



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA TRAVMATİK ALT TORASİK OMURİLİK
YARALANMASINDA İNSAN KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE TEDAVİSİ VE SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serhat CÖMERT

Ankara, 2012



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA TRAVMATİK ALT TORASİK OMURİLİK
YARALANMASINDA İNSAN KAYNAKLI MEZENKİMAL
KÖK HÜCRE TEDAVİSİ VE SONUÇLARININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Serhat CÖMERT

Tez Danışmanı: Doç. Dr Serdar KABATAŞ

Ankara, 2012

Bu tez çalışması 17.01.2012 tarih ve DA 11/24 sayı ile Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Sağladığı üstün imkanlarla, nitelikli bir uzmanlık eğitimi almama olanak tanıyan üniversitemizin kurucusu Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'a, üniversitemiz değerli rektörü sayın Prof.Dr. Kenaz Araz' a ve dekanımız Sayın Prof. Dr. Haldun Müderrisoğlu'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tıp fakültesini bitirip bu zorlu mesleğe atıldığım ilk günden bu yana, hayata bakışımı değiştiren, bana el verip önce insan sonra hekim olmayı öğretene, yanlarında çalışmaktan gurur ve mutluluk duyduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Nur Altınörs'e ve Sayın Prof. Dr. Hakan Caner'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman, her konuda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli ağabeylerim Doç. Dr. Cem Yılmaz'a ve Doç. Dr. Salih Gülşen'e çok teşekkür ederim. Sahip olduğum mesleki bilgi ve becerilerde çok emeği olan Doç. Dr.Serdar Kabataş'a, Doç. Dr. Melih Çekinmez'e, Doç. Dr. Özgür Özdemir'e, Doç. Dr. Orhan Şen'e, Doç. Dr. Tarkan Çalışaneller'e, Doç. Dr. Tufan Cansever'e, Yrd. Doç. Dr. Kadir Tufan'a, Yard. Doç. Dr. Erdinç Civelek'e ve Uzm. Dr. Feyzi Birol Sarıca'ya ayrıca çok teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında her aşamada emeği geçen değerli ağabeylerim Doç. Dr. Serdar Kabataş, Doç. Dr. Cem Yılmaz, ve Doç. Dr. Tufan Cansever başta olmak üzere Kocaeli Üniversitesi KÖGEM Başkanı Sayın Prof. Dr.Erdal Karaöz'e ve Teknisyen Sezai Kölcük başta olmak üzere deney hayvanları araştırma merkezi'nde görevli tüm ekibe yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanması aşamasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Zerrin Yılmaz Çelik'e, Doç. Dr. Canan Yazıcı' ya ve Uzm. Dr. Eylem Akar'a çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım, sevinç ve sıkıntılarımı paylaşan değerli ağabeylerim Uzm. Dr. Erkin Sönmez, Uzm. Dr.Fatih Aydemir ve Uzm. Dr. İlker Çöven başta olmak üzere, Uzm. Dr. Aykan Akar'a, Uzm. Dr. Aydın Gerilmez'e, Uzm. Dr. Berkay Köksoy'a, ve çalışma arkadaşlarım Dr. Fikret Şahintürk'e, Dr.Engin Fidancı'ya ve Dr.Yasin Yetişiğiğit'e teşekkür ederim.

Hayatta bugün bulunduğum yere gelmemde büyük emeği olan, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme ve bu zorlu yaşam koşullarında sürekli yanımda olan, eşim Esra'ya sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Serhat CÖMERT

ÖZET

Travmatik omurilik yaralanması (TOY), yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli bir sağlık sorunudur. Travma sonrası ortaya çıkan fonksiyon kaybı, hem birincil yaralanmaya hem de birincil yaralanmanın tetiklediği ikincil yaralanma mekanizmalarına bağlıdır. Son yıllarda TOY’ nda kök hücre kullanımının umut verici sonuçlar vermiştir. TOY’ nda farklı kaynağı olan nöronal progenitör hücreler (NPC), nöronal kök hücreler (NCS’ler), embriyonik kök hücreler (EKH) veya mezenkimal kök hücre (MKH)’ ler kullanılmaktadır. Biz çalışmamızda, ratlarda travmatik alt torasik omurilik yaralanmasında insan kaynaklı MKH tedavisi ve sonuçlarını inceledik

Çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu’nun izniyle Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi’nde gerçekleştirildi. Toplam 60 adet Sprague-Dawley sıçan 6 gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki deneklere, modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemiyle torakal 9-10 standart omurilik yaralanması oluşturuldu. Travma grubuna omurilik yaralanması oluşturuldu fakat herhangi bir tedavi verilmedi. Tedavi gruplarında travma oluşan bölgelerine insan kaynaklı MKH’ler verildi. Kök hücre tedavisinin inflamasyon derecesi ve fibrozis derecesi ile spinal dural tabakası gösterilerek direkt differensiasyonuna ve fonksiyonel değerlendirme (BBB, Eğik düzlem) üzerine olan etkisinin hiperakut ve akut dönem sonuçları araştırıldı.

Anahtar kelimeler: mezenkimal kök hücreler, travmatik omurilik yaralanması, tedavi

ABSTRACT

Title: Evaluation of human BoneMarrow-MSCs transplantation In Experimental Spinal Cord Injury

Traumatic spinal cord injury (SCI) is a devastating problem of health that results in high morbidity and mortality rates. The loss of function after SCI results from both the primary mechanical insult and the subsequent, multifaceted secondary response. The use of stem cells in the treatment of traumatic SCI in recent years has provided promising results. Different source of cells for transplantation have been used, including neural progenitor cells (NPCs), neural stem cells (NSCs), embriyonic stem cells(ESCs) or mesenchymal stem cells (MSCs). We evaluated the human Bone Marrow-MSCs transplantation in an experimental spinal cord injury model in animals.

All experiments were conducted in the animal laboratory of Baskent University by the approval of Baskent University Animal Care Ethics Committee. A total of 60 adult male Spraque Dawley rats were randomly divided to six groups. A thoracal 9-10 contusion injury was produced by using modified Allen technique in all groups except control group. No medication was administered to the rats in the trauma group. Parts of the human-induced MSCs treatment groups were composed of trauma. Stem cell treatment of spinal dural layer , showing the degree inflammation and fibrosis in direct the differentiation and functional assessment (BBB, inclined plane) the effect on the results of hyperacute and acute phase were investigated.

Key Words: mesenchymal stem cells, traumatic spinal cord injury, treatment

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Epidemiyoloji.....	4
2.3. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi.....	4
2.3.1. Birincil (Mekanik) Yaralanma	5
2.3.2. İkincil Yaralanma.....	5
2.3.2.1. Vasküler mekanizmalar ve endotel hasarı	7
2.3.2.2. Biyokimyasal değişiklikler	8
2.3.2.3. Elektrolit Bozuklukları	15
2.3.2.4. İnflamatuar Cevap	18
2.3.2.5. Apoptoz	19
2.4. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Histopatolojisi	20
2.4.1. Akut Faz	20
2.4.1.1. Erken Akut Faz (2-48 saat).....	20
2.4.1.2. Subakut faz (2-14 gün)	21
2.4.2. Orta Faz (2 hafta-6 ay)	21
2.4.3. Geç Faz (>6 ay).....	21
2.5. İkincil Omurilik Yaralanmasına Yönelik Tedavi Girişimleri.....	22
2.5.1. Kortikosteroidler	22
2.5.2. Gangliozid GM-1 (Sygen).....	23
2.5.3. Tirotropin Salgılatıcı Hormon (TRH)	23
2.5.4. Gasiklidin (GK-11)	24

2.5.5. Nimodipin.....	24
2.5.6. Diğer.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM	27
3.1. Denek Grupları	27
3.2. İnsan Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre Hazırlanışı	28
3.3. Anestezi	30
3.4. Cerrahi İşlem.....	30
3.5. Travmatik Omurilik Yaralanması Oluşturulması	30
3.6. Kök Hücre Uygulanması	31
3.7. Histopatolojik İnceleme Yöntemleri.....	34
3.7.1. Histopatoloji.....	34
3.9. Davranış Analizi	37
3.9.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Lökomotor Değerlendirme Ölçeği	37
3.9.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi	38
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	40
4. BULGULAR	41
4.1. Doku Enflamasyon Düzeyleri.....	41
4.2. Doku Fibrozis Düzeyleri.....	41
4.3. Doku Sinyal Düzeyleri.....	42
4.4. Histopatolojik İnceleme Sonuçları.....	42
4.4.1. Işık Mikroskopisi İnceleme Sonuçları.....	42
4.5. FISH Çalışma Sonuçları	45
4.6. Davranış Analizi Sonuçları	45
4.6.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Lökomotor Değerlendirme Ölçeği	45
4.6.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi	46
5. TARTIŞMA.....	50
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	: Alfa-Amino-3-Hidroksil-5-Metil-4-Isoksazolpropionat
ATP	: Adenozin trifosfat
BBB	: Basso-Beattie-Bresnahan
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
Cl ⁻	: Klor
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAA	: Eksitatör aminoasit
EKH	: Embriyonik kök hücre
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSR	: Glutasyon redüktaz
H&E	: Hematoksilen-eozin
HO ₂ ⁻	: Hidrojen peroksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-6	: İnterlökin 6
K ⁺	: Potasyum
ml	: Mililitre
mmHg	: Milimetre Civa
MKH	: Mezenkimal kök hücre
MMP	: Matriks metalloproteazları
M.Ö	: Milattan Önce
MPSS	: Metilprednizolon sodyum süksinat
M.S	: Milattan sonra
MSS	: Merkezi sinir sistemi

