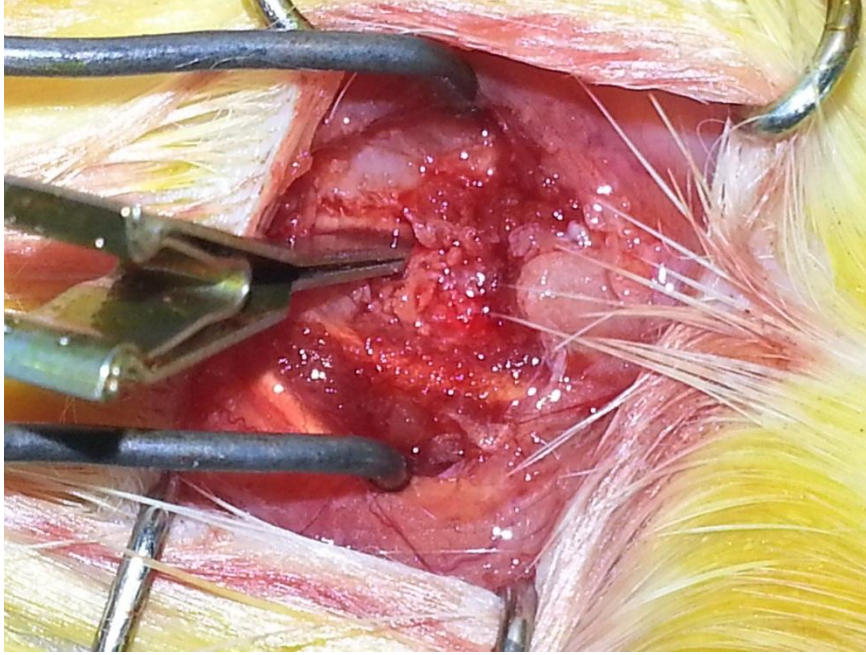
Cerrahi işlem öncesi tüm ratların normal motor fonksiyonda olup olmadığı kontrol edilerek 100 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Ksilazin intramusküler uygulandı.

3.3 Cerrahi:

Anestezi den sonra ratlar tespit tahtalarına prone pozisyonunda yerleştirildi. Torakal bölge önce PVD iyodin (Batticon st solüsyon) ile sterilize edildikten sonra traş edildi; Cilt traşının ardından tekrar PVD iyodin ile sterilizasyon sağlandı. Operasyon boyunca ve anestezi etki sonlanana kadar ısıtıcı pedle vücut ısısı 37 C derecede tutuldu. İnterskapular mesafe referans alınarak T5-T12 seviyesinde 2 cm'lik insizyonla cilt, cilt altı geçilip paravertebral adaleler sıyrılıp, laminalar ortaya kondu. Elektrikli tur yardımı ile T 7-8-9 mesafelere laminektomi yapıldı. Açığa çıkarılan medulla spinalis segmentinde, duramater intakt bırakılacak şekilde 1 dakika boyunca anevrizma klibi ile bası uygulanarak standart omurilik travması oluşturuldu. Klip süre sonunda çıkarıldı. Grup 1'e sadece laminektomi yapıldı. Grup 2 grup 3 grup 4 ve grup 5'e laminektomi ve klip kompresyon ile omurilik travması oluşturuldu (Resim 1).Grup 3'teki 6 sıçana post-op 1.25 mg/kg subkutan etanercept olarak verildi. Grup 4 'deki 6 sıçana postop methotrexat intraperitoneal (İP) olarak 0.5mg/kg verildi. Grup 5 'deki 6 sıçana postop 1.25 mg/kg subkutan etanercept + 0.5 mg/kg methotrexat intraperitoneal olarak verildi. Hemostazı takiben paravertebral adaleler ve cilt anatomik katlarına uygun olarak 3/0 vicryl ile primer sütüre edildi.

Sıçanlar normal oda ısısında, normal olarak uyandırıldı. Sıçanlar uyandığında motor muayeneleri yapıldı. Omurilik travması oluşturulan 24 sıçanın paraplejik olduğu görüldü. Sadece laminektomi yapılan, kontrol grubundaki 6 sıçanın motor kuvvetlerinin tam olduğu gözlemlendi. Sıçanlar mesane fonksiyonları, idrar çıkışı takibi ve motor fonksiyonları değerlendirilmek amacı ile uygun ortam ısısının sağlandığı her biri ayrı kafeste olacak şekilde kafeslerine kondu, standart fare yemi ile beslendi. Sıçanların motor fonksiyonları Drummond ve Moore kriterleri ve eğik düzlem

kullanılarak travmanın 1., 3., 5. ve 10. günlerinde değerlendirildi. 10. gün denekler sakrifiye edilerek omurilik doku örnekleri alındı.



Resim 1: Klip kompresyon ile spinal kord hasarı oluşturulması.

3.4. Klinik Nörolojik Muayene

3.4.1 Drummond ve Moore kriterleri ile değerlendirme

Burada Drummond ve Moore kriterleri ile hayvanların 1. 3. 5. ve 10. günlerindeki motor muayeneleri değerlendirildi.

Tablo 8: Drummond ve Moore kriterleri

0	Paraplejik, alt extremitelerde motor fonksiyon yok
1	Alt extremitelerde motor fonksiyon zayıf, sadece yer çekimine karşı güç iyi fakat bacaklarını vücudun altına çekemiyor.
2	Orta derecede alt extremitate motor fonksiyonu, yer çekimine karşı güç iyi fakat bacaklarını vücudun altına çekemiyor.
3	Motor fonksiyon çok iyi, bacaklarını vücudun altına çekip zıyabiliyor,fakat tam normal motor fonksiyon değil
4	Normal motor fonksiyonu

3.4.2 Eğik düzlem ile değerlendirme :

Rivlin ve Tator tarafından 1977’de tanımlanan bu testte hayvanın 5 sn’ye boyunca kaymadan durabildiği en büyük açı puan olarak değerlendirilirdi (5). Hayvanın, tabla üzerinde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı, eğik düzlem açısı olarak kabul edildi. Bu çalışmamızda bütün gruptaki sıçanlara cerrahi işlem sonrası 1.3.5. ve 10. Günlerde eğik düzlem testi uygulandı.

3.5 Histopatolojik Değerlendirme

Histolojik değerlendirme için alınan omurilik segmentleri %10’luk formalinde fikse edildi. Sham grubunda ortalama 3cm uzunluğunda 3-4mm çapında normal silindirik dış yüzeyleri düzgün kirli beyaz görünümlü 6 adet doku parçası, travma grubunda 3cm uzunluğunda 3-4mm çapında silindirik şekilli, tam ortasında klip kompresyonu uygulanan kor alanda koyu renkli görünüm izlenen toplam 6 adet doku parçası, travma sonrası etanercept uygulanan grubun doku parçalarında ise ortalama 3cm uzunluğunda 3-4mm çapında, makroskopik olarak travma grubundan çok farklı görünmeyen 6 adet doku parçası, travma sonrası methotreksat uygulanan grubun doku parçalarında ise ortalama 3cm uzunluğunda 3-4mm çapında, makroskopik olarak travma grubundan çok farklı görünmeyen 6 adet doku parçası ve travma sonrası etanercept+methotreksat kombinasyonu uygulanan grubun doku parçalarında ise ortalama 3cm uzunluğunda 3-4mm çapında, makroskopik olarak travma grubundan çok farklı görünmeyen adet doku parçası mevcuttu. Kontrol, travma, etanercept, methotreksat ve etanercept+methotreksat kombinasyonu uygulanan gruptaki doku parçalarının tamamı takibe alındı. Rutin takip prosedürlerinden sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında hasar oluşturulan (core zone) alandan alınan kesitlerden elde edilen preparatlar Hematoksilen-Eozin(HE), Luxol Fast Blue ile boyanarak nekrotik alanlar ölçüldü.

Nekroz alanı bir bölgede ise (+), kesitin yarısına yakınsa (++), yaygın ise (+++) olarak değerlendirildi.

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden faydalanılarak da ratlarda hasar oluşturulan spinal bölgede apoptotik hücreler sayıldı.

3.5.1 Işık mikroskopik değerlendirme:

1. %10'luk 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. % 96'lık alkolde bir saat bekletildi.
5. % 100'lik alkolde bir saat bekletildi.
6. Ksilol I' de bir saat bekletildi.
7. Ksilol II'de bir saat bekletildi.
8. Eşit miktarlarda hazırlanmış Ksilol-parafin karışımında 64° C' de etüvde 30 dakika bekletildi.
9. Parafin I' de 64° C ' de etüvde üç saat bekletildi.
10. Parafin II' de 64° C' de etüvde üç saat bekletildi.
11. 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 4-5mm kalınlığındaki parafin kesitler alındı. Bu kesitlere genel dokuyu, hasar alanlarını değerlendirmek için hematoksisilen-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 birer dakika bekletildi.
4. İki defa %96'lık alkolde birer dakika bekletildi.
5. Çeşme suyunda yıkandı.
6. Hematoksilen boyasında 3 dakika bekletildi.
7. Çeşme suyunda yıkandı.
8. Asit alkole 2 kere daldırıldı.
9. Çeşme suyunda yıkandı.
10. Amonyaklı suda 10-15 sn 'ye bekletildi.
11. Çeşme suyunda yıkandı.
12. %80 'lik alkolde bir dakika bekletildi.
13. Eozin boyasında bir dakika bekletildi.
14. 2 defa % 96'lık alkolde ikişer dakika bekletildi.
15. İki defa % 100'lük alkolde ikişer dakika bekletildi.
16. Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Myelin boyaması

Kluver ve Barera'nın 1953 yılında yayınladıkları makaledeki yöntemlerine uyularak myelin boyaması yapıldı (95)

Luxol Fast Blue solüsyonu:

Luxol Fast Blue 0.25 gr.

%95'lik alkol 250 ml. İçinde çözülür.

İçinde çözülür. Her 100 ml. İçin 0,5 ml %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 artıları giderilir.

4. Distile sua 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. Sonuçta myelin mavi, sinir hücreleri pembe-mor görülürler.

3.5.2 İmmunhistokimyasal İnceleme

TUNEL boyaması

Hazırlanan parafin bloklardan polizinli lamlara (Menzel Glaser) 4-5mm 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 işaretlenmiş deoksinukleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş kleotidler, 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.

Polizinli lamlara 4-5 mm 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' lk 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.  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 konarar 350 W' ta 5 dakika mikrodalgada kaynatıldı.

11. PBS içinde kesitler iki defa yıkandı.
12. Kıtın içinden çıkan label solüsyonundan 100 mm. Negatif kontrol için ayrıldı. (Negatif kontrol için mm. Label solüsyonu TUNEL reaksiyon karışımı yerine kullanıldı.)
13. Kalan 450 mm. Label solüsyonuna 50 mm.enzim solüsyonunun tamamı konup 500 ml.' Ye tamalanarak TUNEL reaksiyon karışımı yapıldı. İyice karıştırıldı.
14. Kesit etrafındaki bölge kurulandı.
15. Örnek üzerine 50 ml. TUNEL reaksiyon karışımı kondu. Buharlaşmayı önlemek için üzeri parafilm veya plastik lamel kapatılarak 60 dakika 37° C' de nem kabininde inkübe edildi.
16. Süre sonunda kesitler PBS ile 3 defa yıkandı.
17. Örneklerin etrafı kurulandı.
18. Örneklerin üzerine 50 ml. Converter POD damlatıldı. Buharlaşmayı önlemek için parafilm veya plastik lamael kapatılarak 30 dakika 37°C' de nem kabininde inkübe edildi.
19. Süre sonunda kesitler PBS ile 3 defa yıkandı.
20. 50-100 ml. 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.

3. 6 İstatiksel değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 10.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametreler normal dağılıma uygunluk göstermediğinden parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında ise Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Çalışma 5 grupta ve her grupta 6 adet olmak üzere toplam 30 adet sıçan üzerinde çalışıldı. Kontrol grubu “Grup 1”, Travma grubu “Grup 2” ve Etanercept uygulanan grup “Grup 3”, Metothotrexat uygulanan grup 'Grup 4', Methotrexat + Etanercept uygulanan grup 'Grup 5 ' olarak adlandırılmıştır.

1. gün eğik düzlem derecelerine göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.003$; $p<0.05$) (Tablo-9) Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 1. gün eğik düzlem dereceleri; Grup 2 ($p:0.004$; $p<0.05$), Grup 3 ($p:0.006$; $p<0.05$), Grup 4 ($p:0.005$; $p<0.05$) ve Grup 5'teki ($p:0.007$; $p<0.005$) sıçanların 1. gün eğik düzlem derecelerinden istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı yüksektir. Diğer gruplar arası

1. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p:0.006$; $p<0.005$), Grup 2-4 ($p:0.003$; $p<0.005$) ve Grup 2-5 ($p:0.003$; $p<0.005$) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte iken; Grup 3-4 ($p:0.346$; $p>0.05$), grup 3-5 ($p:0.465$; $p>0.05$) ve Grup 4-5 ($p:0.839$ $p>0.05$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır(tablo-11). Kısaca özetlenmesi gerekirse 1. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarında Sham ve travma grupları ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksek anlamlı farklılık bulunurken; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine hiç bir istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

3. gün eğik düzlem derecelerine göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.00$; $p<0.05$)(tablo-9) . Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 1. gün eğik düzlem dereceleri; Grup 2 ($p:0.004$; $p<0.05$), Grup 3 ($p:0.007$; $p<0.05$), Grup 4 ($p:0.012$; $p<0.05$) ve Grup 5'teki ($p:0.009$; $p<0.005$) sıçanların 3. gün eğik düzlem derecelerinden istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı yüksektir. Diğer gruplar arası 3. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p:0.003$; $p<0.005$), Grup 2-4 ($p:0.004$; $p<0.005$) ve Grup 2-5 ($p:0.003$; $p<0.005$) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte iken; Grup 3-4 ($p:0.654$; $p>0.05$), grup 3-5 ($p:0.374$; $p>0.05$) ve Grup 4-5 ($p:0.468$; $p>0.05$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (tablo-11) . Kısaca özetlenecek olursa aynen 1. gün eğik düzlem sonuçları gibi 3. gün eğik düzlem derecelerinin karşılaştırmasındada, Sham ve travma grupları ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksek anlamlı farklılık bulunurken; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine hiç bir istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

5. gün eğik düzlem derecelerine göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.00$; $p<0.05$)(tablo-9). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 5. gün eğik düzlem dereceleri; Grup 2 ($p:0.005$; $p<0.05$), Grup 3 ($p:0.009$; $p<0.05$), Grup 4 ($p:0.007$;

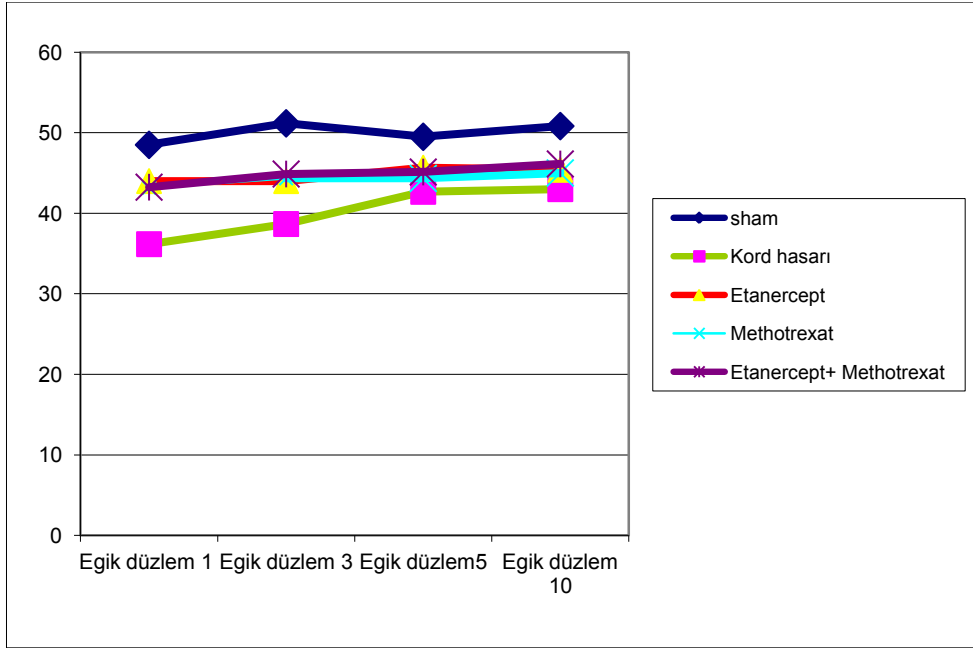
$p < 0.05$) ve Grup 5'teki ($p: 0.026$; $p < 0.005$) sıçanların 5. gün eğik düzlem derecelerinden istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı yüksektir (tablo-11). Diğer gruplar arası 5. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p: 0.004$; $p < 0.05$), Grup 2-4 ($p: 0.046$; $p < 0.05$) ve Grup 2-5 ($p: 0.04$; $p < 0.05$) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte ancak Grup 2-4 karşılaştırma verilerinin anlamlılığının azaldığıda görülmektedir (p değerleri giderek 0.05 e yaklaşmakta). Grup 3-4 ($p: 0.193$; $p > 0.05$), grup 3-5 ($p: 0.556$; $p > 0.05$) ve Grup 4-5 ($p: 0.281$; $p > 0.05$) arasında ise istatistiksel bir farksızlığın devam ettiği görülmektedir. Sonuçlar kısaca özetlenecek olursa 1. ve 3. gün eğik düzlem sonuçlarına benzer sonuçlar görülmekte ancak, Grup 2 nin grup 4 ile karşılaştırmasındaki p değerlerinin halen istatistiksel anlamlılık gösterdiği, ama p değerlerinin $p > 0,05$ değerine yaklaştığı görülmekte. Bu bize Grup 4 deki iyileşme oranının azaldığını ancak halen istatistiksel olarak iyileşme oranının anlamlı olduğunu göstermektedir.