Na ⁺	: Sodyum
NASCIS	: North American Spinal Cord Injury Study
NMDA	: N-metil-D-aspartat
OH ⁻	: Hidroksil radikali
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikal
PGI ₂	: Prostosiklin
ROO ⁻	: Peroksil radikali
SF	: Serum fizyolojik (%0,9 sodyum klorür)
TM	: Trilizad mesilad
TNF- α	: Tumor necrosis factor alfa
TOY	: Travmatik omurilik yaralanması
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormon
TxA ₂	: Tromboksan A ₂
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) bağımlı nick-end labeling
X	: Büyütme

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Travmatik omurilik yaralanmalarında birincil yaralanma mekanizmaları	5
Tablo 2.2. Travmatik omurilik yaralanmalarında ikincil yaralanma mekanizmaları	6
Tablo 2.3. Hücre yapıtaşları için toksik oksijen radikalleri	9
Tablo 2.4. Hücre içi ve hücre dışı antioksidan sistemler	10
Tablo 2.5. Tamamlanmış prospektif, randomize, kontrollü, omurilik yaralanması klinik çalışmaları	26
Tablo 3.1. Basso-Beattie-Bresnahan lokomotor değerlendirme ölçeği ve tanımları	39
Tablo 4.1. Doku Enflamatuvar hücre analiz sonuçları	41
Tablo 4.2. Doku Fibrozis analiz sonuçları	42
Tablo 4.3. Doku sinyal düzeyi analiz sonuçları	42
Tablo 4.4. BBB değerleri	46
Tablo 4.5. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri	47
Tablo 4.6. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Eksitotoksisite ile serbest radikal oluşumu arasındaki ilişki	15
Şekil 3.1.	Total laminektomi (T9-10) sonrasında sağlam omurilik dokusunun görüntüsü	32
Şekil 3.2.	Modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemi ile omurilik travması oluşturulması	32
Şekil 3.3.	Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusunun görüntüsü	33
Şekil 3.4.	Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusuna Hamilton şırınga kök hücre verilmiş görüntüsü	33
Şekil 4.1.	Kontrol grubu. (H&E X200 lük büyütme)	43
Şekil 4.2.	Travma grubu. (H&E X100 lük büyütme)	43
Şekil 4.3.	Akut travma grubu. (H&E X100 lük büyütme).....	44
Şekil 4.4.	Hiperakut travma grubu (H&E X 40 lık büyütme)	44
Şekil 4.5.	FISH çalışması.....	45
Şekil 4.6.	BBB skoru	48
Şekil 4.7.	Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri.....	48
Şekil 4.8.	Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri.....	49

1. GİRİŞ

Travmatik omurilik yaralanması (TOY) neden olduğu morbidite ve mortalite nedeniyle toplumu kötü yönde etkileyen önemli bir sorundur. ABD’de her yıl yaklaşık 12.000 yeni olgu bildirilmektedir. 2008 yılında yapılan istatistiklerde, yaralanma seviyesi ve lezyonun genişliği esas belirleyici faktör olmakla birlikte TOY geçiren hastaların sadece %11,5’i bir yıl sonra iş hayatına geri dönebilmektedir. Şöyle ki yirmibeş yaşında tetraplejik kalan bir hastanın beklenen yaşam boyu maliyeti ise yaklaşık 1.800.000 \$ olarak hesaplanmıştır (1). Günümüzde, teknolojinin ilerlemesi ve motorlu araçların çoğalmasıyla bu tür travmaların insidansı giderek artmaktadır. Genel olarak insidansı milyonda 30-40 ve prevalansı milyonda 906’ dır. Ülkemizdeki durum ise hiç azımsanmayacak düzeydedir. Ülkemizde her yıl 1.800 yeni olgu ortaya çıkmakta, toplam 54.000 kişi omurilik yaralanması (OY) sonucu sakat olarak yaşamlarını sürdürmektedir. Cinsiyet olarak değerlendirildiğinde ise erkeklerde 3-4 kat daha fazla görülür. Yaralanmaların çoğunluğu alt servikal ve torakolomber birleşim bölgelerinde görülür. Tüm çabalara rağmen OY’nda nöroproteksiyon ve omuriliğin rejenerasyonu insanda henüz başarılamamıştır.

OY’nda ilk hasar, dakikalar içinde oluşan ve günler ya da haftalar boyunca devam eden moleküler ve hücresel değişimleri tetikler ve ikincil hasarı oluşturur. En etkin tedavi, ikincil hasarın önlenmesidir. Hasar mekanizmaları sistemik değişikliklerden, bölgesel vasküler olaylara, biyokimyasal değişikliklerden, hücre içi toksik değişikliklere kadar uzanan geniş bir olaylar zinciri içindedir. Santral Sinir Sistemi (SSS)’nde iyileşme ise, sinir kökleri, inen ve çıkan yollar veya hipokampusda gerçekleşen sınırlı bir rejenerasyondan ibarettir. Halen klinik uygulamada; steroidler, gangliozidler, opioid reseptör antagonistleri, antioksidanlar, kalsiyum kanal blokörleri gibi tedavi modaliteleri uygulanmakla beraber etki derecelerinin son derece düşük olduğu da bir gerçektir. Ayrıca OY’nda uzun trakt fonksiyonlarından herhangi birinin korunup korunmadığının belirlenmesi tedavi ve prognoz için önemlidir.

Kök hücre (KH) ise kendini yenileme ve özel hücrelere farklılaşma özellikleri olan *in vitro* ya da *in vitro* uygun koşullarda kan, karaciğer ve kas gibi birçok hücreye dönüşebilen farklılaşmamış öncü hücrelerdir. Temel olarak iki tip KH vardır; embriyonik kök hücreler (EKH) ve mezenkimal kök hücre (MKH). EKH’ler erken evredeki blastositlerden elde

edilmekte, *in-vivo* ve *in-vitro* şartlarda birçok hücre türüne farklılaşma gösterebilmektedir. MKH'ler ise hücrelerin bağ dokularında bulunan, erişkin haldeki KH tipidir. Dokuların destek bölümü olan "stroma hücre"sinin de temelini oluşturmaktadırlar. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon vs. farklılaşabilirler. MKH, bulunduğu dokudan, hasarlı bir dokuya geçebilmekte ve bu sayede hasarlı dokuda doku tamirini sağlayabilmektedir.

Bu projenin amacı deneysel travmaya bağlı alt torasik OY oluşturulan ratlarda, MKH tedavisinin hiperakut ve akut etkilerini lökomotor, histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesidir.

TOY'dan sonra görülen hücre ve fonksiyon kaybı, travma anında ortaya çıkan ilk mekanik hasara ve bu hasarın tetiklediği birtakım yıkıcı olaylar zincirine bağlıdır (2). Travma anında ortaya çıkan ve nöral dokunun kompresyon, kontüzyon ve/veya laserasyonu ile sonuçlanan bu duruma birincil yaralanma denir. İkincil yaralanma ise birincil yaralanmayı takiben dakikalar içinde başlayıp haftalarca devam eden bir süreçtir. Eksitotoksiste, lipid peroksidasyonu, inflamasyon ve apoptoz başlıca ikincil yaralanma mekanizmalarıdır (2-3).

Omurilik yaralanmalarında en etkin tedavi, çarpma etkisiyle başlayan ikincil yaralanmanın önlenmesidir. Bu amaçla birçok sayıda ilaç hayvan çalışmalarında denenmiş ve önemli bir kısmı etkin bulunmuştur (4-9). Etkin bulunan bu ilaçların bazıları klinik çalışmalarda kullanılmış, fakat metilprednizolon dışında klinik kullanıma geçen olmamıştır (16-17). Fonksiyonel düzelmenin izlendiği deneysel çalışmalarda ilaç tedavisi genellikle ya travmadan önce ya da travma ile eş zamanlı olarak verilmiştir. Günlük yaşamımızda ise travma öncesi veya travma ile eş zamanlı olarak tedavi pek mümkün olmadığı için, benzer başarılı sonuçlar elde edilememektedir. Bununla birlikte, tedavi sırasında görülen yan etkilerinden dolayı yüksek doz metilprednizolon tedavisi de günümüzde tartışmalı hale gelmiştir (12).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Omurga ve omuriliği ilgilendiren hastalıkların tanı ve tedavisi hakkındaki çalışmalar antik çağlara kadar uzanmaktadır (18). Omurga ve omurilik yaralanmalarıyla ilgili bilinen ilk yazılı belge, yaklaşık beş bin yıl önce Imhotep (M.Ö 2686-2613) tarafından yazıldığı düşünülen Edwin Smith Papirüsü'dür (18, 19). Bu papirüste toplam 48 adet kafa ve omurilik travması geçirmiş olgudan bahsedilmektedir. Bu olgular tedavi edilebilecek, tedavi edilmeye çaba gösterilmesi gerekenler ve umutsuz olgular olarak sınıflandırılmaktadır. Papirüste bahsedilen tedavisi umutsuz olguların kliniği günümüzde ki komplet omurilik lezyonu tanımına uymaktadır (19).

Hipokrat (M.Ö 460-370) ve Galen (M.S 129-200) dönemine kadar önemli bir gelişme söz konusu değildir (18-22). Hipokrat paraplejiyi tarif etmiş, ancak omurilik fonksiyonunu açıklamaktan daha çok, travma sonrası omurga deformitelerinin düzeltilmesi amacıyla traksiyon uygulanmasını önermiştir (21). Galen ise deneysel olarak kesilen omurilik segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu göstermiştir (22). Ege'li Paul (M.S 625-690) omuriliğe bası yapan kırıkların tedavisinde ilk defa laminektomi yapan hekimdir (20).