10. gün eğik düzlem derecelerine göre tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlılığın ortadan kalktığı görülmektedir. ($p: 0.14$; $p > 0.05$)(tablo-9). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 10. gün eğik düzlem dereceleri; Grup 3 ($p: 0.17$; $p > 0.05$) ve Grup 5'teki ($p: 0.08$; $p < 0.05$); sıçanların 10. gün eğik düzlem dereceleri arasındaki istatistiksel farklılık ortadan kalkarken; Grup 2 ($p: 0.002$; $p < 0.05$) ve Grup 4 ($p: 0.009$; $p < 0.05$) deki sıçanların 10. gün eğik düzlem dereceleri arasındaki istatistiksel farklılığın devam ettiği görülmektedir . Diğer gruplar arası 10. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p: 0.008$; $p < 0.05$), Grup 2-4 ($p: 0.048$; $p < 0.05$) ve Grup 2-5 ($p: 0.008$; $p < 0.05$) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte. Grup 3-4 ($p: 1$; $p > 0.05$), grup 3-5 ($p: 0.52$; $p > 0.05$) ve Grup 4-5 ($p: 0.57$; $p > 0.05$) arasında ise istatistiksel farksızlığın 10. gün eğik düzlem derecelerinde de devam ettiği görülmektedir (tablo-11). Bu istatistiksel verileri yorumlamak gerekirse Sham ile Grup 3 ve 5 arasındaki istatistiksek farkın kalkması Grup 3 ve 5 deki iyileşme oranlarının Sham grubunu yakaladığını göstermektedir. Ancak tedavi grupları arasında istatistiksel olarak bir iyileşme farklılığı görülmediğini göstermektedir.

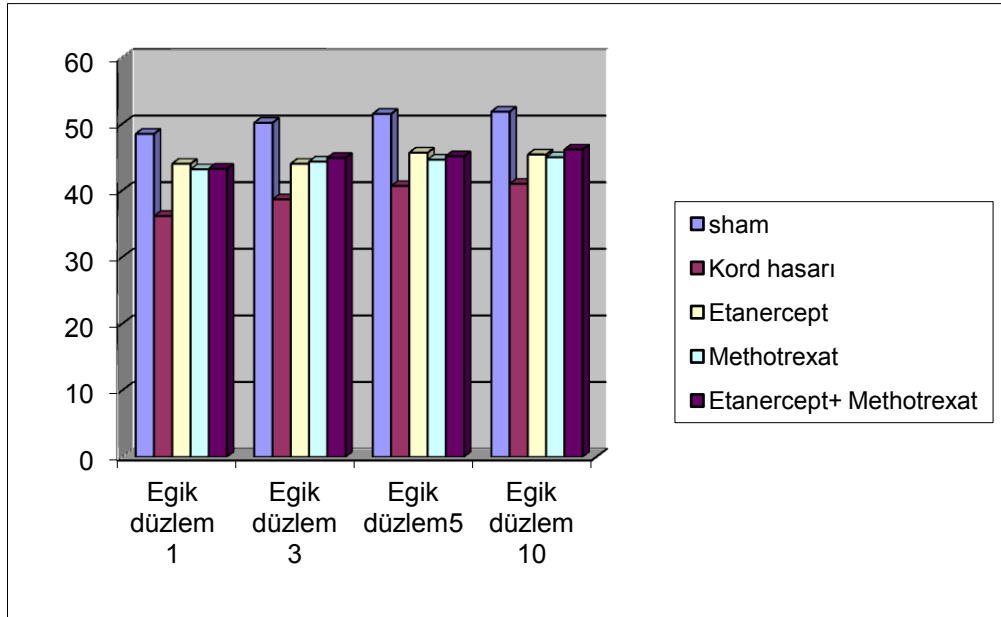
Grupların kendi içlerinde Wilcoxon testi ile yapılan değerlendirmelerine göre: Grup 1’de; eğik düzlem derecesine göre 1. ve 10. gün tüm eğik düzlem karşılaştırmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0.05$)(tablo-13). Grup 2’de; eğik düzlem derecesine göre 1. ve 10. gün tüm eğik düzlem derecelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülürken ($p:0.027$; ($p<0.05p$); Grup 3 ve Grup 4 ün tüm gün karşılaştırmalarında istatistiksel bir anlamlılık saptanmamıştır ($p<0.05$) .Grup 5’de ise; eğik düzlem derecesine göre 1-3. ve 1.-10 .gün karşılaştırmalarında, eğik düzlem derecelerinde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı iken diğer gün karşılaştırmaları anlamsız olarak bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 9: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik-Düzlem(Inclined Plane) Derecelerinin karşılaştırılması ($p<0,05$)

GRUP	SHAM		KORD HASARI		ETANERCEPT VERİLEN GRUP		METHOTREKSAT VERİLEN GRUP		ETANERCEPT+ METHOTREKSAT VERİLEN GRUP		KRUSKAL WALLİS İLE GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI
	mean	St error	mean	St error	mean	St error	mean	St error	mean	St error	p
ED-1	48,5	1,607	36,17	1,32	44	1,03	43,17	0,4	43,25	0,73	0,00
ED-3	51,17	1,6	38,67	1,12	44	0,68	44,33	0,61	44,88	0,77	0,00
ED-5	49,5	1,384	42,67	0,67	45,67	0,92	44,33	0,33	45,13	0,7	0,00
ED-10	50,83	1,138	43,0	1,41	45,4	2,07	45	2,96	46,13	1,8	0,14



Grafik 1: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik-Düzlem derecelerinin karşılaştırılması.



Grafik 2: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Eğik-Düzlem derecelerinin karşılaştırılması.

1. gün motor fonksiyon skorlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.04$; $p<0.05$)(tablo-10). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 1. gün motor fonksiyon skorları;

Grup 2 (p:0.002; p<0.05), Grup 3 (p:0.006; p<0.05), Grup 4 (p:0.002; p<0.05) ve Grup 5'teki (p:0.021; p<0.05) sıçanların 1. gün motor fonksiyon skorlarından istatistiksel olarak anlamlı yüksektir (tablo-12). Diğer gruplar arası 1. gün eğik düzlem dereceleri karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 (p:0.041; p<0.005), Grup 2-4 (p:0.043; p<0.005) ve Grup 2-5 (p:0.031; p<0.005) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte iken; Grup 3-4 (p:0.093; p>0.05), grup 3-5 (p:0.783; p>0.05) ve Grup 4-5 (p:0.2 p>0.05) arasında olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kısaca özetlenmesi gerekirse 1. gün motor fonksiyon skorları karşılaştırmalarında Sham grubu ile diğer tüm gruplar arasında ve travma grubu ile tüm ilaç grupları arasında istatistiksek anlamlı farklılık bulunurken; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine hiç bir istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

3. gün motor fonksiyon skorlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.005; p<0.05)(tablo-10). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 3. gün motor fonksiyon skorlarının diğer grupların 3. gün motor fonksiyon skorları ile karşılaştırmasına göre sonuçlar; Grup 2 (p:0.002; p<0.05), Grup 3 (p:0.07; p>0.05), Grup 4 (p:0.002; p<0.05) ve Grup 5'teki (p:0.021; p<0.05) olup; yalnızca Grup 3 ün 3. gün motor fonksiyon skorları ile grup 1 arasındaki istatistiksel anlamlılığın kaybolduğu; diğer gruplar ile 3. gün motor fonksiyon skorları arasındaki istatistiksel anlamlılığın devam ettiği görülmektedir(tablo-12).. Diğer gruplar arası 3. gün motor fonksiyon skorları karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 (p:0.03; p<0.005), Grup 2-4 (p:0.041; p<0.005) ve Grup 2-5 (p:0.012; p<0.005) arasındada istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte iken; Grup 3-4 (p:0.071; p>0.05), grup 3-5 (p:0.685; p>0.05) ve Grup 4-5 (p:0.098 p>0.05) arasında olup, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kısaca özetlenecek olursa sham grubu ile grup 3 arasındaki 3. gün motor fonksiyon skorları arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybolurken diğer gruplar ile sham grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık devam etmekte; travma grubu ile diğer ilaç grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık devam etmekte; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine hiç bir istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

5. gün motor fonksiyon skorlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.05$)(tablo-10). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 5. gün motor fonksiyon skorlarının diğer grupların 5. gün motor fonksiyon skorları ile karşılaştırmasına göre sonuçlar; Grup 2 ($p:0.002$; $p<0.05$), Grup 3 ($p:0.181$; $p>0.05$), Grup 4 ($p:0.003$; $p<0.05$) ve Grup 5'teki ($p:0.03$; $p<0.05$) (tablo-12) olup; yalnızca Grup 1 ile Grup 3 arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybının 5. gün motor fonksiyon skor sonuçları ile devam ettiği; diğer gruplar ile 5. gün motor fonksiyon skorları arasındaki istatistiksel anlamlılığın devam ettiği görülmektedir. Diğer gruplar arası 5. gün motor fonksiyon skorları karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p:0.028$; $p<0.005$), Grup 2-4 ($p:0.042$; $p<0.005$) ve Grup 2-5 ($p:0.03$; $p<0.005$) arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılıklar görülmekte iken; Grup 3-4 ($p:0.44$; $p>0.05$), grup 3-5 ($p:0.546$; $p>0.05$) ve Grup 4-5 ($p:0.066$ $p>0.05$) arasında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır. Kısaca özetlenecek olursa sham grubu ile Grup 3 arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybı 5. gün motor fonksiyon skor sonuçları ile devam ederken; diğer gruplar ile sham grubu arasındaki istatistiksel anlamlılık devam etmekte; travma grubu ile diğer ilaç grupları arasındaki istatistiksel anlamlılık da devam etmekte; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine hiç bir istatistiksel anlamlılık saptanmadı.

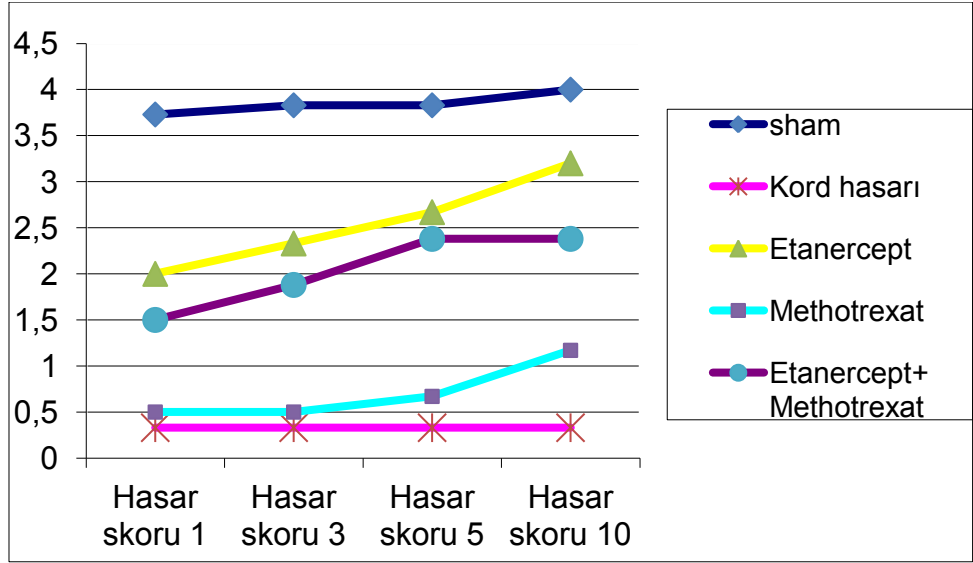
10. gün motor fonksiyon skorlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.04$; $p<0.05$)(tablo-10). Grupların ikili karşılaştırmalarına göre; Grup 1'deki sıçanların 10. gün motor fonksiyon skorlarının diğer grupların 10. gün motor fonksiyon skorları ile karşılaştırmasına göre sonuçlar; Grup 2 ($p:0.002$; $p<0.05$), Grup 3 ($p:0.329$; $p>0.05$), Grup 4 ($p:0.002$; $p<0.05$) ve Grup 5'teki ($p:0.059$; $p<0.05$) olup; Grup 1 ile Grup 3 arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybının 10. gün motor fonksiyon skor sonuçları ile devam ettiği ve buna Grup 5 arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybınında eklendiği; diğer gruplar ile 10. gün motor fonksiyon skorları arasındaki istatistiksel anlamlılığın ise devam ettiği görülmektedir(tablo-12). Diğer gruplar arası 10. gün motor fonksiyon skorları karşılaştırmalarına baktığımızda Grup 2-3 ($p:0.009$; $p<0.005$), Grup 2-4 ($p:0.024$; $p<0.005$) ve Grup 2-5 ($p:0.048$; $p<0.005$) arasındaki istatistiksel anlamlı

farklılıkların devam ettiği; Grup 3-4 ($p:0.36$; $p>0.05$), grup 3-5 ($p:0.435$; $p>0.05$) ve Grup 4-5 ($p:0.228$ $p>0.05$) arasında ise istatistiksel anlamlılığın devam ettiği görülmektedir. Kısaca özetlenecek olursa sham grubu ile Grup 3 arasındaki istatistiksel anlamlılık kaybı 10. gün motor fonksiyon skor sonuçları ile devam ederken buna Grup 5 sonuçlarında eklendiği ; diğer gruplar ile sham grubu arasındaki istatistiksel anlamlılığın devam ettiği; travma grubu ile diğer ilaç grupları arasındaki istatistiksel anlamlılığın devam ettiği; ilaç verilen gruplar arasında ise tersine istatistiksel anlamsızlığın devam ettiği görülmektedir.