Fransız cerrah Pare ise 16. yüzyılda spinal dislokasyonları redükte etmek için tahtadan bir düzenek kurmuştur. Ayrıca bu amaçla insizyon yaparak omurga ve sinirleri öne itmeyi önermiştir (18). Fabricius Hildanus 1646'da servikal fraktür dislokasyonlarda redüksiyon ve traksiyon amacı ile yumuşak dokular ve spinöz çıkıntılara bir çivi takarak klemp ile çekmeyi denemiştir (19). Bu manevranın başarısız olması durumunda ise fragmanların temizlenmesini önermiştir. Louis ise 1762'de lomber bölgeye giren ve paraplejiye yol açan metal bir cismi çıkarmış, operasyon sonrası tam iyileşme bildirmiştir (20).

Omurilik travması ile ilgili ilk patofizyolojik çalışma, 1890'da Schamus tarafından tavşan omuriliğinde travma sonucu gelişen patolojik değişiklikleri inceleyerek yapılmıştır (23). TOY patofizyolojisi zamanla daha iyi anlaşılmış ve deneysel modeller geliştirilmeye başlanmıştır.

1911 yılında Alfred Reginald Allen günümüzde hala en çok kullanılan modellerden birisi olan ağırlık düşürme metodunu tanımlamıştır (24). Köpeklerde laminektomi sonrası omurilik üzerine ağırlık düşürerek kontüzyon tipi omurilik hasarı oluşturmuş ve uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin boşaltılmasının nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını ortaya koymuştur. Bu çalışma daha önce yapılmış olan deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasını sağlamış ayrıca ikincil hasar kavramının da öncülüğünü yapmıştır. 1953'te Tarlov epidural balon kompresyon tekniği ile deneysel omurilik yaralanması modelini tariflemiştir (23). 1978'de Rivlin ve Tator ise ekstradural klip kompresyon tekniği ile deneysel omurilik yaralanması modelini geliştirmişlerdir (23, 25).

2.2. Epidemiyoloji

TOY, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli bir sorundur. ABD'de 2009 yılında yapılan son istatistiklerde yıllık insidans yaklaşık 12.000 yeni olgu -40 olgu/1 milyon nüfus- olarak bildirilmiştir (1, 2). 2008 yılı itibariyle yaklaşık 260.000 TOY hastası bulunmaktadır. Bu hastaların %81'ini erkekler oluşturmaktadır. 2005 yılından önce omurilik yaralanması ile hastaneye başvuranların yaşı 16 ile 30 arasında değişmekte iken 2005 yılından sonra bu yaş ortalama 40,2 olarak bulunmuştur. Etyolojide motorlu taşıt kazaları %42,1 ile ilk sırayı alırken, düşmeler %26,7, darp (şiddet) %15,1 ve spor kazaları %7,6 ile sıkça görülen diğer sebeplerdendir (1).

Ülkemizde yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, yıllık insidans 12.7/1 milyon nüfus olarak bildirilmiştir (26,27). Erkek/Kadın oranı 2.5/1 olarak bulunmuştur. %48,8 ile motorlu taşıt kazaları birinci sırada yer almaktadır. Tetraplejik hastalarda yaralanma en sık C5 seviyesinde saptanırken, paraplejiklerde ise en sık T12 seviyesinde bulunmuştur (26, 27).

2.3. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi

Travmatik omurilik yaralanmalarında, mekanik travma nadiren tam kesiye neden olurken klinik olarak genellikle tam fonksiyon kaybı görülmesi dikkat çekici bir durumdur. Bu

durum birincil (mekanik) yaralanmayla başlayan ve birlikte seyreden ikincil yaralanma teorisinin gelişmesine neden olmuştur (28).

2.3.1. Birincil (Mekanik) Yaralanma

Birincil yaralanma travma anında olan hasardır (2-3). Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon ve rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetler, penetran yaralanmalar omurilik dokusunda ve/veya damarlarında harabiyete neden olurlar. Diğer olası mekanik etkiler, kemik kısımlardan, ligamanlardan veya spinal kanal içindeki hematomlardan kaynaklanan kompresyonu içermektedir. Bu kuvvetler sadece yaralanma esnasında akut olarak değil, kalıcı deformiteye sekonder olarak da omuriliğe kronik süreçte zarar verebilirler.

Birincil yaralanmada bir dizi tek veya kombine mekanik güç mekanizmaları rol oynayabilir (Tablo 2.1). En sık görüleni, çarpma etkisi ve kompresyonun birlikte olduğu yaralanmalardır (3).

Tablo 2.1. Travmatik omurilik yaralanmalarında birincil yaralanma mekanizmaları

Mekanik Kuvvet	Hasar Mekanizması
Çarpma + Devamlı Bası	Patlama kırığı, Kırıklı çıkık, Disk basısı
Çarpma + Geçici Bası	Hiperekstansiyon
Distraksiyon	Hiperfleksiyon
Laserasyon, Tam Kesi	Patlama kırığı, Laminer fraktür, Fraktür dislokasyon, Silah yaralanmaları

2.3.2. İkincil Yaralanma

Omurilikte birincil yaralanma ile tetiklenen ve saatler içinde patolojik metabolik ve biyokimyasal mekanizmalarla ilerleyen sürece ikincil yaralanma denir (2, 28). Allen 1911’de, kısa süreli omurilik travmasına maruz kalan hayvanlarda ilerleyici klinikle birlikte ilerleyici doku hasarı olduğunu bildirmiştir (24). Bu durumun açıklanması için çeşitli patofizyolojik mekanizmalar öne sürülerek ikincil yaralanma kavramı geliştirilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Travmatik omurilik yaralanmalarında ikincil yaralanma mekanizmaları

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi
Kan basıncında kısa süreli hipertansiyon, sonra uzun süreli hipotansiyon
Periferik dirençte azalma
Kalp debisinde azalma

Omurilik Mikrodolaşımında Lokal Vasküler Hasar

Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
Özellikle gri cevherde hemoraji
Mikrodolaşımda kayıp-mekanik, tromboz, vazospazm

Biyokimyasal Değişiklikler

Serbest radikal üretimi
Lipid peroksidasyon
Eksitotoksisite: glutamat
Nörotransmitter birikimi
Endojen opioidler
Katekolaminler: noradrenalin, dopamin
Araşidonik asit salınımı
Eikazanoid üretimi
Prostaglandinler
Sitokinler

Elektrolit Bozuklukları

İntrasellüler kalsiyumda artış
İntrasellüler potasyumda artış
İntrasellüler sodyumda artış

İnflamatuvar Cevap

Serbest radikal üretimi
Aksonal yıkım
Miyelin artıklarının uzaklaştırılması
Sitokinlerin salınımı
Glial hücre aktivasyonu
Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler
Wallerian dejenerasyon

Ödem

Apoptoz

Enerji metabolizmasında kayıp

Azalmış ATP üretimi

2.3.2.1. Vasküler mekanizmalar ve endotel hasarı

Akut omurilik yaralanması sistemik vasküler etkiler ile birlikte ikincil hasara uzanan ani mikrovasküler değişiklikler oluşturur. Bu değişikliklerin ilerleyici karakteri omurilik iskemisini travmadan sonra gittikçe arttırır (2).

1. Sistemik Vasküler Etkiler

Omurilik yaralanmalarında, travmanın şiddeti ve yaralanmanın seviyesi ile orantılı olarak birçok kardiyovasküler ve hemodinamik değişiklikler ortaya çıkabilir. Nörojenik şok denilen tablo gelişebilir. Hipotansiyon (70 mmHg ve altı), bradikardi (40 atım/dak ve altı) ve hipotermi üçlüsünün tespiti ile tanı konulabilir. Nörojenik şokun sebebi, sempatik tonusun azalması ile ortaya çıkan periferik vasküler dilatasyon, anormal vagal uyarıya bağlı gelişen bradikardi ve sonuçta kardiyak çıktının azalması olarak açıklanabilir (29).

2. Lokal Vasküler Etkiler

Omurilik yaralanmalarında direkt mekanik travma etkisiyle bazı arteriyollerde ve venüllerde yırtılma olur. Yapılan anjiyografi çalışmalarında anterior spinal arter gibi büyük damarlarda hatta orta boy arteriyollerde bütünlüğün korunduğu, özellikle kapiller dolaşımın bozulduğu gösterilmiştir (25, 30, 31). Hem deneysel hem de otopsi çalışmalarında en sık görülen histopatolojik bulgu omuriliğin merkezinde özellikle gri cevherde görülen kanamadır. Buna santral hemorajik nekroz denir (32, 33). Mikrosirkülasyondaki bozulma ve santral hemorajik nekroz, saatler içinde ilerleme gösterip yaralanma bölgesinin rostral ve kaudaline doğru yayılır. İskemik alan, hemorajik gri cevhere komşu beyaz cevherde daha belirgindir. Gri cevheri katederek beyaz cevhere ulaşan arteriyollerdeki vazospazm ve tromboz ile ikincil hasar artar (29).

Beyaz cevher perfüzyonu travmadan sonraki beşinci dakikada hızla azalırken, on beşinci dakikadan sonra normale dönmeye başlar. Gri cevherde ise ilk beş dakika içinde birçok hemorajik alan belirir. Perfüzyon travmadan saatler sonra bile yoktur. Lezyon bölgesinde özellikle gri cevherde, omurilik kan akımının ileri derecede azalması is kemi ile sonuçlanır. Travma sonrası omurilik is kemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir (34).

Şiddetli ve üst seviye omurilik yaralanmalarında otoregülasyon tamamen bozulur ve oluşan sistemik hipotansiyon sonrası omurilik kan akımında belirgin azalma olur. Ortalama arter

basıncının 160 mmHg'ye yükseltilmesi omurilik kan akımını arttırmaz ancak yaralanma bölgesinin komşu bölgelerinde hiperemiye neden olur (29).