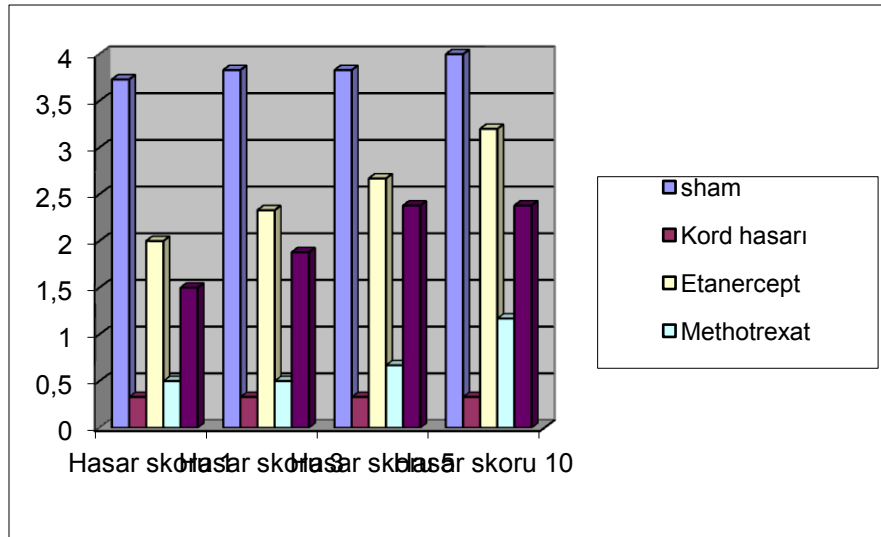
Grupların kendi içlerinde Wilcoxon testi ile yapılan değerlendirmelerine göre: yalnızca Grup 3’de; motor fonksiyon skorlarına göre 1.-5. ve 1.-10. gün karşılaştırmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmüş ($p<0.05$)(Tablo- 14). Diğer tüm Grupların kendi içlerinde Wilcoxon testi ile anlamlı bir istatistiksel sonuç alınmamıştır ($p<0.05$).

Tablo 10 : Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor Fonksiyon Skorlarının karşılaştırılması ($p<0,05$)

GRUP	SHAM		KORD HASARI		ETANERCEPT VERİLEN GRUP		METHOTREKSAT VERİLEN GRUP		ETANERCEPT+ METHOTREKSAT VERİLEN GRUP		KRUSKAL WALLIS İLE GRUPLARIN KARŞILAŞTIRILMASI
	mean	St error	mean	St error	mean	St error	Mean	St error	mean	St error	p
MS-1	3,83	0,167	0,33	0,21	2	0,63	0,5	0,5	1,5	0,5	0,04
MS-3	3,83	0,167	0,33	0,21	2,33	0,76	0,5	0,5	1,88	0,64	0,005
MS-5	3,83	0,167	0,33	0,21	2,67	0,71	0,67	0,49	2,38	0,56	0,002
MS-10	4,0	0	0,33	0,51	3,2	1,34	1,17	1,16	2,38	1,76	0,04



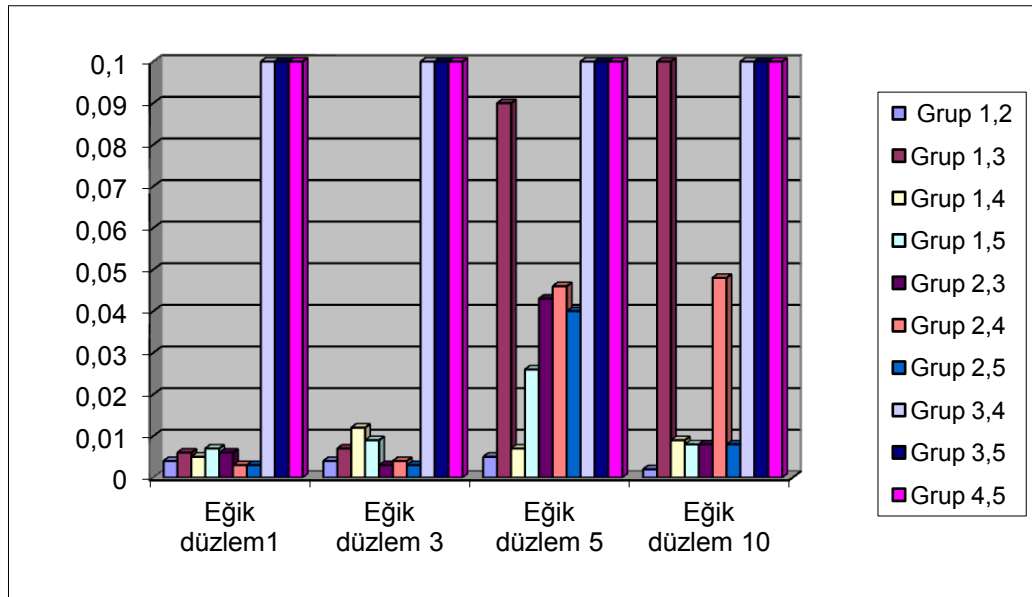
Grafik 3: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor fonksiyon skorlarının karşılaştırılması .



Grafik 4: Kruskal- Wallis testi ile 5 grubun 1. Gün, 3. Gün, 5. Gün ve 10. Gün Motor fonksiyon skorlarının karşılaştırılması .

Tablo 11: Mann-Whitney-U testi ile eğik düzlem sonuçlarının , nekroz ve apoptotik hücre sayısının Gruplar arası ikili karşılaştırması.

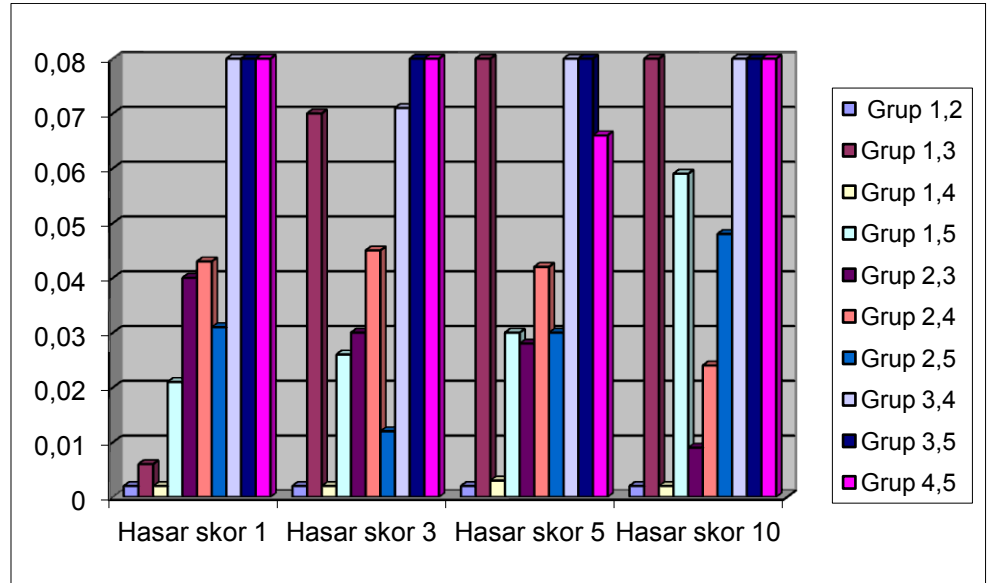
Gruplar	ED-1	ED-3	ED-5	ED-10	Nekroz	Apoptotik Hücre Sayısı
Grup 1,2	0,004	0,004	0,005	0,002	0,002	0,003
Grup 1,3	0,006	0,007	0,009	0,17	0,001	0,003
Grup 1,4	0,005	0,012	0,007	0,009	0,001	0,003
Grup 1,5	0,007	0,009	0,026	0,08	0,001	0,011
Grup 2,3	0,006	0,003	0,004	0,008	0,006	0,004
Grup 2,4	0,003	0,004	0,046	0,048	0,006	0,01
Grup 2,5	0,003	0,003	0,04	0,008	0,133	0,002
Grup 3,4	0,346	0,654	0,193	1	1	0,05
Grup 3,5	0,465	0,374	0,556	0,52	0,001	0,008
Grup 4,5	0,839	0,468	0,281	0,57	0,001	0,002



Grafik 5: Mann-Whitney-U testi ile eğik düzlem sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması

Tablo 12: Mann-Whitney-U testi ile motor skor sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması

Gruplar	Motor skor 1	Motor skor 3	Motor skor 5	Motor skor 10
Grup 1,2	0,002	0,002	0,002	0,002
Grup 1,3	0,006	0,07	0,181	0,329
Grup 1,4	0,002	0,002	0,003	0,002
Grup 1,5	0,021	0,026	0,03	0,059
Grup 2,3	0,041	0,03	0,028	0,009
Grup 2,4	0,043	0,045	0,042	0,024
Grup 2,5	0,031	0,012	0,03	0,048
Grup 3,4	0,093	0,071	0,44	0,36
Grup 3,5	0,783	0,685	0,546	0,435
Grup 4,5	0,2	0,098	0,066	0,228



Grafik 6: Mann-Whitney-U testi ile motor fonksiyon sonuçlarının Gruplar arası ikili karşılaştırması

Tablo 13: Wilcoxon testi ile grup içi Eğik Düzlem verilerinin karşılaştırılması.

Grup		eğik düzlem3 - eğik düzlem1	eğik düzlem5 - eğik düzlem1	egik düzlem 10 - eğik düzlem1	eğik düzlem5 - eğik düzlem3
1	Z	-1,633 ^b	-,813 ^b	-1,897 ^b	-1,261 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,102	,416	,058	,207
2	Z	-2,214 ^b	-2,207 ^b	-2,201 ^b	-2,201 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,027	,027	,028	,028
3	Z	-,271 ^c	-,736 ^b	-,535 ^b	-1,633 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,786	,461	,593	,102
4	Z	-1,633 ^b	-1,841 ^b	-1,265 ^b	,000 ^d
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,102	,066	,206	1,000
5	Z	-2,132 ^b	-1,687 ^b	-2,032 ^b	-,086 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,033	,092	,042	,931

Tablo 14: Wilcoxon testi ile grup içi Motor skor verilerinin karşılaştırılması

Grup		hasarskor3 - hasarskor1	hasarskor5 - hasarskor1	hasar skor 10 - hasarskor1	hasarskor5 - hasarskor3
1	Z	,000 ^b	,000 ^b	-1,000 ^c	,000 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	1,000	,317	1,000
2	Z	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b	,000 ^b
	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	1,000	1,000	1,000
3	Z	-1,414 ^c	-2,000 ^c	-2,000 ^c	-1,414 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,157	,046	,046	,157
4	Z	,000 ^b	-1,000 ^c	-1,633 ^c	-1,000 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	1,000	,317	,102	,317
5	Z	-1,342 ^c	-1,414 ^c	-1,841 ^c	-1,000 ^c
	Asymp. Sig. (2-tailed)	,180	,157	,066	,317

10. gün Hemotoxilen-Eozin boyama ile nekroz sonuçlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p=0.00$; $p<0.05$) (Tablo–15) 10. gün nekroz sayıları ikili gruplar arası değerlendirildiğinde grup–1 ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmakta; Grup 2 nin diğer gruplar ile karşılaştırmasında grup 5($p:0.133$; $p>0.05$) ile arasında istatistiksel anlamsızlık olduğu, diğer gruplar ile istatistiksel anlamlı farklılık olduğu görülmektedir. İlaç gruplarının kendi aralarında ikili değerlendirmelerine

bakıldığında yalnızca Grup-3 ile Grup 4 ($p:1$; $p>0.05$), arasında istatistiksel anlamsızlık olduğu görülmekte (Tablo– 11). Kısaca özetlemek gerekirse ortaya nekroz açısından Grup 2 ile 5 ve Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel farklılık görülüyor.Yani methotrexat ın travma grubunda görülen nekroz oranını azaltması ile methotrexat + etanercept kombinasyonunun etanercept grubuna karşı nekrozu önleme açısından ortaya istatistiksel bir farklılık koyamadıkları görülmektedir.

Tablo 15: Hemotoksilen eozin boyama ile gruplara göre nekroz skorları

	RAT-1	RAT-2	RAT-3	RAT-4	RAT-5	RAT-6
GRUP-1	0	0	0	0	0	0
GRUP-2	3	3	3	4	4	3
GRUP-3	2	2	2	2	3	2
GRUP-4	2	2	2	2	2	3
GRUP-5	4	4	4	3	4	4

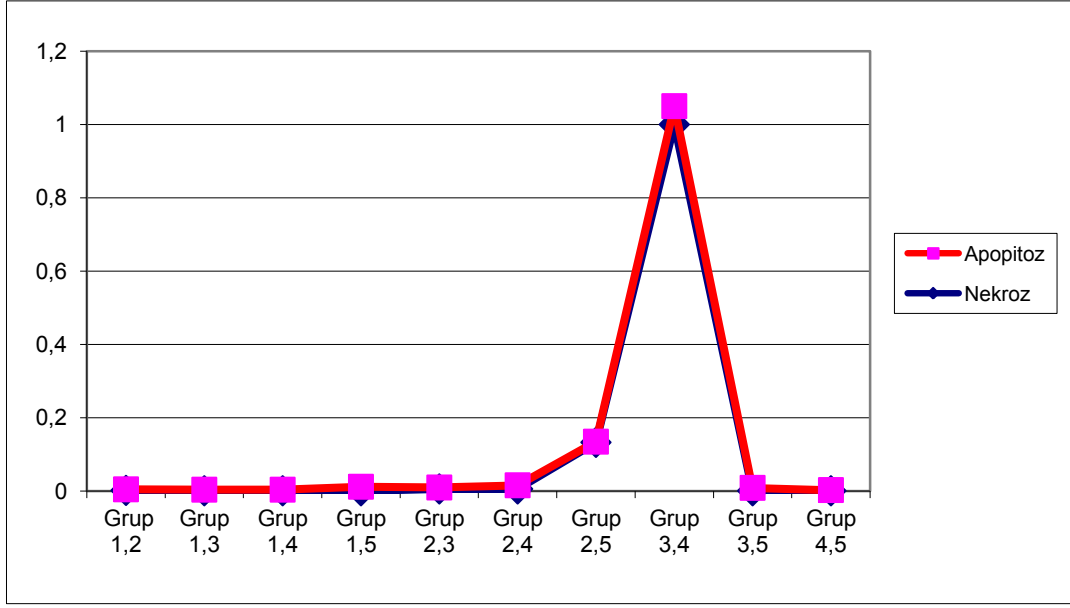
10. gün Tunel boyama ile Apoptoz sonuçlarına göre tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.00$; $p<0.05$) (Tablo–17) 10. gün Apoptoz sayıları ile ikili gruplar arası değerlendirildiğinde grup–1 ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmakta; yine grup–2 ile tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmakta; İlaç gruplarının kendi aralarında ikili değerlendirmelerine bakıldığında yine yalnızca Grup-3 ve Grup 4 ($p:0.05$; $p>0.05$), arasında istatistiksel anlamsızlık olduğu görülmekte(Tablo– 11). Kısaca özetlemek gerekirse ortaya Apoptoz açısından yalnızca Grup 3 ile 4 arasında istatistiksel farklılık görülüyor. Yani methotrexat ın Apoptozisi önleme açısından, aynen nekrozu önlemede de olduğu gibi etanercepte oranla, ortaya anlamlı istatistiksel bir farklılık koyamadığı görülmektedir.