Yaralanmış omurilik aksonlarının normal aksonlara göre iskemiye toleranslarının daha az olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Omurilik yaralanma derecesi ve posttravmatik iskemi derecesi ile motor ve somatosensoriel uyarılmış potansiyeller arasında lineer ilişkinin olduğunu bildirilmesi, posttravmatik iskeminin akson fonksiyonunun bozulması ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (35, 36).

3. Endotel Hasarı

Posttravmatik iskeminin kesin nedeni halen anlaşılamamıştır. Yaralanmayı oluşturan mekanik travma, vazoaaktif aminlerin salınımı, hemoraji, tromboz, platelet agregasyonu ve endotel hasarı vazospazmı tetikleyebilir (2). Kaptanoğlu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, vasküler endotel hasarının travma şiddeti ile doğru orantılı olarak arttığını bununla beraber ödem, akson, myelin ve nükleus hasarı ile karşılaştırıldığında endotelin yaralanmaya en dirençli yapı olduğunu bildirmişlerdir (37). Glutamat –eksitator bir aminoasit- endotel hasarından sorumlu tutulmaktadır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör blokörlerinin (MK-801, Mg vb) deneysel omurilik yaralanma modellerinde, nöroprotektif etkilerinin olduğu ve endotel hasarını azalttıkları gösterilmiştir (5, 29). Carlos ve Harlan, endotel hasarının aktive olmuş nötrofiller tarafından olduğunu öne sürmüşlerdir (38). Endotel hasarına platelet yapışması, intravasküler platelet agregasyonu ve mikrovasküler oklüzyon eşlik etmesi nedeni ile endotel hasarını azaltmak için antiplatelet ajanlar da denenmiştir (39).

2.3.2.2. Biyokimyasal değişiklikler

1. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller dış yörüngelerinde çiftlenmemiş bir elektron bulunduran kuvvetli reaktif moleküllerdir. Biyolojik dokularda serbest radikallerin en sık kaynağı moleküler oksijen radikalleridir (Tablo 2.3). Normal metabolizma sırasında ortaya çıkabildikleri gibi birtakım çevresel faktörler (radyasyon, antineoplastik ilaçlar vb) de serbest radikal yapımını arttırabilirler (2, 3, 40).

Tablo 2.3. Hücre yapıtaşları için toksik oksijen radikalleri

Oksijen Radikalleri	Sembol
Süperoksit anyon radikali	O_2^-
Hidrojen peroksil radikali	HO_2^-
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikali	OH^-
Peroksil radikali	ROO^-

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada “antioksidan” olarak adlandırılan savunma sistemleri mevcuttur (Tablo 2.4). Antioksidanlar dört şekilde etkilerini oluştururlar:

1. **Toplayıcı etki**; serbest radikallerin tutulması veya daha zayıf bir moleküle çevrilmesi şeklinde etki ederler. SOD, CAT, GPX, GSR bu gruba örnektirler.
2. **Bastırıcı etki**; serbest radikallere bir hidrojen aktararak reaktivitelerini azaltırlar veya inaktif hale gelirler. A, C, E, K vitaminleri bu gruba örnektirler.
3. **Onarıcı etki**
4. **Zincir kırıcı etki**

Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller, enzimatik antioksidan mekanizmalar (sitokrom oksidaz sistemi vb), non-enzimatik antioksidanlar (tokoferol vb) ya da metal bağlayıcılar (seruloplazmin vb) ile inaktive edilerek doku hasardan korunur. Çeşitli sebeplerden ötürü serbest radikaller antioksidan mekanizmalarla etkisiz hale getirilemezlerse, dokular oksidatif strese maruz kalırlar (2, 3). Oksidatif stres hücre metabolizmasında bir takım bozukluklara neden olur.

Bunlar:

- DNA yapısının bozulması
- İntraselüler serbest Ca^{+2} miktarında yükselme
- Hücre membranı iyon transportunun zarar görmesi ve lipid peroksidasyonu

İntraselüler kalsiyum artışı ise hücre içinde nükleaz, proteaz, protein kinaz C, fosfolipazların aktive olmasına ve hücrenin nekrotik ve apoptotik bir sürece girerek ölümüne neden olmaktadır.

Tablo 2.4. Hücre içi ve hücre dışı antioksidan sistemler

Hücre içi	Hücre dışı
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit dismutaz (SOD)
Katalaz (CAT)	Ürat
Glutasyon perosidaz (GPX)	Vitamin A, C, E
Glutasyon redüktaz (GSR)	Seruloplazmin
Vitamin A, C, E, K	Metal bağlayıcılar
Ürat	Transferrin
Tiyoller	Albumin
İndirgenmiş glutasyon (GSH)	Laktoferrin
Ubikinin	

Merkezi sinir sistemi, askorbat, glutasyon ve tokoferol gibi antioksidan mekanizmalara yüksek oranda sahiptir (2). Ancak travma sonrası dokuda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır. Oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitler oluştururlar. Bunun sonucunda daha fazla serbest radikal oluşur (40-42).

İskemi veya travma sonrası:

- Oksijen radikali üreten enzim ve substratların artması
- Mitokondride oksijen radikali yapımı artması
- Doku hasarı sonucu kemotaksis ile toplanan nötrofillerden kaynaklanan serbest radikallerin artması
- SOD gibi antioksidan mekanizmaların inaktive olmaları sonucu oksidan-antioksidan dengenin bozulması

Sinir hücresi membran lipidlerinin kolesterol ve doymamış yağ asitlerinden zengin olması, SOD, GPX ve özellikle katalaz enzimlerinin nöral dokuda az miktarda bulunması, nöronların çok sayıda lizozom içermesi, demir miktarının fazla olması ikincil yaralanmanın merkezi sinir sisteminde daha belirgin olmasına yol açar (2, 3, 40).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olaylar topluluğu olarak açıklanabilir. Hücre membranı ve hücre organel membranlarının yapısal matriksi polar bir baş ve ikili kuyruktan oluşan fosfolipidlerden ibarettir. Serbest radikalın, lipid molekülünden bir hidrojen alması sonucu lipid radikali ortaya çıkar. Lipid radikali ortamdaki oksijen ile reaksiyona girip lipid peroksil radikaline dönüşür. Bu bir serbest radikal gibi davranıp başka bir lipid molekülünden bir hidrojen çeker ve sonuçta bir lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid radikali oluşur. Bu reaksiyonlar zinciri sürüp gider ve hücre membranında hasar oluşur (41, 42).

Steroid, siklosporin-A, vitamin E ve selenyum gibi maddeler serbest radikal tutucu etkilerinden ötürü deneysel TOY modellerinde etkin bulunmuşlardır (79, 80) . Kaptanoğlu ve arkadaşları ise melatonin, meksiletin, eritropoetin, tiopental ve propofol gibi ajanların deneysel TOY modellerinde lipid peroksidasyonunu önlediklerini ve ultrastrüktürel koruma sağladıklarını göstermişlerdir (4-8).

2. Eksitatör Aminoasit Birikimi ve Eksitotoksisite

Omurilik yaralanması sonrası eksitatör aminoasitlerden (EAA) glutamat ve aspartat dakikalar içinde hızla yükselir. Yapılan çalışmalar eksitatör aminoasitlerin neden olduğu geç doku hasarında glutamat reseptörlerinin önemini vurgulamışlardır (43).

Glutamat santral sinir sisteminin en önemli eksitatör nörotransmitteridir. Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, duyu ve sinaptik bağlantıların plastisitesinin sağlanması gibi birçok nörolojik fonksiyonda görev alır. Glutaminerjik sinir uçlarında, mitokondriyal bir enzim olan glutaminaz aracılığıyla glutaminden sentezlenir ve ATP gerektiren bir işlemle presinaptik veziküllere taşınarak burada depolanır. Hücre membranının depolarizasyonu, presinaptik sinir uçlarındaki veziküllerden sinaptik aralığa kalsiyum iyonuna bağımlı bir süreçle glutamat salınmasına yol açar. Sinaptik aralığa salınan glutamat, postsinaptik uça bulunan spesifik reseptörleri aktive ederek, etkilerinin

ortaya çıkmasını sağlar. Normal koşullarda sinaptik aralığa salınan glutamat, sodyum iyonuna bağımlı, yüksek afiniteli glutamat geri alım taşıyıcıları aracılığıyla hızla ortamdaki uzaklaştırılır. Bu taşıyıcılar nöron ve glial hücrelerin membranlarında bulunurlar. Glial hücre içine alınan glutamat, glutamin sentetaz enzimi aracılığıyla glutamine dönüştürüldükten sonra tekrar glutaminerjik sinir uçlarına gönderilir (44).

Herhangi bir sebeple bu dengenin bozulması ve glutamatın sinaptik aralıkta birikmesi sonucu glutamat reseptörlerinin yüksek düzeyde uyarılması ile karakterize bu duruma “eksitotoksisite” denir. Aşırı glutamat birikiminin sebebi, hücre membran polarizasyonuna bağlı olarak sinaptik veziküllerden glutamat salınımının uyarılması ve ATP yetmezliğine bağlı olarak glutamat geri alım mekanizmalarının çalışmaması olarak açıklanabilir (45).

Eksitotoksisite inme, travma ve çeşitli nörodejeneratif hastalığın ortak final yoludur. Deneysel omurilik yaralanmasında da hasardan sonra on beş dakika içinde eksitator nörotransmitter düzeyinin toksik düzeye ulaştığı gösterilmiştir (46-48).

Glutamat farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik yapıya sahip bir dizi spesifik reseptör aracılığıyla etki eder. İki grup glutamat reseptörü vardır (44).

1) Metabotropik reseptörler: Uyarılmaları sonucu guanin nükleotid bağlayıcı protein (G protein) üzerinden etki gösteren ve ikincil mesajcı seri reaksiyonunu aktive eden, protein fosforilasyonu ile hücre metabolizmasını etkileyen reseptörlerdir.

2) İyonotropik reseptörler: Ligand kapılı iyon kanallarıdır. Bu reseptörler, kendilerini selektif olarak aktive eden bileşiklere göre üç alt tipe ayrılırlar.

a) *N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri:* NMDA reseptörleri, hipokampus ve kortekste daha yüksek olmak üzere, memeli beyin ve omuriliğinde yoğun olarak bulunmaktadır. Hem glutamat, hem de glisin için bağlanma yerine sahip, kompleks yapıda reseptörlerdir. Aktive olabilmeleri için hem glutamatın, hem de glisinin reseptöre bağlanmış olması gerekir (46).

Ayrıca spermin ve spermidin gibi poliaminler için de bağlanma bölgesine sahiptirler. Poliaminler bu reseptörlerin aktivasyonunu arttırırlar. Magnezyum iyonu tarafından voltaja bağımlı olarak bloke edilirler.

NMDA reseptörü, diğer glutamat reseptörlerinin aksine ancak yüksek güçte sinaptik giriş ile aktive olur ve uzun süreli repolarizasyon sağlar. Ayrıca hücre içine sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) geçişinin yanında kalsiyum (Ca^{++}) geçişine de imkan veren bir katyon kanalını da kontrol eder. İskemi veya travma gibi patolojik süreçlerde NMDA reseptörlerinin uzamış ve/veya yüksek düzeyde uyarılması hücre içi Na^+ ve Ca^{++} konsantrasyonlarının artmasına sebep olur (47, 48).

b) Alfa-Amino-3-Hidroksil-5-Metil-4-Isoksazolproprionat (AMPA) reseptörleri: GluR1-4 diye adlandırılan 4 subunitin ikişerli kombinasyonundan oluşurlar. Esas olarak sodyum iyonu geçişine aracılık ederler. Ancak GluR2 subunitini içermeyenler kalsiyum iyonuna da son derece geçirgendirler. Aktivasyon sonucu Na^+ hücre içersine girer, K^+ ise hücre dışına çıkar. AMPA reseptör aktivasyonu ile erken dönemde hücre içinde Na^+ birikerek sitotoksik ödem ve intrasellüler asidoz oluşmasına yol açar (49).

AMPA reseptörleri eksitotoksisteki etkilerini, depolarizasyon oluşturup voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını açarak, sodyum-kalsiyum pompasının işleyişini tersine çevirerek gösterirler (50).

c) Kainat reseptörleri: Çok iyi incelenememişlerdir. KA1-2 subunitleri vardır.

Eksitator aminoasit nedenli nörotoksiste iki safhada oluşmaktadır (46, 51). Erken dönemde patolojik süreçle başlayan glutamatın iyonotropik reseptörleri uyarmasıyla hücre içine hızlı Na^+ akışı olur. Bunu pasif olarak hücre içine su girişi izler ve akut hücresel şişme ile hücre ölümü oluşabilir. Geç dönemde ise özellikle NMDA reseptörünün yüksek oranda ve/veya uzamış uyarımıyla hücre içine Ca^{++} akışı olmakta ve Ca^{++} 'un neden olduğu otodestruktif olaylar zinciriyle hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Glutamatın aşırı salgılanması ya da geri alınımının aksaması sonucu, hücre içinde Ca^{++} 'un aşırı birikmesi, lipazlar, proteazlar ve endonükleazlardan oluşan enzimlerin yüksek oranda aktive olmasına neden olur. Yine protein kinazların aktivasyonu ile membran kanallarının ve reseptörlerinin fonksiyonları bozulur. Proteazların aktivasyonu ile hücre iskeletini oluşturan ve plazma membranının bütünlüğünü sağlayan yapılar yıkılır, ortamda fosfolipidler ve özellikle araşidonik asit başta olmak üzere serbest yağ asitleri birikmeye başlar (46-48).

Sonuçta, lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin etkisi ile bu yıkım komşu nöronal ve glial hücrelere zarar vererek zincirleme reaksiyonlar halinde devam eder (Şekil 2.1) .

3. Nörotransmitter Birikimi

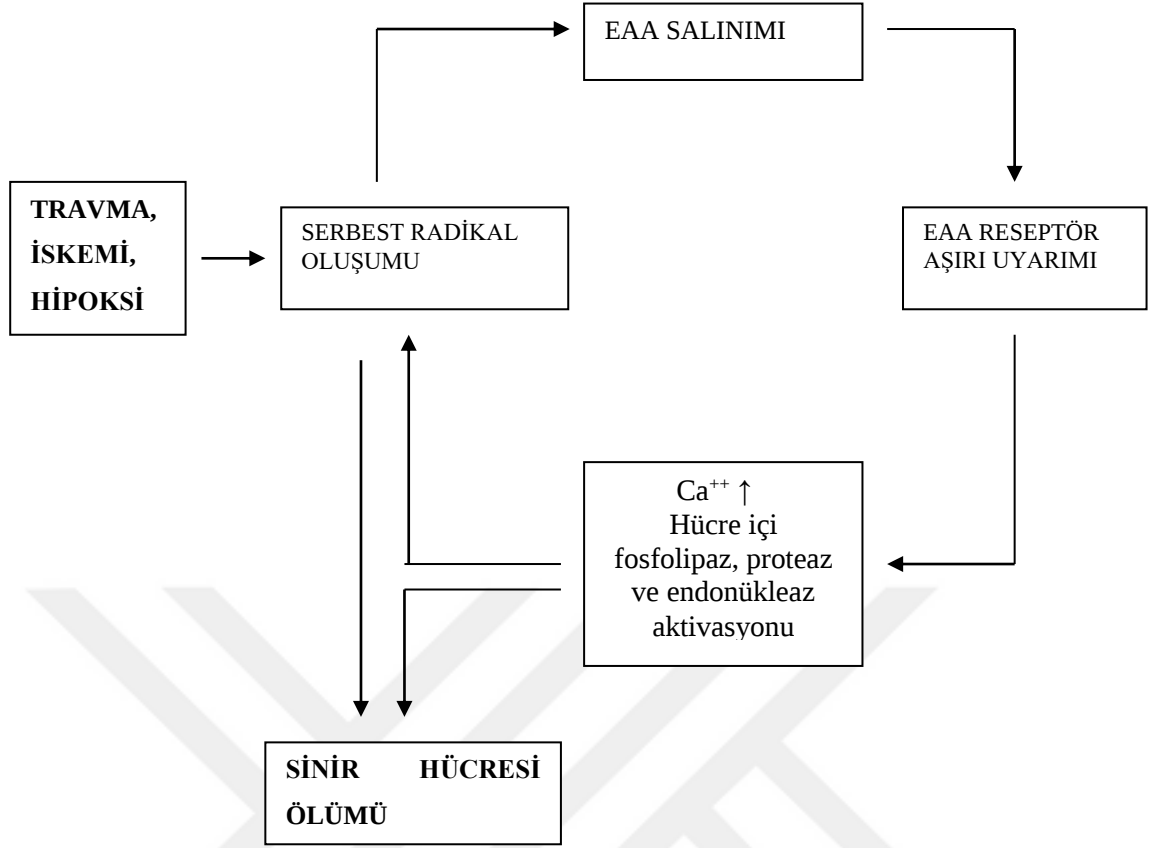
Omuriliğin inen liflerindeki sempatik sinir uçlarından salgılanan dopamin, serotonin ve norepinefrin en önemli vazoaktif etkili nörotransmitterlerdir. Bu maddelerin omurilik yaralanmalarında yüksek oranda salınımı, vazospazma ve ikincil yaralanmada kötüleşmeye neden olur (3, 52, 53).

4. Endojen Opioidler

Beyin ve omurilikte yoğun şekilde bulunan endojen opioidler fizyolojik şartlarda kan basıncı, ısı regülasyonu, cinsel aktivite, hafıza ve en önemlisi ağrı modülasyonunda görev alırlar. Üç grup altında incelenirler; Endorfinler (alfaendorfin, betaendorfin), Enkefalinler (metenkefalin, löenkefalin) ve Dinorfinler (dinorfin A ve B, neoendorfin alfa ve beta). Yapılan çalışmalarda omurilik yaralanmaları sonrası beta endorfin düzeylerinin arttığının gösterilmesi, dinorfin A düzeyinin travmanın şiddetiyle direkt ilişkili olduğunun savunulması ve yüksek dozda opioid reseptör blokeri –naloksan- verildiğinde nörolojik tabloda ve kan akımında düzelme gözlemlendiğine yönelik yayınların olması bu alana olan ilgiyi arttırmıştır (3, 54).

5. Araşidonik Asit Salınımı ve Eikasonoid Birikimi

Omurilik yaralanmasında, mekanik yaralanmadan hemen sonra hücre içi kalsiyum artışı ve hasar bölgesinde inflamasyon ile fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazlar membran fosfolipidlerini yıkarak araşidonik asit oluşumuna neden olurlar. Araşidonik asit lipooksijenazlar ile yıkıldığında lökotrienler ortaya çıkar. Siklooksijenazlar ile yıkıldığında ise prostaglandinler, prostasiklin (PGI₂) ve tromboksan A₂ (TxA₂) ortaya çıkar. Araşidonik asit ürünlerinin tümüne birden “eikasonoidler” denir. Travma sonrası araşidonik asit yıkım zincirinin son ürünleri vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu ile lokal iskemiye ve inflamasyona neden olurlar. Bunun sonucunda serbest radikal oluşumu artar ve lipid peroksidasyonu hasarın derinleşmesine neden olur (3, 55, 56).