Tablo 16: Tunnel boyama yöntemi ile apoptotik hücre sayıları

	RAT-1	RAT-2	RAT-3	RAT-4	RAT-5	RAT-6
GRUP-1	0	0	0	1	0	1
GRUP-2	8	10	17	13	11	9
GRUP-3	3	5	4	7	4	5
GRUP-4	6	9	5	5	8	6
GRUP-5	3	0	3	3	2	3

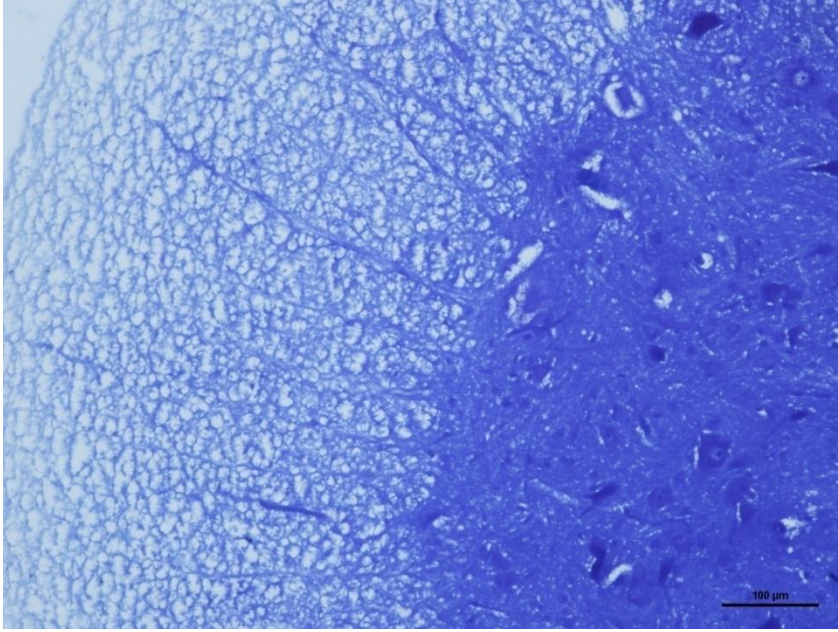
Tablo 17: Kruskal- Wallis testi ile 10. gün Nekroz ve Apoptoz sonuçlarının karşılaştırılması (p< 0,05)

Gruplar	Nekroz Skoru	Apoptotik Hücre
Grup 1(sham)	0	0,33±0,21
Grup 2 (Kord hasarı)	2,33±0,21	11,33±1,33
Grup 3 (Etanercept)	1,17±0,17	4,67±0,56
Grup 4 (Metotrexat)	1,17±0,17	6,5±0,67
Grup 5 (Etan+ Metho)	2,75±0,161	2,38±0,46
p	0,000	0,000

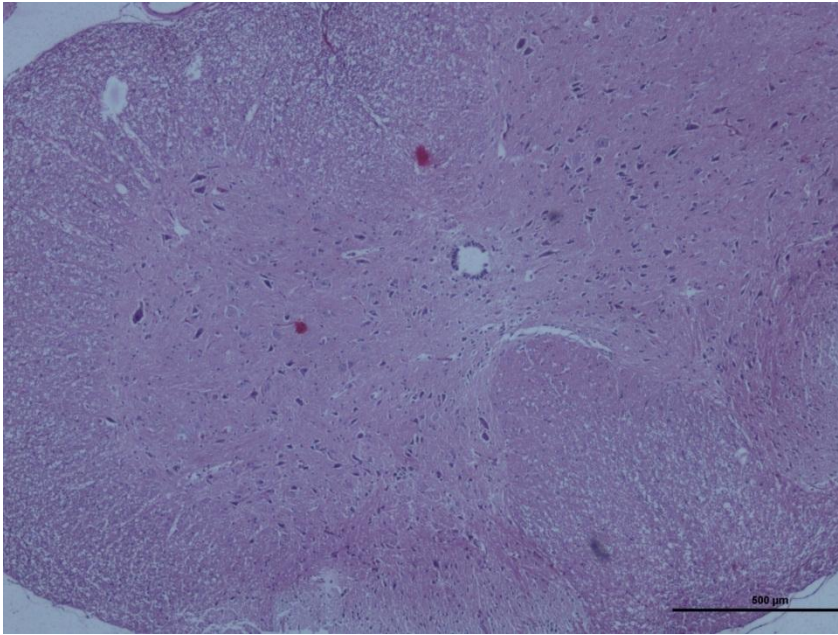


Grafik 7: Mann-Whitney-U testi ile Gruplar arası nekroz ve apoptotik hücre sayısının ikili karşılaştırması

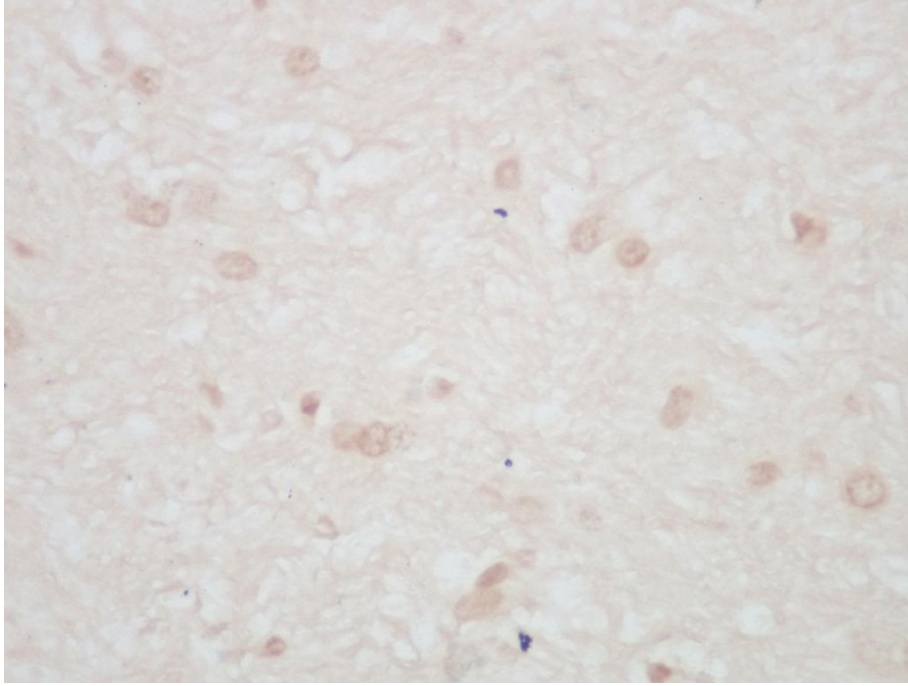
4.1 Işık Mikroskopisi Görüntüleri



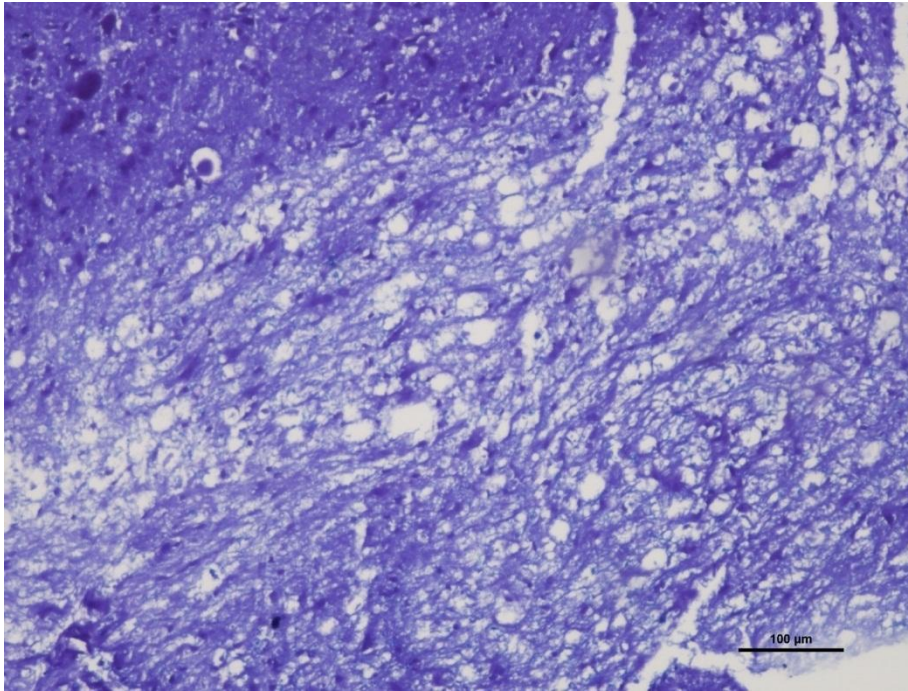
Resim 2: Sham grubuna ait normal medulla spinalis kesiti. Luxol fast blue.



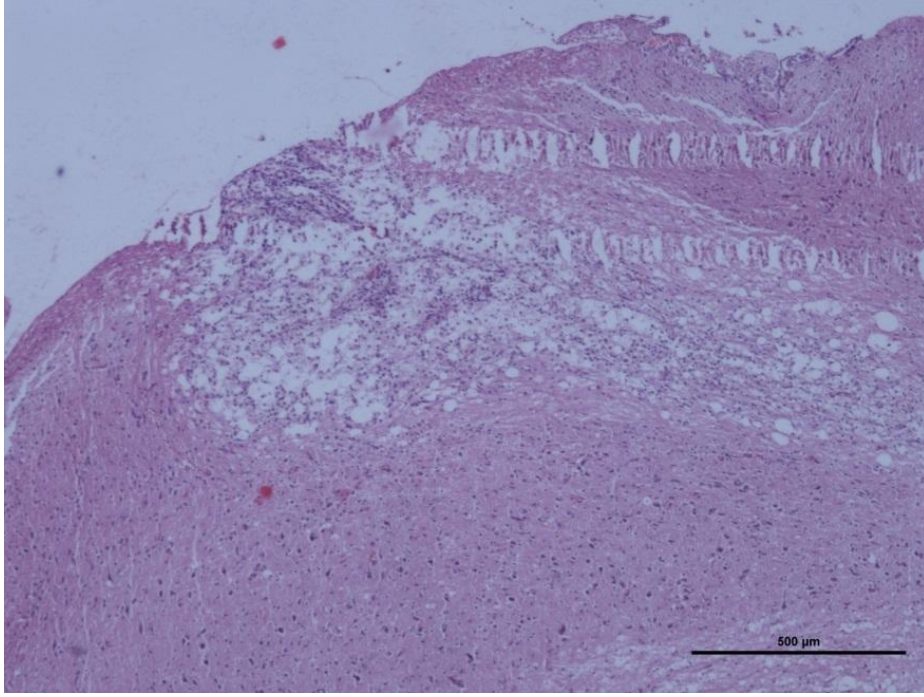
Resim 3: Sham grubuna ait görüntü. Hematoksilen&Eozin



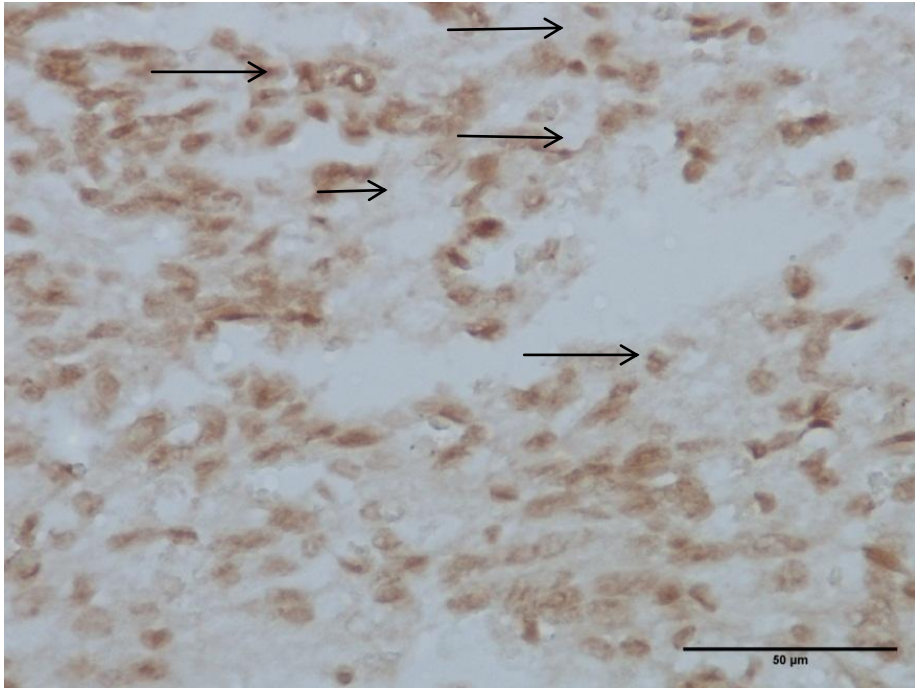
Resim 4: Sham grubuna ait kesitte apoptotik hücreler (→). TUNEL yöntemi.



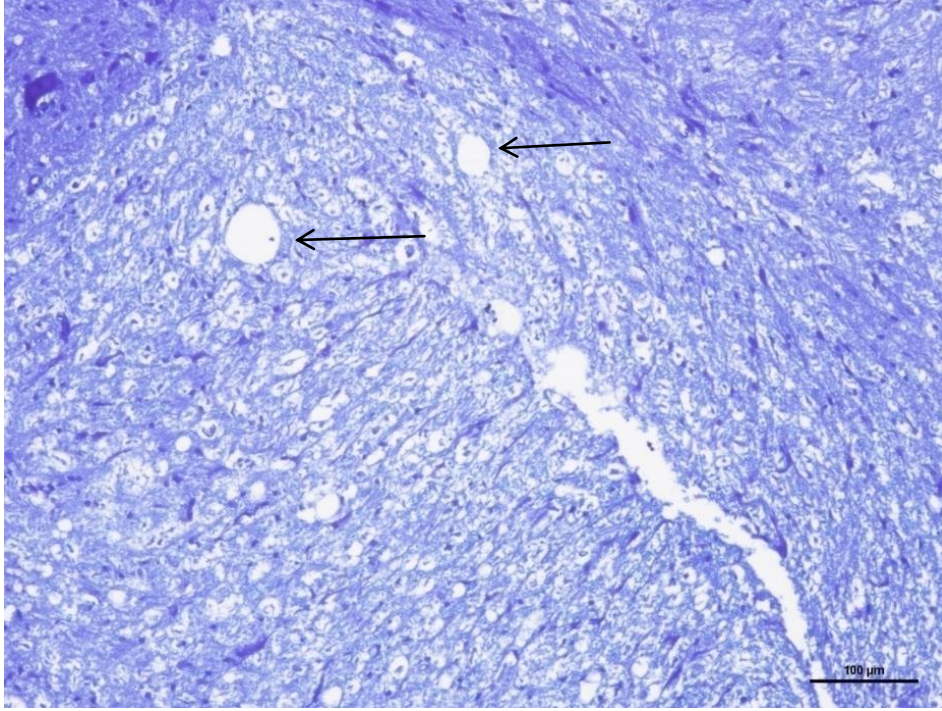
Resim 5: Spinal kord hasarı yapılan gruba ait görüntü. Lezyon alanında doku bütünlüğü kaybı, ödem görülmektedir. Beyaz maddede vakuolize akson yapıları göze çarpmaktadır. Luxol Fast Blue.



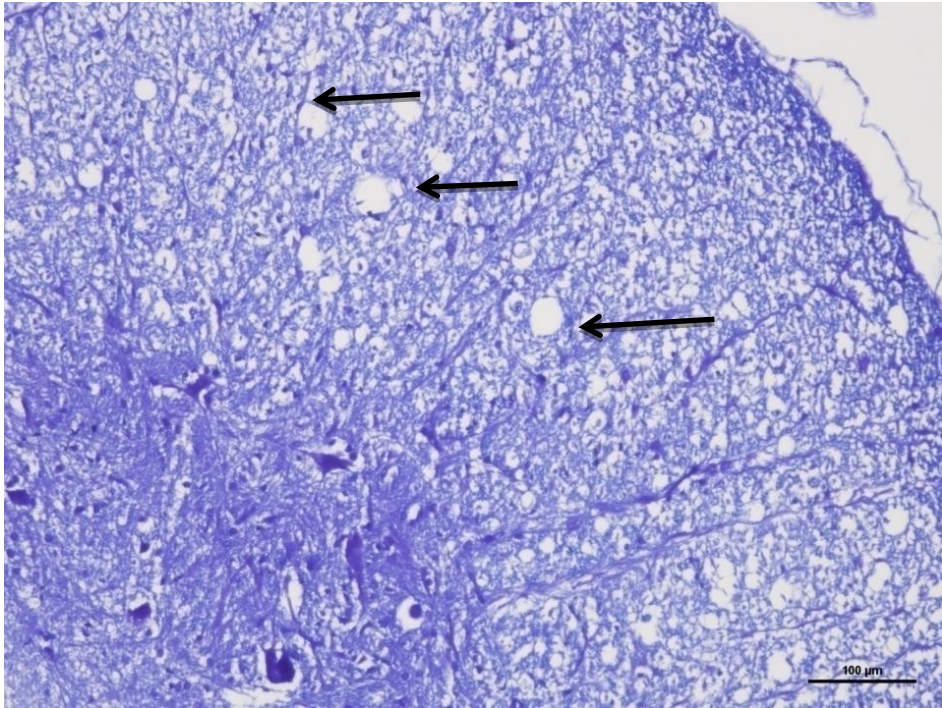
Resim 6: Spinal kord hasarı yapılan gruba ait görüntü. Lezyon alanı-core area bölgesinde doku bütünlüğünün kaybı, ödem, inflamatuvar hücrelerin artışı görülmektedir. Hematoksilen&Eozin .



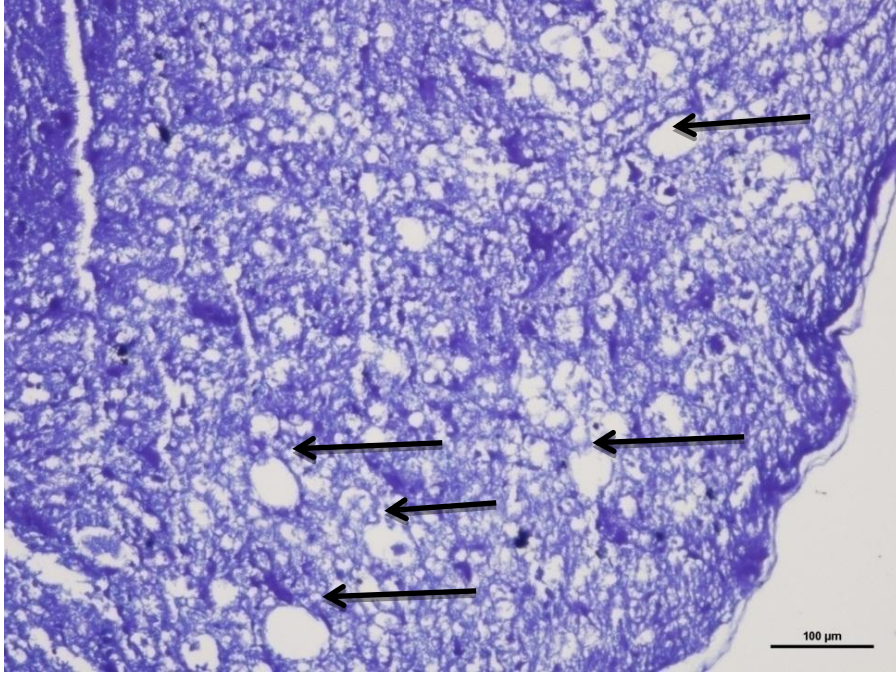
Resim 7: Spinal kord hasarı oluşturulan grupta artmış apoptotik hücreler görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.



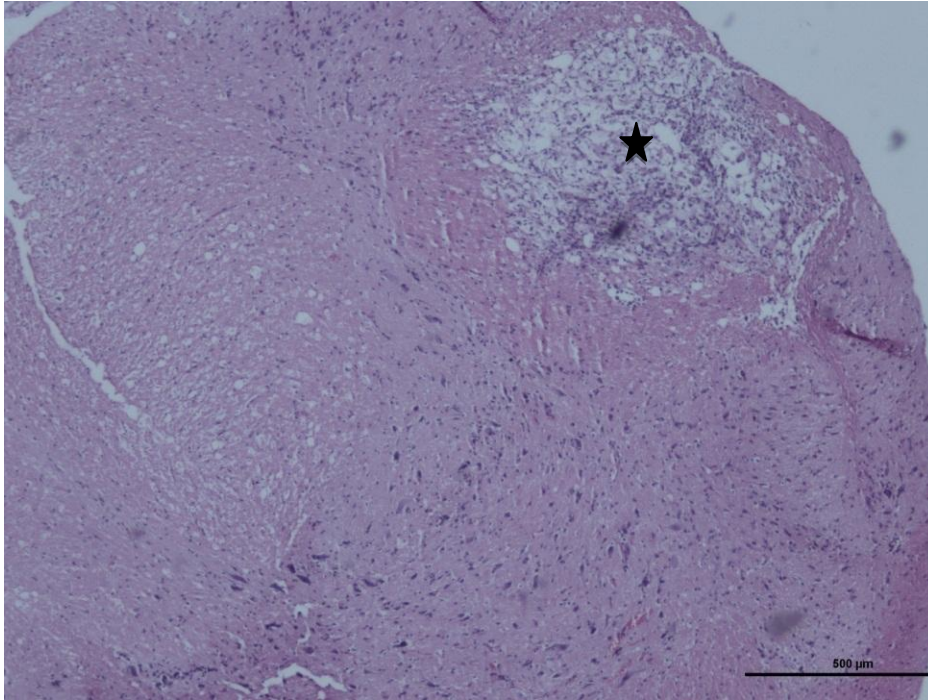
Resim 8: Spinal kord hasarı yapıp etanercept verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.



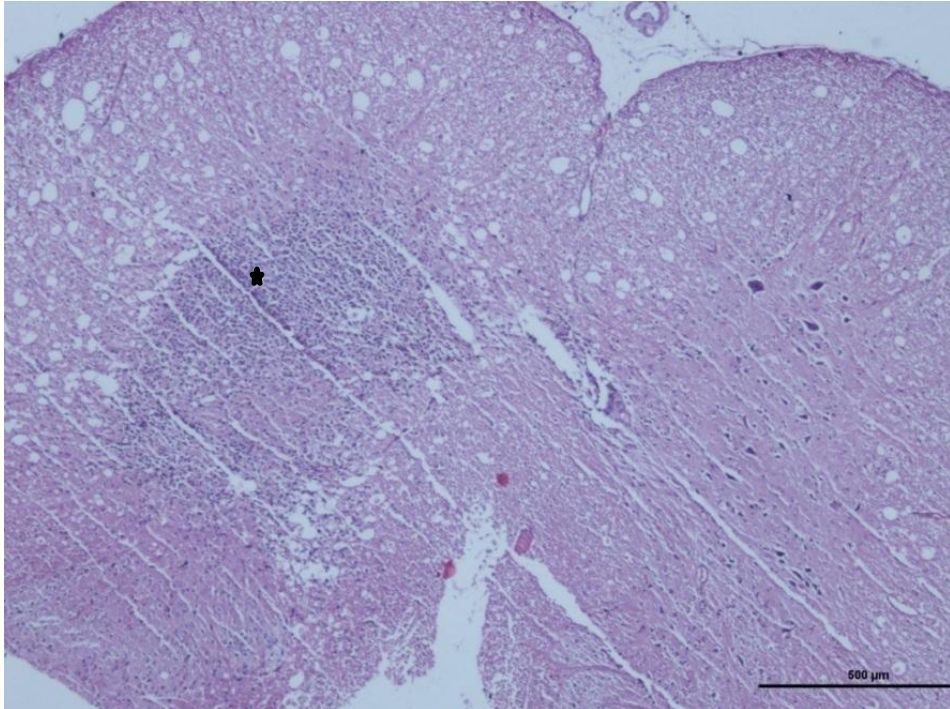
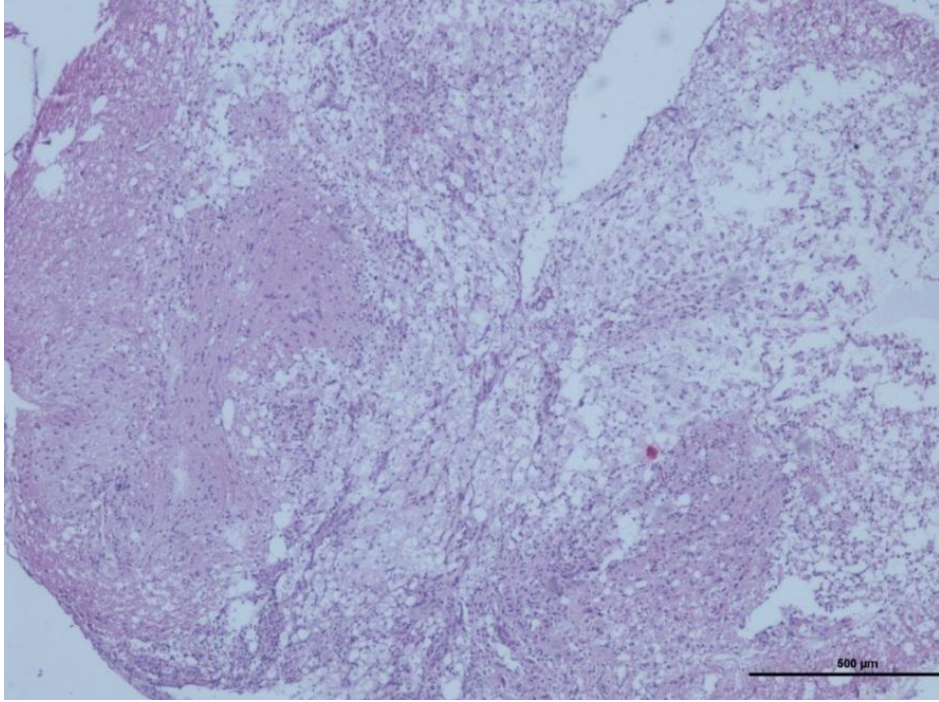
Resim 9: Spinal kord hasarı yapıp mtx verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.



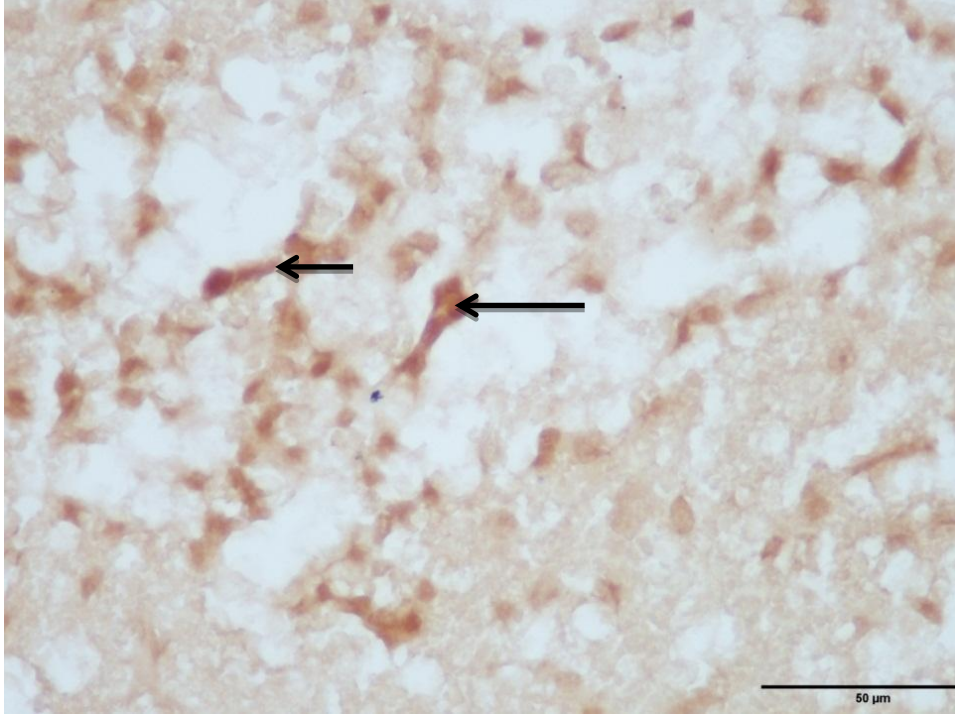
Resim 10: Spinal kord hasarı yapıp eta+ mtx verilen gruba ait görüntü. Myelinli aksonlarda belirgin vakuolizasyon (→) görülmektedir. Luxol Fast Blue.



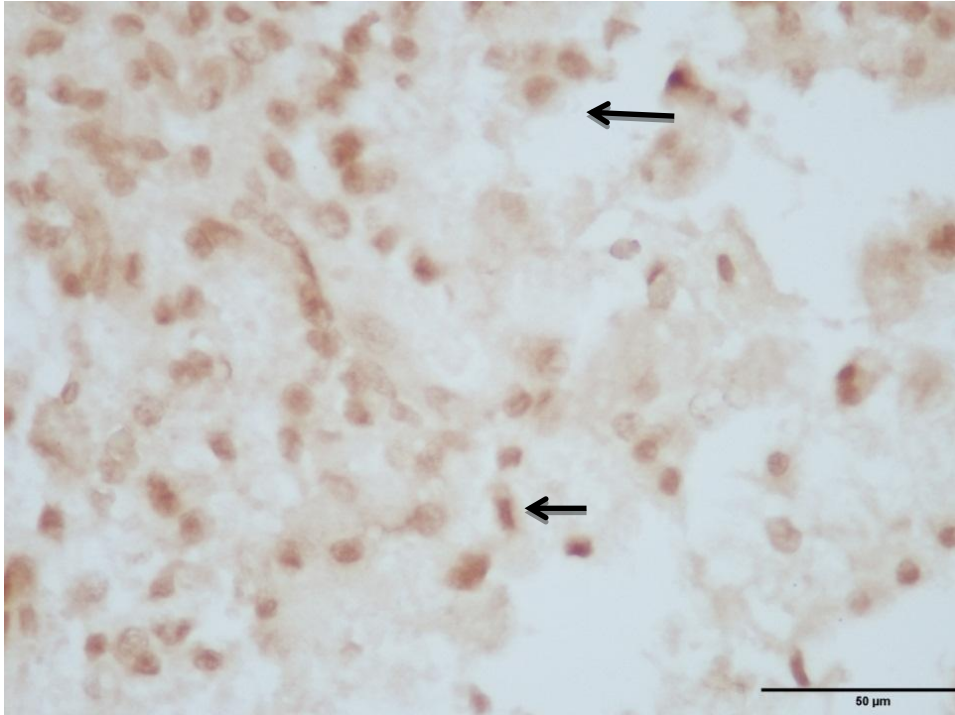
Resim 11: Spinal kord hasarı yapıp etanercept verilen gruba ait görüntü. Lezyon alanı-core area (*) bölgesinin daha sınırlı olduğu görülmektedir. Hematoksilen&Eozin



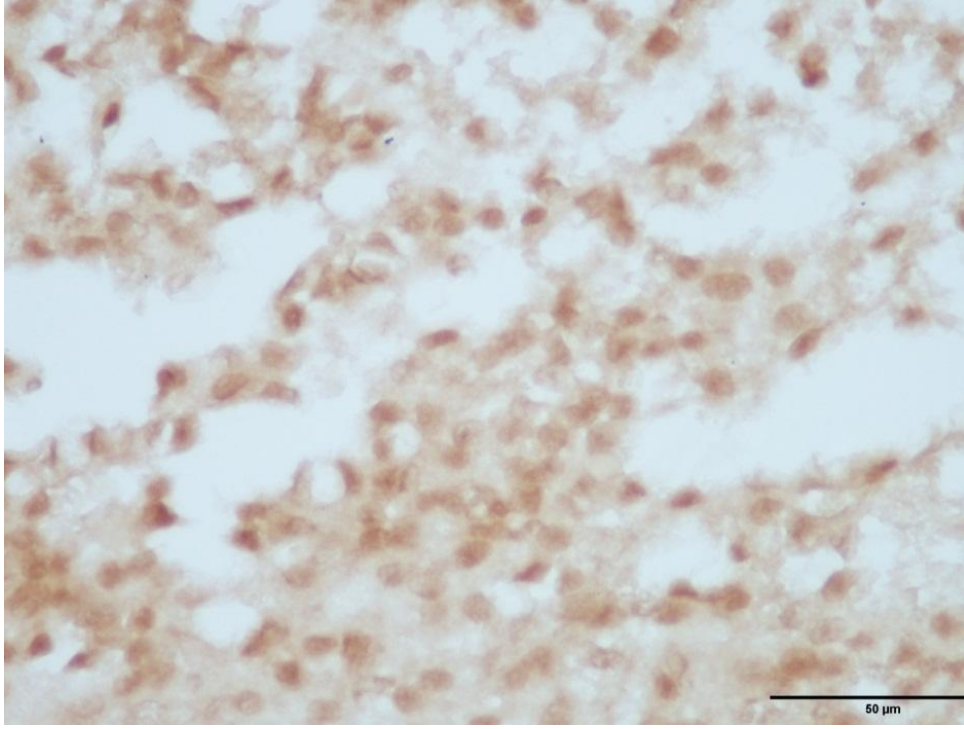
Resim 12: Spinal kord hasarı yapıp etanercept+mtx verilen gruba ait görüntü. Lezyon alanı- core area (*) bölgesinin daha sınırlı olduğu görülmektedir. Hematoksilen&Eozin .