Şekil 2.1. Eksitotoksisite ile serbest radikal oluşumu arasındaki ilişki

2.3.2.3. Elektrolit Bozuklukları

Hücrel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için, hücrenin intrasellüler ve ekstrasellüler Na^+ ve K^+ gradientlerini dengelemesi gerekir. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonu ekstrasellüler alandan 12 kat daha düşükken, K^+ konsantrasyonu 50 kat daha yüksektir. Bu elektrokimyasal gradientin devamı, bariyer işlevi gören sağlam bir hücre membranını ve bu membrana bağlı bir enzim olan $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ 'ın normal aktivitesini gerektirir (57, 58).

$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ pompası aktif olarak sodyumu ekstrasellüler sıvıya, potasyumu ise intrasellüler bölgeye pompalar. İskemi sonucu dokuda ortaya çıkan enerji yetersizliği ile hücre membranlarından salınan serbest yağ asitleri ve serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonu sonucu $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ aktivitesi düşer. $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ aktivitesinin omurilik yaralanmasından beş dakika sonra düştüğü ve bu düşüşün bir hafta sonra bile devam ettiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (57, 58). Bu enzimin aktivitesinin düşmesi veya durması, sodyumun hücre içine girmesine, potasyumun da hücre dışına

ıkmasına yol açar. Hücre içine giren sodyum iyonu, klor (Cl-) iyonunu ve suyu da beraberinde içeri çeker; böylece akut hücre imesi olur. Daha ileri aşamalarda ise, değişen membran polarizasyonu, kalsiyum iyonunun hücre içine girmesine ve eksitator aminoasitlerin sinaptik veziküllerden salınmasına yol açar.

Bütün hücrelerde kalsiyum iyonları; hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunması, membran eksitabilitesi, ekzositoz ve sinaptik aktivite gibi sayısız yaşamsal süreçlerin devam ettirilebilmesi için kullanılmaktadır. Normal nöronal fonksiyonların düzenlenmesinde kalsiyum iyonunun bu önemli rolünden ötürü, nöronlar kalsiyum iyonlarının hücre içindeki lokalizasyonlarını ve serbest sitoplazmik konsantrasyonlarını sıkı bir biçimde kontrol altında tutmak için mekanizmalar –hücre içine kalsiyum girişi, kalsiyum tamponu, internal kalsiyum depoları, hücre dışına kalsiyum ıkıı ve intrasellüler kalsiyum diffüzyonu- gelitirmilerdir. Bu mekanizmaların tümü hücre içi kalsiyum seviyelerinin, hücre dışına göre 100.000 kat düşük olmasını sağlamaktadır (2, 3).

1. Potasyum Kanalları

Omurilik yaralanmasından sonra subpial bölgede kalan aksonlarda fonksiyonel ileti bozulur. Bu aksonlarda refraktr periyod uzar, yüksek frekanslı ileti bozulur, aktivasyon eşiği yükselir, ısı bağımlı ileti bloğu olur ve ileti azalır. Hızlı aktive olan K⁺ kanalları myelin tarafından sarılmış olarak paranodal ya da internodal bölgelerde yerlemitir. Miyelin yaralandığında hızlı potasyum kanallarının aktivitesi artar, membran potansiyeli potasyum denge potansiyeline yaklaşır ve aksonal ileti bloğu oluşur. 4-aminopiridin hızlı aktive olan voltaj bağımlı potasyum kanallarını bloke ederek, omuriliği yaralanmış kedilerde klinik bulguları iyiletirmitir (2, 59).

2. Sodyum Kanalları

Merkezi sinir sistemi (MSS) beyaz cevher yaralanmasındaki anoksi, ATP (Adenozin trifosfat) ve membran depolarizasyonunun kaybına neden olur. Sodyum kanallarından hücre içine sodyum akar. İntrasellüler sodyum konsantrasyonundaki bu artış, Na⁺ - Ca⁺⁺ değiştiricinin ters çalışmasına ve hücre içine aşırı miktarda kalsiyum girişine neden olur (2). Sıçanlarda yapılan deneysel omurilik yaralanma modellerinde, sodyum kanal blokeri olan meksiletin ve fenitoinin nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (5, 6, 7).

3. Kalsiyum Kanalları

Fizyolojik olarak kalsiyumun hücre içine girişi temel olarak iyon kanalları vasıtasıyla olur. Kalsiyumun hücre dışına çıkışı ise iyon pompaları tarafından kontrol edilmektedir. Bunun yanında kalsiyum tamponlanması, birkaç kalsiyum bağlayıcı protein ve aynı zamanda kalsiyum deposu olarak da görev yapan, sitoplazmik organeller –mitokondri, endoplazmik retikulum- tarafından yürütülmektedir (60).

Günümüzde hem in vitro hem de in vivo ortamlarda yapılan çalışmalar, hücre içine kalsiyum girişi ve nöral dokuda oluşan hasar arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Schanne ve arkadaşları, hücre içine kalsiyum girişinin toksisitenin açığa çıkması için kesin bir gereklilik olduğu sonucuna vardılar ve bu sürece “hücre ölümünün son basamağı” adını verdiler (61, 62).

Omurilik yaralanmasında hücre hasarı ile membranların parçalanması, hücrede enerji yetmezliği ve bunun neticesinde Na^+ - Ca^{++} değiştirici gibi elektrolit pompalarının iyi çalışmaması sonucunda gradient farkı ile hücre içine kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları hücre içinde fosfolipazları, proteazları ve fosfatazları aktifleyerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur. Fosfolipazlar hücre membranlarının yıkılmasını sağlayarak araşidonik asit gibi yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz, araşidonik asiti prostaglandinler ve lökotrienlere dönüştürür. Fosfatazlar nitrik oksit sentetaz gibi diğer enzimleri aktifler, ayrıca kalsiyum kanallarının ve diğer iyon kanallarının çalışmasını düzenler. Hücreye kalsiyum girişi ve serbest radikal oluşumu eş zamanlı olur ve sinerjistik etki gösterebilir. Kalsiyum iyonları mitokondrial respiratuar enzimlere bağlandığında elektron transportunu bozarak serbest radikal oluşmasına neden olurlar (2, 3).

Bu oksijen serbest radikalleri, fosfolipazlar ve proteazlarla birlikte membranın yıkılmasına ve araşidonik asitin serbestlenmesine neden olurlar. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bloke edilmesinin (nimodipin, nikardipin) omurilik yaralanmasında klinik sonuçları iyileştirmezken, kan akımını arttırdığı gösterilmiştir (63, 64).

Hücreye kalsiyum iyonlarının girişi için bir diğer yol da glutamat reseptörleridir. Glutamat reseptör blokörleri deneysel omurilik yaralanmasında nörolojik sonuçları iyileştirir.

Bazı tedaviler hücre içine kalsiyum girişi neticesinde oluşan olayları etkileyerek nöroprotektif etki gösterirler. Glukokortikoidler kalsiyumun aktive ettiği fosfolipaz aktivitesi ile ilişkili bir proteinin sentez ve salınımını önler. İndometazin ve diğer siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitörleri eikazanoidlerin üretimini azaltırlar. Siklosporin ve FK506 kalsinörini inhibe ederken, nitrik oksit üretimini azaltır ve nöronları glutamat toksisitesinden korur (65, 66).

2.3.2.4. İnflamatuvar Cevap

Omuriliğin travmatik yaralanması sonrası inflamasyon cevabı saatler içinde başlar ve birkaç gün içinde tepe değerine ulaşır. Bu cevap endotel hasarı, mikroglia aktivasyonu, inflamatuvar mediatörlerin salınımı, vasküler permeabilite artışı, ödem ve periferel inflamatuvar hücrelerin göçü olarak gözlemlenir (28, 67).

Merkezi sinir sisteminin temel savunma hücreleri, mikroglialar omurilik yaralanmasından sonra erken dönemde aktive olurlar ve IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri salarlar (68, 69). Bu erken mikroglia aktivasyonunu nötrofil invazyonu takip eder. Birinci günde tepe değerine ulaşırken üçüncü günde kaybolurlar (68, 69). Nötrofiller, proteazlar, serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksid gibi çok sayıda sitotoksik faktörün yapımından ve salınımından sorumludurlar. Lipid peroksidasyonuna ve protein nitrasyonuna katkıda bulunurlar (70). Nötrofillerin bu zararlı etkilerini bu aşamada bloke eden ajanların, deneysel hayvan çalışmalarında nörolojik fonksiyonel iyileşmeyi sağladıkları bildirilmiştir (71). Nötrofillerden sonra yaralanma bölgesine gelen hücreler, makrofajlardır (68). Esas görevleri oluşan hücre debrisinin fagositozudur. Omurilik yaralanması sonrası ortaya çıkan makrofajların hem pozitif hem de negatif etkileri bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda makrofajların kontrollü aktivasyonunun organizmanın lehine olduğu vurgulanırken, diğer çalışmalarda da makrofaj aktivasyonunun demyelinizasyonu, kavite oluşumunu ve kalıcı akson hasarını arttırarak ikincil yaralanmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (14, 16).

2.3.2.5. Apopitoz

Apoptoz, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Bu fizyolojik olay, dokularda tek tek hücre kaybına yol açtığından latince ayrı düşmek anlamına gelen –apo: ayrı, ptoz: düşmek- apoptoz denilmiştir (16).

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen apoptozun, daha önce hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen, bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir. Birçok yönüyle nekrozdan farklıdır. Kromatin agregasyonu, intranükleozomal DNA fragmentasyonu, çekirdek piknozisi ve hücre büzüşmesi gibi birtakım hücre içi olayları içerir. Hücrelerin sitozolik parçalarının dışarı salgılanması ve herhangi bir lokal inflamatuvar yanıt olmaksızın fagosit içine alınmasıyla sonuçlanır. Apoptoz hücrenin protein sentezi ve enerji gerektiren aktif ölümüdür (2, 16).