Resim 13: Mtx verilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.



Resim 14: Etanercept verilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.



Resim 15: Etanercept + mtxverilen gruba ait kesitte apoptotik hücrelerin hasar grubuna göre daha az sayıda olduğu görülmektedir (→). TUNEL yöntemi.

5.TARTIŞMA

Travmatik omurilik yaralanması (TOY) ani ve beklenmedik bir şekilde ortaya çıkan; son derece yıkıcı, sakat bırakıcı; kişisel ve toplumsal açıdan yüksek maliyetlere; psikolojik ve sosyolojik sorunlara neden olan felaket bir olay olarak tanımlanabilir.TOY gelişmekte olan ülkelerde öncelikle 18-32 yaş arası erkekleri etkilerken; gelişmiş ülkelerde ise yaşlanan populasyon nedeniyle 65 yaş ve üzeri erkek ve kadınları etkilemektedir. (96)

Gelişen tıbbi bakım hasta morbidite ve mortalitesinin iyileştirmiş olmasına rağmen, nöronal yaralanmanın sınırlanması ve rejenerasyonun uyarılması amacıyla yapılan farmakoterapi deki gelişmeler ise sınırlı olmaya devam etmektedir.(97)

Bugün, omurilik yaralanmasının patofizyolojisi en iyi bifazik (primer ve sekonder) yaralanma modeli ile tanımlanmaktadır. Omurilik yaralanmasının patofizyolojisi akson, kan damarı ve hücre membranlarının hasarına neden olan 'primer mekanik hasar' ile başlar.Primer yaralanma mekanizması kordaki tüm aksonları nadiren tam kesintiye uğratmakta, genellikle yaralanma bölgesini geçen sağlam aksonlar bulunmaktadır. (98) Bu kurtulmuş aksonlar tedavi açısından çok önemlidir ve tedavideki ana hedeftir. Hayvan çalışmaları yaralanma bölgesini geçen %5 kadar sağlam aksonun olması ile nörolojik fonksiyonun kazanılması ya da korunmasının gerçekleşebileceğini göstermiştir. (3,52)

Çalışmalar omuriliğin uğradığı primer travmatik mekanik hasar sonrası saatler içerisinde de, nöronların iyileşemez ve rejenere olamaz şekilde ölmeye devam ettiklerini göstermektedir. (99)

Bu primer mekanik yaralanmanın tetiklediği olaylar zinciri 'sekonder yaralanma' olarak adlandırılmaktadır. Sekonder yaralanmada ise vasküler bozulma, ödem, iskemi, eksitotoksisite, elektrolit dengesizlikleri, lipid peroksidasyonu, serbest radikal üretimi, inflamasyon ve nekroz/geç apoptotik hücre ölümünden oluşmaktadır. (100,101,102). Yaralanma ve enfeksiyona karşı vücudun reaksiyonu özellikle inflamasyondur. SKY sonrası inflamasyonun rolü ayrıntılı bir şekilde tanımlanmıştır, fakat yararlı ve yıkıcı etkileri halen tartışmalıdır. Erken dönem inflamatuvar olaylar arzu edilmezken, geç faz yararlı olduğu düşünülür(103).

Hem insan hem de hayvan çalışmaları, SKY karşı inflamatuvar yanıtın erken fazına katılan ilk hücrelerin nötrofil ve microglial hücreler olduğunu göstermiştir. (104,105,106,107)

Öncü hücreler 12-24 saat içerisinde görülmekte ve yaklaşık 3-5 gün içerisinde nöral ve nöral olmayan dokuda kaybolmaktadırlar (103).

Nötrofil akümülyasyonu ve aktivitesi çok sayıda sitokinler tarafından yönetilmektedir. Bu moleküller arasında TNF-a, IL-1 ve IL-6 sayılabilir.(54) Böylece nötrofiller sekonder yaralanma mekanizmasının modülasyonuna, nötrofil proteazların ve reaktif oksijen moleküllerinin salınımı yoluyla katılmaktadırlar.(108)

SKY sonrası dakikalardan saatlere varan süreç içerisinde bu hücreler aktive olmakta ve makrofajlara dönüşmektedirler. SKY da makrofajlar proinflamatuvar sitokinleri, reaktif oksijen radikallerini, nitrik oksit ve proteazları serbestleştirerek yıkıcı etkiye katkıda bulunmaktadır. (109).Böylece oksidatif stress, hücrelerin lipid komponentlerinin peroksidasyonu gibi, bir çok biyolojik substratın patolojik değişimine neden olmaktadır. Erken infamasyonun sonucu olarak, iskemi, hücresel ve doku ödemi, oksidatif yıkım, myelin degradasyonu, nekroz ve apoptotik değişimler, lezyonun hacmini artırabilmektedirler. (110). Bundan da öte bu değişimler glial skar oluşumuna yol açan inhibitör ve enfeksiyon önleyici çevre oluşturmakta ve başarılı bir rejenerasyonun oluşumunu engellemektedir. (111) Böylece nötrofillerin tüketilmesi yada fonksiyonlarının baskılanması nöroproteksiyon sağlayabilir ve nörolojik iyileştirmeyi düzeltebilir. (112)

TOY da sekonder yaralanmanın önlenmesine yönelik olarak kortikosteroidlerin etkinliğini destekleyen son çalışmalara rağmen; standart tedavi rejiminin bir parçası olarak yaralanma sonrası ilk 8 saat içinde verilen ve 24-48 saat boyunca devam edilen yüksek doz kortikosteroid tedavisi (113,114,115,116)yeniden inceleme altına girmiştir.

Preklinik çalışmalarda kullanılan(117) ve başarı elde edilen tedavi modalitelerinin çoğunun, klinik çalışmalarda sınırlı bir başarı elde etme nedenlerinden biri, sekonder dejeneratif yanıtın karmaşıklığıdır. Çünkü, birçok tedavi sekonder yaralanma mekanizmasının yalnızca bir aşamasını etkilemektedir. Oysa başarılı bir tedavi bu mekanizmanın birçok aşamasında etkili olmasını

gerektirmektedir(117) .Bu nedenle kombine tedavi uygulamaları klinik ve deneysel bazda daha öncelikli düşünölmeye başlanılmıştır. (118).

İnsanlarda ve deney hayvanlarında yapılan çeşitli çalışmalar, açıkça spinal kord yaralanması sonrası Glukokortikoidlerin (GC) fonksiyonel ve rejeneratif iyileşmeyi teşvik ettiklerini göstermiştir. (119,120,121)
Omurilik glukokortikoid duyarlı bir dokudur ve önemli miktarlarda adrenokortikal steroidler için reseptörler içerir. (122,123,124,125,126)

Yapılan çalışmalar makrofaj ve fibroblastların çoğalma, farklılaşma ve fonksiyonlarının glukokortikosteroidler tarafından inhibe edildiğini; bu etkininde interlökin-1, interlökin-6 ve TNF-a gibi sitokinlerin üretim ve salınmasının inhibisyonu ile gerçekleştirdiğini göstermiştir(127). Daha sonra bunu biraz daha ileriye taşıyan , TNF-a nın antagonize edilmesinin uygun bir tedavi stratejisi olduğunu ortaya koyan çeşitli hayvan çalışmaları da yapılmıştır. (128)

Omurilik yaralanması sonrası 1 saat içinde, yaralanma yerinde TNF-a nın sentezi ve/veya salgılanmasında ve reseptörlerinin sayısında önemli bir artış saptanabilmiştir. (129). Benzer şekilde, diğer otörlerde deneysel omurilik yaralanması sonrası ilk birkaç saat içinde TNF-a ve interlökin-1(IL-1), , seviyelerinde önemli ölçüde artışlar olduğuna göstermiştir. (130)

TNF-a nın birçok hücre tipi üzerinde gösterilen iki tür reseptöre; tip 1 TNF reseptörü (P55) ve tip 2 TNF reseptör (P75) bağlandığı gösterilmiştir. TNF-a biyolojik aktivitesi, çözünabilir TNF reseptörleri yoluyla hafifletilebilir. Hayvan çalışmaları, anti-TNF tedavisinin uygulanabilir bir tedavi stratejisi olduğuna dair önemli kanıtlar sağlamıştır. (128)

TNF -a, romatoid artrit gibi birkaç patolojide önemli bir role sahip olduğu; TNF-a bloke edilmesinin Romatoid artritli hastalarda semptomları düzelttiği gösterilmiştir. (131)

Günümüzde, tümör nekrozitan faktörü-alfa aktivitesini azaltmak için mevcut klinik kullanımda olan biyolojik maddeler içinde beş madde yer almaktadır (infliksimab, adalimumab, etanersept, golimumab ve sertolizumab) (132).

TNF antagonistlerinin tedavide kullanılmasının ana hedefi dolaşımda ve inflamasyon bölgesinde TNF fazlasının giderilmesidir. Etanercept TNF aktivitesini compotetif olarak inhibe eder ve hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşimi engeller. Etanersept, İnsan IgG1e bağlı bir rekombinan TNF reseptör protein dimeridir. (118) GK ve etanercept in anti inflamatuvar özellikleri nedeni ile farklı patolojilerin tedavileri için denendiğini görmekteyiz. Literatürde Etanercept ile ilgili olarak özellikle anti romatizmal etkinliği nedeni ile artritik fareler üzerinde anti inflamatuvar etkinliğini ortaya koyan mono ve kombine çalışmalar mevcuttur. Bunlardan yüksek affinite özelliğine sahip, monomerik PEG-ylated tip I TNFR (PEG TNFRI) in artritik sıçanlar üzerinde etkili olduğunu(133) ya da diğer metotreksat, deksmedetomidin ve indometasin ile birlikte kullanıldığında(134,135) ilave yada sinerjistik pozitif etkinin ortaya konduğu çeşitli hayvan deneyleri de vardır.

Ayrıca, farklı hayvan çalışmaları omurilik yaralanmasında Etanercept etkili olduğunu göstermiştir. (136) Genovese ve ark, SKY sonrası 5 mg / kg dozunda etanersept tedavisi ile hem post enflamatuvar reaksiyonun azaldığını hem de motor disfonksiyonun düzeldiğini gösterdiler. (136)

Yine Chi ve arkadaşları SKY ında etanercept tedavisinin nörolojik iyileşmeyi özellikle akut dönemde artırdığını(137); Chen ve ark SKY sonrası oligodendroglia ve nöronlarda apoptozisi ve doku yaralanmasını azalttığını, alt ekstremité lókomotor fonksiyonun düzelttiğini, myelinizasyonu artırdığı(138); Fatih Bayraklı ve ark ise spinal kord parsiyel yaralanma modelinde klinik ve nörofizyolojik iyileşmeyi sağladığını göstermişlerdir. (139)

Yine deneysel hayvan çalışmalarında Chung ve ark Etanercept in kafa travmasına uğratılmış farelerde outcome skorunu olumlu yönde etkilediğini göstermişler(140)

Tüm bunların ötesinde Dinomais ve ark olgu sunumu olarak Th 7 altında paraplejik hastalarına uyguladıkları Etanercept tedavisi ile motor ve duyuusal skorunun belirgin şekilde düzeldiğini idda etmektedirler (141)

Bizim çalışmamızda grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında (Mann-Whitney U Testi) Etanercept uygulanan spinal travma grubundaki iyileşmenin istatistiksel anlamda gerek klinik (eğik düzlem skoru(tablo-6), motor skor(tablo-9), gerekse de histolojik anlamda (nekroz ve apoptoz oranları(tablo-12)), hem travma hem de diğer tedavi gruplarına olan üstünlüğünü açıkça göstermektedir. Bu sonuç da literatürde mevcut diğer çalışmaları desteklemektedir(118,133,134,139)

Metotreksat (MTX) indirek immunsupressif etkileri nedeni ile romatoid artrit (RA), sedef hastalığı ve allogreft reaksiyonu gibi otoimmün durumların tedavisinde düşük dozlarda kullanılmaktadır. (142,143,144).Yüksek doz MTX(initial dose, 50–250 mg/kg over 6-h infusion or bolus administration of 50 mg MTX/m² intravenously) ise farklı tipte neoplazmalar için belirli bir anti-tümör aktivitesine sahiptir ve mol hidatiform, meningeal lösemi, ileri evre non-Hodgkin lenfomaların ve diğer malignitelerin tedavisi için kullanılmaktadır. (86)

MTX, dihydrofolic asit redüktaz inhibe eden bir antimetabolittir ve DNA sentezi, onarımı ve hücrel replikasyona etki etmektedir. (145) MTX, purin / primidine sentezi ya da ; lenfosit proliferasyonunu, nötrofil kemotaksisi ve adheransını baskılamak; T-hücresi apoptozunu aktive etmek; adenosin salınmasını teşvik etmek ve serum Ig seviyeleri azaltmak gibi yöntemlerle proinflamatuvar sitokin üretimini de inhibe ederek ikincil yaralanma mekanizmaları üzerine ayrıca etkisi olabilir(146). Bu çalışmanın ikincil amacı SKY sonrası düşük dozlarda MTX ın bazı sekonder yaralanmaların engellenmesi üzerine yeteneğini ortaya koymaktır. Literatüre baktığımızda spinal kord yaralanması üzerine methotrexatın etkileri konusunda yalnızca Şanlı ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmayı görmekteyiz. (147) Bu çalışmaya göre MTX erken dönem nötrofil infiltrasyonunu ve ilişkili lipid peroksidasyonunun azaltılmasında önemli bir etkiye sahip olduğunu ve bu nedenle travmanın ilk 24 saatinde önemli bir nöroprotektif etkiye sahip olduğunu iddia etmektedirler.