Apoptoz sürecine giren hücreler büzüşür, komşu hücrelerle temas kaybı olur, membranda blebler oluşur ve profagositik yüzey sinyalleri taşırlar. Süreç daha sonra kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu ile devam eder. Tüm hücrenin küçük, çevresi membranla çevrili, hızla fagosite edilebilen veziküllere parçalanmasıyla sona erer (2, 16).

Hücre nekrozu ise hücre membranı parçalanması, mitokondriyal şişme, rastlantısal DNA yarıklanması ve genel-bölgesel inflamatuvar reaksiyon içeren uzun bir olaydır (2, 16).

Apoptozun indüklenmesinde üç prototip sinyal yolu vardır (2, 16).

1. Mitokondri aracılı apoptoz oluşturulması
2. Dış sinyallerle apoptozun tetiklenmesi
3. Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apoptoz oluşturulması

Apoptoz tanımlanmasında pek çok moleküler biyolojik test geliştirilmiştir. DNA yarıklanmasını gösteren terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) bağımlı nick-end labeling (TUNEL) tekniği oldukça popüler bir testtir. İtranükleozomal DNA fragmentasyonu apoptozun ana işaretidir ve elektroforezde karakteristik olan merdivenleşme paterniyle tanınabilir (13).

Apoptoz omurilik yaralanmalarında önemli rol oynar. Yong ve arkadaşları, ciddi kontüzyon zedelenmesinden sonra sıçan omuriliğinde travma tarafından indüklenmiş apoptoz varlığını göstermişlerdir (72). Diğer bir deneysel omurilik yaralanma modelinde, apoptozun görülebilir bulgularının ilk 24 saat içinde ortaya çıktığı ve en az 3 hafta sonraya kadar devam ettiği gösterilmiştir (73). Emery ve arkadaşları 1998 yılında, travmatik omurilik yaralanması geçiren insanlarda, lezyon merkezinin kenarlarında ve komşu beyaz cevherde apoptotik hücrelere rastlamışlardır (74).

2.4. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Histopatolojisi

Omurilikte travmayı takiben başlayan ikincil hasar süreci akut, orta ve geç faz olarak sınıflanabilir. Akut faz da erken akut (2-48 saat) ve subakut (2-14 gün) olmak üzere iki başlık altında incelenebilir (2, 28, 75).

2.4.1. Akut Faz

2.4.1.1. Erken Akut Faz (2-48 saat)

Yaralanmadan sonraki ilk değişiklik omurilik gri cevher mikrovasküleritesindeki değişikliklerdir. Santral kanal etrafı ve ön boynuzdaki multifokal peteşial kanamalar saatler içinde radial olarak yayılma eğilimindedirler. Mikrotrombüslerin gözlenmesi ve kanın ektravaze olması ilk 24 saatte belirginleşir. Yaralanmadan dakikalar sonra endotel bileşkeleri açılmaya başlar. Santral peteşiler genişledikçe glial reaksiyon ve nöronal dejenerasyon belirgin hale gelir. Yaralanmış kan omurilik bariyerine bağlı ödem formasyonu yaralanmadan sonra erken saatlerde başlar, radial ve longitudinal olarak ilerler, ilk 24 saatte belirginleşir. Ödem pia elastisitesi olmadığı için vasküler rezistansın artmasına ve dolayısıyla omurilik kan akımının azalmasına neden olur. Nöronlarda nekrozun ilk göstergeleri birinci saatte başlar. Sitoplazmik eozinofili, hayalet hücreler, Nissl cisimciğinin kaybolması, küçülmüş nöronlar, hiperkromatizasyon ve irregüler şekil nekrotik değişiklik göstergeleridir. Gri cevherdeki nekrotik değişiklikler ilk saatlerde artar, 8. saatten sonra beyaz cevhere yayılmaya başlar. Ön boynuz hücrelerinde arka boynuz hücrelerine göre daha erken nekroz görülür. Hem nöronlar, hem de glial hücrelerde aynı

zaman aralığında hücre ölümü görülür. Hücre içi kalsiyum artışı sonucu nükleazlar, proteazlar, kinazlar ve lipazların aktivasyonu ile hücre hasarı artar ve hücre ölümü nekroz ya da apoptoz şeklinde gerçekleşir (2).

2.4.1.2. Subakut faz (2-14 gün)

Aktive olmuş mikroglia ve astrositler reaktif gliosis oluşturmaya başlarlar. Mikroglia, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Bu hücreler lezyon merkezinde çalışırlar ve nadiren yayılırlar. Sağlıklı ya da hafifçe yaralanmış hücreleri öldürüp öldürmediği henüz anlaşılamamıştır. Yaralanmaya cevap olarak astrositler hipertrofi ve proliferasyon gösterirler. Astrositik cevap 14. günde en üst düzeye çıkarken bazen bu süreç 28 güne kadar uzayabilir. İnflamatuar hücrelerin yaralı omuriliğe göçünde iki dalga vardır. Birincisinde polimorfonükleer granülositler yaralanmadan saatler sonra lezyon bölgesine gelerek sitotoksik etkileri ile nöronofaji yapabilirler. 24 saatte maksimum düzeye çıkıp, 72. saatte kaybolurlar. İkinci dalgada, lezyon bölgesine monosit ve makrofajlar gelir ve hücre debrisini fagosit ederler. Schwann hücreleri, meningeal hücreler ve fibroblastlar lezyon bölgesine göç eden diğer periferik hücrelerdir (2, 75).

2.4.2. Orta Faz (2 hafta-6 ay)

Önceden başlamış glial skar dokusunun oluşumu ve olgunlaşma süreci bu fazda devam eder (75).

2.4.3. Geç Faz (>6 ay)

Omurilikte yara iyileşmesi, kistik kavite oluşumu ile sonuçlanır. Yaralanmadan aylar sonra santral kanal ile birleşmiş, beyin omurilik sıvısı ile dolu kistik kaviteler gelişir. Bu kistik kaviteler stabil lezyonlar olmayıp yaklaşık %30 kadarı ilerleme gösterebilirler. İlerleyici nörolojik defisit ve nöropatik ağrıya sebep olabilirler.

Zedelenmiş aksonların wallerian dejenerasyonları bu fazda hala devam ederken, bu zedelenmiş akson ve hücre gövdelerinin temizlenmesi yıllar sürebilir.

Demyelinizasyon gelişmiş ve/veya kısmen kurtulmuş aksonlarda, remyelinizasyonun kısıtlı da olsa tekrardan başlaması bu fazın diğer bir önemli özelliğidir (2, 28, 75).

2.5. İkincil Omurilik Yaralanmasına Yönelik Tedavi Girişimleri

Tıbbın diğer dallarındaki gelişmeler ile karşılaştırıldığında, TOY tedavisi hakkındaki ilerlemeler çok yavaş olmaktadır (Tablo 2.5). Son 25 yıl içinde çok sayıda umut verici ajan klinik çalışmalarda denenmiş olmasına rağmen günümüz itibariyle yaygın kabul gören hiçbir ajan bulunmamaktadır (10, 11).

2.5.1. Kortikosteroidler

Metilprednizolon sodyum süksinat (MPSS) hem deneysel hem de klinik çalışmalara en fazla konu olmuş ve nöroprotektif etkileri gösterilmiş glukokortikoiddir. Serbest radikal oluşumunu azaltması, lipid peroksidasyonunu engellemesi, Na⁺/K⁺-ATPaz pompa aktivitesini düzenlemesi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ayarlaması ve omurilik kan akımını düzeltmesi söz konusu nöroprotektif etkilerindendir (2, 10, 11).

1984 yılında tamamlanan NASCIS I (North American Spinal Cord Injury Study I) adlı klinik çalışmada, yüksek ve düşük doz MPSS alan hasta grupları karşılaştırıldı. Nörolojik gelişme açısından, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, yüksek doz ilaç alan grupta yara yeri enfeksiyonu, gastrointestinal kanama, sepsis ve pulmoner emboli görülme sıklığında artış izlenmesi dikkat çekiciydi (10, 11).

Hemen bu çalışmanın ardından başlanan ve 1990 yılında tamamlanan NASCIS II adlı klinik çalışmada ise yüksek doz MPSS, naloksan ve placebo karşılaştırıldı. Yaralanma sonrası ilk 24 saat içinde verilen 3 madde arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, yaralanma sonrası ilk 8 saat içinde MPSS alan grupla diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı (11).

Bunun üzerine NASCIS III çalışması, MPSS'nin ilk 8 saatte uygulandığında ortaya çıkan olası faydalarını saptamak için planlandı. 1997 yılında tamamlanan bu çalışmada, MPSS'nin 24 ve 48 saat süren infüzyonları tirilizad mesilad (TM) –glukokortikoid ve mineralokortikoid etkisi olmayan ancak lipid peroksidasyonunu metilprednizolona göre daha yüksek oranda inhibe eden 21 aminosteroid- ile karşılaştırıldı. Bu çalışma, yaralanma sonrası ilk 3 saat içinde MPSS tedavisi başlanırsa 24 saatlik infüzyonun, eğer 3 ila 8 saat arasında başlanırsa da 48 saatlik infüzyonun daha etkili olacağını gösterdi. Tirilizad mesilatın klinik kullanıma yönelik faydalı bir etkisi bulunamadı. 48 saatlik MPSS infüzyon grubunda sepsis, pnömoni ve ölüm oranlarının 24 saatlik tedavi grubu ile karşılaştırıldığında ortalama 3 kat daha fazla olduğu saptandı (10, 11).