Bizim çalışmamızda grupların ikili karşılaştırmalarına baktığımızda(Mann-Whitney U Testi) ilk günden itibaren travma grubuna göre MTX grubunun gerek klinik (eğik düzlem(tablo-11), motor skor(tablo-12), gerekse de histolojik anlamda (nekroz ve apoptoz skorlarında(tablo-11)), istatistiksel olarak anlamlı derecede MTX lehine

farklılık olduğunu görmekteyiz. Bu sonuç da Şanlı ve ark yaptığı çalışmayı desteklemekte, methotrexatın nöroprotektif etkisini ortaya koymaktadır(139)

Ancak methotrexatın etanercept ile ikili karşılaştırmasına baktığımızda ise gerek klinik (motor ve eğik düzlem skorları) gerekse histolojik (nekroz-apoptizis skorları)olarak istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığını görmekteyiz. Ancak bu karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı olmasa da etanercept lehine bulgular mevcut (tablo-11).

SKY ile ilişkili olarak ortaya çıkan inflasyonun şiddeti ve karmaşıklığı nedeni ile sekonder yaralanma zincirinde tek bir hedefin dikkate alınması inflamasyonun tam inhibisyonuna engeldir.

Etanercept ile eş zamanlı Methotrexat uygulamasının SKY daki terapötik etkisi daha önce değerlendirilmemiştir.

Bu çalışma SKY ında Etanercept + Methorexat kombinasyonunun eş zamanlı kullanımının sinerjik bir etki yaratıp yaratmadığını anlamak için gerçekleştirilmiştir. Literatüre baktığımızda romatizmal hastalıklarda özellikle monoterapiye dirençli olgularda methotrexat +etanercept kombinasyonunun kullanıldığını ve başarılı sonuçlar alındığını görmekteyiz. (148,149,150) Ancak spinal kord yaralanması üzerine literatürde methotrexat +etanercept kombinasyonu üzerine yapılmış herhangi bir çalışma saptanmamıştır. Bizim çalışmamızda klinik olarak değerlendirdiğimiz eğik düzlem ve motor skor sonuçlarına göre travma grubu ile kombine tedavinin uygulandığı grup arasında kombine tedavi grubu lehine istatistiksel farklılığın olduğunu, ancak 10. gün nekroz skorunda bu farklılığın ortadan kalktığını, apoptozis de ise istatistiksel farklılığın travma grubu lehine devam ettiğini görmekteyiz. Gerek methotrexat gerekse etanerceptin monoterapi olarak uygulanan gruplar ile methotrexat + etanercept kombinasyonun uygulandığı grup arasında ise eğik düzlem ve motor skorlar açısından hiçbir istatistiksel farklılığın olmadığı ancak tersine histolojik değerlendirmeler (nekroz-apoptozis) açılarından ise kombine tedavi lehine düşük olduğunu(tablo-11) ve bu düşüklüklerin istatistiksel olarak anlamlı olduklarını görmekteyiz(Tablo-11). Yani çalışmamızda methotrexat +etanercept

kombinasyonundan olumlu yönde sinerjistik bir etkinin klinik olarak ortaya çıkmadığı ancak histolojik olarak bu farklılığın mevcut olduğu görülmektedir. Methotrexat +etanercept kombinasyonunun nekroz ve apoptozisi oranlarını istatistiksel olarak anlamlı oranda baskılayabildikleri, ancak bu farklılığın klinik sonucu istatistiksel anlamda monoterapilerden daha ileriye taşımaya yetmediğini görmekteyiz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneyssel rat spinal kord travmatik yaralanma modeli çalışmamız

1- Her iki monoterapi (grup-3 etanercept, grup-4 methotrexat) gruplarının travma grubuna göre klinik bulgulara istatistiksel anlamda belirgin düzelme ve bu sonuca uyumlu şekilde histolojik bulgulara istatistiksel anlamda (nekroz ve apoptozis) oranlarında belirgin baskılanma sağladığını,

2- Her iki monoterapi gruplarının birbirleri ile karşılaştırmalarında klinik ve histolojik bulgulara göre aralarında istatistiksel anlamda farklılığın olmadığı, ancak etanercept lehine kısmi bir farklılığın olduğunu,

3- Kombine terapi grubunun travma grubu ile karşılaştırılmasında klinik bulgular ve apoptozis açısından istatistiksel anlamda kombine tedavi lehine; mono terapiler ile karşılaştırılmasında ise kombine tedavinin histolojik (nekroz ve apoptozisin baskılanması) olarak istatistiksel anlamda her iki monoterapi grubuna üstünlük sağlamasına karşın klinik anlamda bu farklılığın ortaya çıkmadığını ortaya koymuştur.

Ancak gerek çalışmamızdaki denek sayısının; gerekse literatürde yapılan çalışma sayısının çok sınırlı olması methotrexat + etanercept kombinasyonunun etkilerinin net olarak ortaya konmasına engel olmaktadır. Bu nedenle çok daha fazla sayıda deneyssel ve klinik çalışmanın yapılması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. **Li M, Ona VO, Chen M**, et al: Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. Neuroscience, 99: 333-342, **2000**.
2. **Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian R**: Will improved of the pathophysiological mechanism involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? Current Opinion in Neurology, 15: 713-720, **2002**.
3. **Fehlings MG**, Summary statement: The use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. 26: 55, **2001**.
4. **Schwab ME**: Repairing the injured spinal cord. Science, 295: 1029-1031, **2002.114**.
5. **Tator CH: Fehlings MG**: Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg, 75: 15-26, **1991**.
6. **Hall ED, Wolf DL, M.S**: A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. J Neurosurg, 64: 951-961, **1986**.
7. **Bernhard M, Gries A, Kremer P, Böttiger BW**. Spinal cord injury(SCI) prehospital management. Resuscitation **2005 August**; 66(2): 127-39.
8. **DeVivo MJ, Fine PR, Maetz HM, Stover SL**. Prevalence of spinal cord injury: a reestimation employin life table techniques. Arch Neural **1980**; 37:707-8.
9. **Burke DA, Linden RD, Zhang YP**, Maiste AC, shields CB. Incidence rates and populations at risk for spinal cord injury: a regional study. Spinal cord **2001 may**;39(5):274-8

10. **Kraus JF.** Epidemiological aspects of acute spinal cord injury: a review of incidence, prevalence, causes, and outcome. In: Becker DP, Povlishock JT, eds. Central nervous system trauma status report—1985. Bethesda, Maryland: National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke, National Institutes of Health, **1985**:313-22.

11. **Sekhon LHS, Fehlings MG.** Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* **2001 december** ;26(245):S2-S12

12. **Lynch AC, Antony A, Dobbs BR, Frizelle FA.** Bowel dysfunction following spinal cord injury. *Spinal Cord* 2001;39:193-203, **2001**.

13. **Hitzig SL, Tomack M, Campbell KA, McGillivray CE, Bosch KA, Richards K, Craven BC.** Secondary health complications in aging Canadian spinal cord injury sample. *American journal of physical medicine and rehabilitation* **2008 july**;87(7):545-55.

14. **Savic G, Short DJ, Weitzenkamp D, Charlifue S, Gardner BP.** Hospital readmissions in people with chronic spinal cord injury. *Spinal cord* **2000**;38(6:371-7)

15. **Craig A, Tran Y, Middleton J.** Psychological morbidity and spinal cord injury: a systematic review. *Spinal cord* **2009**;47:108-14.

16. **French DD, Campbell RR, Sabharwal S, Nelson AL, Palacios PA, Gavin-Drecshnack D.** Health care costs for patients with chronic spinal cord injury in the veterans health administration. *Journal of spinal cord medicine* **2007**;30(5):477-81.

17. **Beers, MH, Kaplan, JL, editors.** The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. 18th ed. Whitehouse Station, NJ: Merck Sharp & Dohme Corp; **2006**.

18. **Jackson AB, Dijkers M, Devivo MJ, Pocztatek RB.** A demographics profile of new traumatic spinal cord injuries: change and stability over 30 years. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **2004 november**; 85(11).

19. **Tator CH**, ‘‘Experimental and clinical studies of the pathophysiology and management of acute spinal cord injury’’ J. Spinal cord Med. **1996**; 19: 206-214.
20. **Wilkins Rh**. Neurosurgical Classic. XVIII. J Neurosurg. **1964 Apr**;21:315–347.
21. **Lifshutz J, Colohan A**. A brief history of therapy for traumatic spinal cord injury. Neurosurg Focus. **2004 Jan 15**;16(1):E5.
22. **Anderberg L, Aldskogius H, Holtz A**. Spinal cord injury scientific challenges for the unknown future. Ups J Med Sci. **2007**;112(3):259–288.
23. **Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates**. The father of spine surgery. Spine. **1999 Jul 1**; 24(13): 1381- 1387.
24. **Ohry A, Ohry KK**: Spinal cord injuries in the 19th century. Churchill Livingstone, Edinburg; pp:9–35. **1989**.
25. **Alberstone CD, Naderi S, Benzel EC**. History of spine surgery. In : Benzel EC, editörs. Spine surgery. Techniques, Complication avoidance and management. 2 nd ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; **2005**. p. 1- 21.
26. **Sontag VKH**. History of spinal disorders. In: Menezes AH and Sontag VKH editörs. Principles of spinal surgery. New York: Mc Graw-Hill; **1996**. p. 3- 23.
27. **Pare A. Oeuvres. Paris: 1958. p. 528- 551.**
28. **Allen AR**: Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. Preliminary report. JAMA 57:877–880, **1911**.

29. **İplikçioğlu C.** Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Ed. M.Zileli, Fahir Özer, Omurilik Omurga Cerrahisi, 1.Baskı, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, **1997**: 459–465.
30. **Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W:** Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine* **2002**; 27(14):1504 -1510.
31. **Ohnishi ST, Barr JK, Katagi C, Katsuoka M.** Protection of rat spinal cord against contusion injury by new prostaglandin derivatives. *Arzneimittelforschung*. **1989 Feb**;39(2):236–239.
32. **Xarchas KC, Bourandas J.** Injuries and diseases of the spine in the ancient times. *Spine*. **2003 Jul 1**;28(13):1481–1484.
33. **Ayer, J. B.** Cerebrospinal fluid in experimental compression of the spinal cord. *Arch. Neurol. Psychiat.* **1919**;2, 158-164.
34. **Mcveigh, J. F.** Experimental cord crushes with especial reference to the mechanical factors involved and subsequent changes in the areas of the spinal cord affected. *Arch. Surg.* **1923**;7, 573-600.
35. **Thompson, J. E.** Pathological changes occurring in the spinal cord following fracture dislocation of the vertebrae. *Ann. Surg.* **1923**;78, 260-293.
36. **Craig, W. M.** Pathology of experimental compression of the spinal cord. *Proc. Staf Meeting Mayo Clinic* **1932**;7, 680-692.
37. **Tarlov, I. M., Klinger, H. and Vitale, S.** Spinal cord compression studies: I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. *A. M. A.. Arch. Neurol. Psychiat.* **1953**;70, 813-819.
38. **Pringle, R. G.:** Effects of Injury on the Spinal Cord.Surgery of the Spine. Vol.2. (eds) Findlay, G., Owen, R. Oxford.Blackwell Scientific Publications.**1992**, 9991008.

39. **Tarlov IM:** Spinal cord compression. Mechanism of paralysis and treatment. Springfield III, **1957**;Charles C Thomas.
40. **Rivlin AS, Tator CH:** Regional spinal cord blood flow in rats after severe cord trauma. J Neurosurg 49: 844-853,**1978**.
41. **GreebergM.S.** Spinal Travmalar. Oruçkaptan H.H . Nöroşirurji El Kitabı.6. Baskı,Ankara: Güneş Tıp Yayınevi,: 698-716.
42. **Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body an yahoo education. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918, Newyork Bartleby. com. 2000**
43. **Netter FH:** Beyin ve omurluğun anatomisi, The Netter Collection of Medical illustration Nervous System, Volume 1: Part I: Anatomy and Physiology, Ed: Brass A, Elsevier Saunders, **2007**, pp: 36-66.
44. **Arıncı K, Elhan A.** Anatomi. 3. Baskı,Ankara: Öncü Basımevi,**2001**: 220-251.
45. **Aydoğan S. A. Fahir Özer :** Omuriliğin vasküler anatomisi ve kan akımı, Omurilik ve Omurga Cerrahisi , Ed. M.Zileli, A. Fahir Özer, 2. baskı, Meta Basım, Bornova, İzmir, **2002**, s: 87-90.
46. **Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, et al:** observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. Adv neurol 59:75-89,**1993**.
47. **McDonald JW, Belegu V:** demyelination and remyelination after spinal cord injury. J neurotrauma 23:345-359, **2006**.
48. **Nashmi R, Fehlings MG :** Role of voltage gated K⁺ channels in the pathophysiology of spinal cord injury. Modulator 14:5-9, **2001**.

49. **Nashmi R, Fehlings MG:** mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: with an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. *Brain Res brain Res Rev* 38:165-191, **2001**.
50. **Radiojicic M, Reier PJ, Steward O, et al:** Septations in chronic spinal cord injury cavities contain axons. *Exp Neurol* 196:339-341, **2005**.
51. **Schwab ME, Bartholdi D:** degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76:319-370, **1996**.
52. **Kakulas BA;** neuropathology: the foundation for new treatments in spinal cord injury. *Spinal cord* 42:549-563, **2004**.
53. **Tator CH, Koyanagi I,** vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J neurosurg* 86:483-492, **1997**.
54. **Pineau I, Lacroix S.** Proinflammatory cytokine synthesis in the injured Mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol* 500:267-285, **2007**.
55. **Lucas JH, Wang GF, Gross GW:** NMDA antagonists prevent hypothermic injury and death off mamamalian spinal neurons. *J neurotrauma* 7:229-236,**1990**.
56. **Demopoulos HB, Flam ES, Seligman ML, et al.** Further studies on free radical pathology in the major central nervous system disorders: effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology and chemistry of experimental spinal cord impact injury. *Can J physiol pharmacol* 60:1415-1424,**1981**.
57. **Young W, Huang P, Kume Kick.** Cellular, ionic,and biomolecular mechanisms of the injury process:editörler:Benzel EC, Tator CH. Bölüm 4 sayfa 27-42,**1995**, AANS, İllionis.
58. **Balentine JD:** Pathology of experimental spinal cord trauma. *Lab invest* 39:236-253,**1978**.

59. **Taoka Y, Okajima K:**spina cord injury in the rat.. Prog neurobiol 56:341-358,**1998**.
60. **Giulian D, Robertson C.** İnhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. Ann Neurol 27:33-42, **1990**.
61. **Tator CH, Kaptanoğlu E:**Yaralanmış omuriliğin rejenerasyonu (regeneration of the injured spinal cord). Editörler: M.Zileli, F.Özer, Omurilik ve omurga cerrahisi. İzmir, **2002** :Bölüm:65,sayfa841-866.
62. **Fehlings MG,Tator CH,Linden RD:**the relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials, and spinal cord blood flow. EEG Clin Neurophysiol 74:241-259,**1989**
63. **Carlos TM, Harlan JM:** Leucocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 84:2068-2101,**1994**
64. **Hallenbeck JM, Jacobs TP, Faden AI:**Combine treatment with PGI₂, indomethacin, and heparin improves neurological recovery after spinal trauma in cats. J Neurosurgery 58:749-754,**1983**.
65. **Crowe MJ, Breshnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS:** Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nat Med 1:73-76,**1997**.
66. **Emery E,Aldana P, Bunge MB:** Apoptosis after human spinal cord injury. J neurosurgery 89:911-920,**1999**
67. **Shuman SL, Breshnahan Jc, Beatties MS.** Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. J Neurosci Res 50:798-808,**1997**
68. **Springer JE, Azbill RD, Knapp PE:** Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in spinal cord injury. Nature Med 5:943-946,**1999**.

69. **Keane RW, Kraydich S, Lotocki G, et al:** Apoptotic and antiapoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60:422-429, **2001**

70. **Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, et al:** Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol* 166:213-226, **2000**

71. **Bethea RJ, Nagashima H, Acosta MC:** Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord.

72. **Casha S, Yu WR, Fehlings MG:** FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Exp Neurol* 196:390-400, **2005**.

73. **Casha S, Yu WR, Fehlings MG:** Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 103:203-218, **2001**.

74. **Nagata S, Golstein P:** The fas death factor. *Science* 267:1449-1456, **1995**.

75. **Totoiu MO, Keirstead HS.** Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J Comp Neurol* 486:373-383, **2005**.

76. **Totoiu MO, Nistor GI, Lane TE, et al.** Remyelination, axonal sparing, and locomotor recovery following transplantation of glial-committed progenitor cells into the MHV model of multiple sclerosis. *Exp Neurol* 187:254-265, **2004**.

77. **Norenberg MD, Smith J, Marcillo A:** the pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 21:429-440, **2004**.

78. **Stys PK, Waxman SG, Ransom BR.** Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian spinal CNS white matter: Role of Na⁺ channels and Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger. *J Neurosci* 12:430-439, **1992**.

79. **Hagg T, Oudega M:** degenerative and spontaneous regenerative process after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 23:264-280, **2006**.
80. **Shi X, Semkova I, M  ther SB, Dell S, Kociok N, Jousen AM.** Inhibition of TNF-  reduces laser-induced choroidal neovascularization. *Experimental Eye Research* **2006**; 83: 1325-1334.
81. **Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W.** Bevacizumab (Avastin), a humanized antiVEGF monoclonal antibody for cancer Therapy. *Biochem and Biophys Res Commun* **2005**; 35: 333-328.
82. ENBREL (etanercept) Prospektusu. WYETH İLA  LARI A. . B  y  kdere cad. Maya Akar Center, No:100 –102, Kat:9, 34394 Esentepe-İstanbul.
83. **Fleischmann R, Iqbal I, Nandeshwar P, Quiceno A.** Safety and efficacy of disease-modifying anti-rheumatic agents: focus on the benefits and risks of etanercept. *Drug Saf* **2002**; 25: 173–197.
84. **Sausville EA, Longo DL.** Kanser Tedavisinin Prensipleri. Edit  r: Sa  lıker Y. Harrison İ   Hastalıkları Prensipleri Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul, **2004**: 530-547.
85. **Farber S, Diamond LK, Mercer RD, et al.** Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin) *N Engl J Med.* **1948**;238:787–93.
86. **Jollivet J, Cowan, K.** The Pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Eng J Med* **1999**;309: 1094-1104.
87. **Bodur H.** Romatoid Artrit Tedavisinde Methotreksat ve Leflunomid. *Romatizma*; **2006**;21: 60-66.
88. **O'Dell JR.** Methotrexate, leflunomide, and combination therapies. In: Harris ED, Budd RC, Firestein GS, Genovese MC, Sargent JS, Ruddy S, Sledge CB Kelley's Textbook of Rheumatology. Seventh edition. Philadelphia, Elsevier Saunders, **2005**: 900-919.

89. **Heinle W, Welsh AD.** Experiments with pteroylglutamic acid and pteroylglutamic acid deficiency in human leukemia. *J Clin Invest* **1948**;27: 539.
90. **Sheldon JR, Quintero CE.** Advancements in the Treatment of Psoriasis: Role of Biologic Agents. *J Manag Care Pharm* **2004**;10: 318-325.
91. **Doan T, Massarotti E.** Rheumatoid arthritis: an overview of new and emerging therapies. *J. Clin. Pharmacol* **2005**;45: 751–762.
92. **Wu JJ, Schiff KR.** Sarcoidosis. *Am Fam Physician* **2004**;70: 312–322.
93. **Feagan BG, Alfadhli A.** Methotrexate in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* **2004**;33: 407–420.
94. **Langford CA.** Management of systemic vasculitis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **2001**;15: 281–297.
95. **Fırat T.** Deneysel oluşturulan medulla spinalis zedelenmesinde agmantin, metilprednizolon ve rapamisinin tedavi edici etkilerinin ışık, elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi, uzmanlık tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi İzzet Baysal Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı , Bolu, **2010**, 27-31s.
96. **Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M.** The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord* (2014) **52**, 110–116).
97. **Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A Perri E, Britti D, Cuzzocrea S.** The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol.* **2012 May** **15**;83(10):1413-26.
98. **Mc Donald JW, Belegu V.** Demyelination and remyelination after spinal cord injury. *J Neurotrauma* **2006**; **23**:345-359.

99. **Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S.** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* **2004**; 15:415–36.
100. **Amar P, Levy ML (1999)** Pathogenesis and pharmacological strategies for migrating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurg* 44(5):1027–1039.
101. **Hall ED, Springer JE (2004)** Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx* 1(1):80–100.
102. **Kaptanoğlu E. Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi. Korfalı E, Zileli M.** Temel Neuroşirürji cilt 2. Ankara: Buluş Tasarım ve Matbaacılık, **2010**: 1623,1630-1632.
103. **Hausman ON (2003)** Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord* 41:369–378.
104. **Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ (2010)** Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain* 133(Pt 2):433–447.
105. **Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, Pasquale-Styles M, Dietrich WD, Weaver LC (2006)** The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain* 129(Pt 12):3249–3269 ,
106. **Hamada Y, Ikata T, Katoh S, Nakauchi K, Niwa M, Kawai Y, Fukuzawa K (1996)** Involvement of an intracellular adhesion molecule 1-dependent pathway in the pathogenesis of secondary changes after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 66(4):1525–1531 ,
107. **Mc Tighe DM, Tani M, Krivacic K, Chernosky A, Kelner GS, Maciejewski D, Maki R, Ransohoff RM, Stokes BT (1998)** Selective chemokine mRNA

- accumulation in the rat spinal cord after contusion injury. *J Neurosci Res* 53(3):368–376
108. **Bethea JR, Dietrich WD (2002)** Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol* 15 (3):355-360.
109. **Bethea JR, Castro M, Keane RW, Lee TT, Dietrich WD, Yeziarski RP (1998)** Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J Neurosci* 18(9):3251– 3260.
110. **Conti A, Cardali S, Genovese T, Di Paola R, La Rosa G (2003)** Role of inflammation in the secondary injury following experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg Sci* 47 (2):89–94.
111. **Fitch MT, Silver J (2008)** CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol* 209(2):294–301.
112. **Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johnno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K (1997)** Role of neutrophils in spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 79:1177– 1182].
113. **Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al.** 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.
114. **Bracken MB, Shepard MJ, Collins Jr WF, Holford TR, Baskin DS, Eisenberg HM, et al.** 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.
115. **Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al.** 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. *J Am Med Assoc* 1997;277: 1597–604.

- 116.**Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al.** 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.
- 117.**Ceruti S, Villa G, Genovese T, Mazzon E, Longhi R, Rosa P, et al.** The P2Y-like receptor GPR17 as a sensor of damage and a new potential target in spinal cord injury. *Brain* **2009**;132:2206–18.
- 118.**Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Esposito E, Di Paola R, Muià C, Di Bella P, Meli R, Bramanti P and Cuzzocrea S:** Combination of dexamethasone and etanercept reduces secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Neuroscience* 150: 168-181, **2007**.
- 119.**Gonzalez R, Glaser J, Liu MT, Lane TE, Keirstead HS (2003)** Reducing inflammation decreases secondary degeneration and functional deficit after spinal cord injury. *Exp Neurol* 184:456–463.
- 120.**Gonzalez S, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Saravia FE, Roig P, De Nicola AF (2001)** Glucocorticoid effects on Fos immunoreactivity and NADPH-diaphorase histochemical staining following spinal cord injury. *Brain Res* 912:144–153.
- 121.**Hurlbert, Hurlbert RJ (2006)** Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine* 31:S16–S21; discussion S36.
- 122.**Orti E, Magarinos AM, De Nicola AF (1986)** Evidence of high affinity, stereoselective binding sites for [3H]-aldosterone in the spinal cord. *Neuroendocrinology* 43:404–409.
- 123.**Orti E, Moses DF, Grillo C, De Nicola AF (1987)** Glucocorticoid regulation of glycerol phosphate dehydrogenase and ornithine decarboxylase activities in the spinal cord of the rat. *J Neurochem* 48:425–431.

124. **Marlier LN, Csikos T, Rebaudengo N, Borboni P, Patacchioli FR, Angelucci L, Privat A, Lauro R (1995)** Distribution of glucocorticoid receptor mRNA in the rat spinal cord. *Neuroreport* 6:2245–2249.
125. **Lim G, Wang S, Zeng Q, Sung B, Mao J (2005b)** Spinal glucocorticoid receptors contribute to the development of morphine tolerance in rats. *Anesthesiology* 102:832–837.
126. **Wang S, Lim G, Zeng Q, Sung B, Yang L, Mao J (2005)** Central glucocorticoid receptors modulate the expression and function of spinal NMDA receptors after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 25:488–495.
127. **Caldenhoven E, Liden J, Wissink S, Van de Stolpe A, Raaijmakers J, Koenderman L, Okret S, Gustafsson JA, Van der Saag PT (1995)** Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 9:401–412.
128. **Kapadia S, Torre-Amione G, Yokoyama T, Mann DL (1995)** Soluble TNF binding proteins modulate the negative inotropic properties of TNF-alpha in vitro. *Am J Physiol* 268:H517–H525.
129. **Harrington JF, Messier AA, Levine A, Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A (2005)** Shedding of tumor necrosis factor type 1 receptor after experimental spinal cord injury. *J Neurotrauma* 22:919–928.
130. **Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E (2000)** Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17:203–218.
131. **Bazzoni F, Beutler B (1996)** The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334:1717–1725.
132. **Wallis RS.** Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect Dis* **2008**;8:601-11.

133. **McComb J, Gould T, Chlipala E, Sennelo G, Frazier J, Kieft G, Seely J, Edwards CK 3rd, Bendele A (1999)** Antiarthritic activity of soluble tumor necrosis factor receptor type I forms in adjuvant arthritis: correlation of plasma levels with efficacy. *J Rheumatol* 26:1347–1351.
134. **Bendele AM, McComb J, Gould T, Frazier J, Chlipala E, Seely J Kieft G, Edwards CK 3rd(1999a)** Effects of PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type 1 (PEG sTNF-RI) alone and in combination with methotrexate in adjuvant arthritic rats. *Clin Exp Rheumatol* 17:553-560.
135. **Bendele AM, McComb J, Gould T, Frazier J, Chlipala E, Seely J Kieft G, Wolf J Edwards CK 3rd(1999b)** combination benefit of PGylated soluble tumor necrosis factor receptor type-1 (PEG sTNF-RI) and dexamethasone or indomethacin in adjuvant arthritic rats. *Inflamm Res* 48:453-460.
136. **Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muia C, Bramanti P, Cuzzocrea S (2006a)** Immunomodulatory effects of etanercept in an experimental model of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther* 316:1006–1016.
137. **Chi, LY, Yu J, Zhu H, Li XG, Zhu SG, Li ZZ, Pettigrew LC, Grass D, Hickman JJ, Kindy MS.** Dual neuronal response to tumor necrosis factor- α following spinal cord injury, *Neural Regeneration Research*, **Jun 2010**,5 (12), 917-926.
138. **Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H.** Tumor Necrosis Factor- α Antagonist Reduces Apoptosis of Neurons and Oligodendroglia in Rat Spinal Cord Injury, *Spine*, **Aug 2011**,36 (17),1350-1358.
139. **Bayraklı F, Balaban H, Ozum U.**
etanercept treatment enhances clinical and neuroelectrophysiological recovery in partial spinalcord injury , *European Spine Journal*, **2Dec 2012**,21 (12): 2588-2593.
140. **Chio, Chung-Ching; Lin, Jia-Wei; Chang, Ming-Wen; et al**
Therapeutic evaluation of etanercept in a model of traumatic brain injury .*mJournal of Neurochemistry* , **NOV 2010**,Volume: 115 , Issue: 4 ,Pages: 921-929.

141. **Dinomais, Mickael L; Stana, Laura; Egon, Guy; et al. MAR 2009,** Significant recovery of motor function in a patient with complete t7 paraplegia receiving etanercept, 16th European Congress of Physical and Rehabilitation Medicine Location: Brugge ,Belgium ,Pages: 286-288 .
142. **Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP (2000)** Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology* 47(2–3):247–257.
143. **Hildner K, Finotto S, Becker C, Schlaak J, Schirmacher P, Galle PR, Märker-Hermann E, Neurath MF (1999)** Tumour necrosis factor (TNF) production by T cell receptor-primed T lymphocytes is a target for low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* 118(1):137–146.
144. **Neurath MF, Hildner K, Becker C, Schlaak JF, Barbulescu K, Germann T, Schmitt E, Schirmacher P, Haralambous S, Pasparakis M, Meyer Zum Büschenfelde KH, Kollias G, Märker-Hermann E (1999)** Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 115(1):42–55.
145. **Kieseier BC, Jeffery DR (2010)** Chemotherapeutics in the treatment of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 3(5):277–291.
146. **Xinqiang S, Fei L, Nan L, Yuan L, Fang Y, Hong X, Lixin T, Juan L, Xiao Z, Yuying S, Yongzhi X (2010)** Therapeutic efficacy of experimental rheumatoid arthritis with low-dose methotrexate by increasing partially CD4+ CD25+ Treg cells and inducing Th1 to Th2 shift in both cells and cytokines. *Biomed Pharmacother* 64 (7):463–471
147. **Şanlı AM, Serbes G, Sargon MF, Çalışkan M, Kılınç K, Bulut H, Şekerci Z.** Methotrexate attenuates early neutrophil infiltration and the associated lipid peroxidation in the injured spinal cord but does not induce neurotoxicity in the uninjured spinal cord in rats Received: 14 October 2011 / Accepted: 3 February 2012 / Published online: 22 February 2012 # Springer-Verlag 2012.

148. **Gaubitz, M.; Krause, A.; Lendl, U.; et al** ,Etanercept in Monotherapie or combined with Methotrexat in Patients with rheumatoid Arthritis. Zeitschrift fur Rheumatologie Volume: 72 Supplement: 2 Pages: 112-112 Published: SEP 2013.
149. **Schulze-Koops, H.; Deeg, M.; Runge, C.; et al**. Health-economic assessment of combination therapy for rheumatoid arthritis with methotrexat and etanercept based on the TEMPO Study Zeitschrift fur Rheumatologie, 68(10), Pages: 836-841 , **DEC 2009**.
150. Schnabel, A; Gross, Evidence-based treatment of methotrexat-resistant rheumatoid arthritis. Cytokine antagonists : WL Deutsche Medizinische Wochenschrift ,128(5), Pages: 201-203, **JAN 31 2003**.

EKLER



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı :B.30.2.ABÜ.0.05.05-050.01.04- 253

19/12/2012

Konu: Kararlar.

Sayın; Doç. Dr. Ali Rıza GEZİCİ

A.İ.B.Ü Tıp Fakültesi
Nöroşirurji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi

Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu tarafından 2012/55 no.“ Deneysel rat omuriliği yaralanma modelinde methotrexat- etanercept kombinasyonunun tedavi edici ve koruyucu etkilerinin değerlendirilmesi” isimli çalışmanız etik olarak uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER
(Başkan)
(Çalışmaya dahil)

Prof. Dr. Erol AYAZ
(Üye)

Prof. Dr. Mehmet YAZICI
(Üye)

Prof. Dr. Neriman ŞENGÜL
(Üye)

Doç. Dr. Fatih DEMİRCİOĞLU
(Üye)

Doç. Dr. Alper KARAKAŞ
(Üye)

Doç. Dr. Serkan ÇAKIR
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Eray KEMAHLI
(Üye)

Yrd. Doç. Dr. Orçun TOPTAŞ
(Üye)

Ay. Erol ALTINTAŞ
(Üye)

Orhan BULUT
(Veteriner Hekim)

Adres : Abant İzzet Baysal Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu 14280 Gökçöy / BOLU
Telefon : 0374 253 45 68 Fax : 0374 253 45 59