2006 yılında ABD'de çalışan spinal cerrahlar arasında omurilik yaralanmalarının tedavisi hakkında yapılan bir anket, cerrahların büyük bir kısmının sadece hukuki davalara konu olmamak için, MPSS kullandıklarını ortaya koydu (11, 12).

2.5.2. Ganglioizid GM-1 (Sygen)

Ganglioizidler, sinir dokusu hücre zarlarında bulunan kompleks yapıda glikolipidlerdir. Yapılan hayvan çalışmalarında, ganglioizidler nöröl doku tamirini ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir. 1991 yılında 37 hastayı içeren randomize, kontrollü Maryland GM-1 klinik çalışması, plasebo ile karşılaştırıldığında motor skorlardaki iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koydu. Bunun üzerine, TOY hakkında şimdiye kadar yapılmış en geniş, randomize klinik araştırma –Sygen- planlandı. 28 tane klinik, 750'den fazla hasta 5 yıl süren bu çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın sonucunda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar çıkmadı (10, 11).

2.5.3. Tirotropin Salgılatıcı Hormon (TRH)

Yapılan deneysel TOY modellerinde, TRH'nın ikincil hasarda görülen eksitotoksisiteyi, endojen opioidleri, lökotrienleri ve platelet aktive edici faktörleri doz bağımlı olarak antagonize ettiği gösterilmiştir. 1995 yılında TRH ile ilgili ilk ve tek çalışma yapıldı. Randomize, çift kör, plasebo kontrollü olarak yapılan çalışmada komplet ve inkomplet

yaralanmalı hastalar plasebo ile karşılaştırıldı. İnkomplet yaralanmalı küçük bir hasta popülasyonda elde edilen fonksiyonel iyileşmenin plasebo ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, çalışma kurgusundaki hatalardan ötürü bu sonuçlar anlamlı olarak değerlendirilmedi (11).

2.5.4. Gasiklidin (GK-11)

Gasiklidin, deneysel TOY modellerinde nöroprotektif etkisini kanıtlamış, yan etkisi daha az bir non-kompetitif NMDA reseptör antagonistidir.

Fransa'da 200 hastanın dahil edildiği çift kör, faz II insan çalışmasında denenmiştir. Erken dönem sonuçları anlamlı olmakla birlikte, geç dönem kontrollerinde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu geç dönem negatif sonuçlar her ne kadar yetersiz istatistiksel değerlere bağlansa da, gasiklidin yeni çalışmalarda tekrar düşünülmemiştir (10, 11).

2.5.5. Nimodipin

Nimodipin bir L-tipi kalsiyum kanal blokeridir. Yapılan çalışmalarda eksitotoksisite ve apopitoz üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (92). Bunun üzerine insan klinik çalışmaları planlanmıştır. 1996 yılında Fransa'da tamamlanan çalışmaya 100 adet omurilik yaralanmalı hasta dahil edilmiştir. Nimodipin, MPSS ve plasebo ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmamıştır (10, 11).

2.5.6. Diğer

Son yıllarda ikincil omurilik yaralanmasına yönelik yeni farmakolojik ajanlar denenmektedir. Riluzol –ALS tedavisinde kullanılan antikonvulzan- ve minosiklin –akne tedavisinde kullanılan tetrasiklin grubu antibiyotik- bu ilaçlardan en popüler olanlarıdır (10, 11, 13, 16). Santral nöronların rejenerasyon kabiliyetlerinin olduğunun David ve Aguayo tarafından gösterilmesinden sonra rejenerasyon çalışmaları büyük hız kazanmıştır (108). Omurilik yaralanması sonrası, merkezi sinir sistemindeki bir takım faktörlerin nöron

rejenerasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (11). Myelin ve glial skar dokusu ile ilişkilendirilen bu inhibitör faktörlerin antagonize edilmesiyle de yaralanma sonrası oluşan fonksiyon kayıplarının düzeldiği görölmüştür (76). Fehlings ve arkadaşları tarafından başlatılan çok merkezli faz I/IIa insan çalışmasında da rejenerasyon inhibitörleri Cethrin® isimli ajanla antagonize edilmişlerdir. Devam eden çalışmadan çıkan ilk sonuçlar, hastaların %27'sinde fonksiyonel iyileşmenin olduğunu göstermektedir (11).

Rejenerasyon çalışmalarıyla birlikte hasarlı omuriliğin yeniden yapılanmasını amaçlayan hücre transplantasyonu çalışmaları da son zamanlarda hız kazanmıştır. Aktive otolog makrofajlar, schwann hücreleri, olfaktör hücreler, kemik iliği stromal hücreler ve embriyonik kök hücreler bu çalışmalarda en sık kullanılan ve gelecek vaat eden hücrelerdir (11).

Tablo 2.5. Tamamlanmış prospektif, randomize, kontrollü, omurilik yaralanması klinik çalışmaları

Çalışma adı	Yıl	Hasta sayısı	Çalışma dizaynı	Kullanılan ilaç
NASCIS I	1984	330	Faz III RK	MPSS 100 mg MPSS 1000 mg
NASCIS II	1990	487	Faz III RK	MPSS (24 saat) Naloksan Plasebo
Maryland GM-1	1991	34	Faz II RK, pilot çalışma	GM-1 Plasebo
Otani et al.	1994	158	RK	MPSS (24 saat) Plasebo
TRH	1995	20	Faz II RK, pilot çalışma	TRH Plasebo
NASCIS III	1997	499	Faz III RK	MPSS (24 saat) MPSS (48 saat) TM
Nimodipin	1998	100	Faz III RK	Nimodipin MPSS (24 saat) Nimodipin+MPSS Plasebo
Gasiklidin	1999	280	Faz II RK	Gasiklidin Plasebo
Pointillart et al.	2000	106	RK	MPSS Nimodipine Nimodipin ve MPSS Plasebo
Sygen (GM-1)	2001	797	Faz III RK	MPSS ve GM-1 MPSS ve plasebo

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler çerçevesinde, Başkent Üniversitesi Etik Kurulu'ndan gerekli onay (17/01/2011 tarih DA11/24 sayı) alındıktan sonra yürütölmüştür. Çalışmada toplam 60 adet, 400-450 gram ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deneklerin genel sağılığı çalışma öncesi kontrol edildi ve her denek yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlendi. Deney süresince tüm denekler, 25 C° sıcaklığında odalarda, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsüne uygun olarak, kafeslerde tutuldular. Deneklere yem veya su kısıtlaması yapılmadı. Mesaneleri düzenli olarak boşaltıldı (17).

3.1. Denek Grupları

Denekler eşit olarak 6 gruba bölündü.

Grup I Kontrol grubu: Deneklere sadece T10 segmentine laminektomi yapıldı ve herhangi bir tedavi verilmedi.

Grup II Travma grubu: Deneklerin T10 segmentine laminektomi ve T10 seviyesine omurilik travması (OY) uygulandı. Herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup III (Hiperakut travma) grubu: Deneklerin T10 segmentine laminektomi ile T10 seviyesine omurilik travması uygulandı. Travmadan hemen sonra, travma bölgesine % 0.9 luk NaCl verildi.

Grup IV (Hiperakut travma kök hücreli) grubu: Deneklerin T10 segmentine OY oluşturulup insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1-Dioctadecyl-3.3.3'.3'-tetramethylindocarbocyanine) işaretlı MKH'lerin OY'dan hemen sonra implante edildi.

Grup V (Akut travma kök hücreli) grubu: Deneklerin T10 segmentine OY oluşturulup insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1-Dioctadecyl-3.3.3'.3'-tetramethylindocarbocyanine) işaretlı MKH'lerin 9. saat implante edildi.

Grup VI(Akut travma) grubu: Deneklein T10 segmentine OY oluşturulup % 0.9 luk NaCl' nin 9. saat verildi.

Geç dönemde sakrifiye edilecek deneklere 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde davranış analizi(BBB,eğik düzlem) yapıldı.

3.2. İnsan Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre Hazırlanışı

A. MNC izolasyonu

- 1) Yaklaşık 10-20 mL kemik iliği 120µ/ml non-prezervatif heparin (Sigma, Germany) içine aspire edilir.
- 2) Daha sonra kemik iliği aspirasyonu steril serum fizyolojik ile 1/2 oranında dilüe edilir. 15 ml konik falkon tüplere kemik iliği volümünün 1/3'ü oranında Ficoll-Poquet (StemCell Tech., 07907) eklenir
- 3) Steril bir pipetle dilüe edilmiş olan kemik iliği, ficoll üzerine dikkatli ve nazik bir şekilde ilave edilir ve oda sıcaklığında 400 G'de 30 dk santrifüj edilir
- 4) Santrifüj sonrasında en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, bunların altında ficoll ve en altta da eritrosit ve granülositler kümeleştiği gözlenir. Steril bir pipet yardımıyla mononükleer hücrelerin bulunduğu katman dikkatli bir şekilde alınarak başka bir tüpe aktarılır ve toplanan hücreler 5 kat daha fazla hacimde steril serum fizyolojik ile en az iki kere yıkanarak ficollden arındırılır.
- 5) Son yıkamada supernatan atılır ve istenilen sayıda hücre içeren hücre süspansiyonu hazır hale getirilmiş olur.

B. Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

- 1) %10 fetal bovine serum ve 100 µ/ml antibiyotik (penisilin/streptomisin) ve 2mmol/100mL L-glutamin içeren RPMI-1640 medium 500 ml olacak şekilde hazırlanır ya da bu amaç için hazır ticari form olan MesenCult Proliferation Kit kullanılabilir.

- 2) Dansite gradient yöntemiyle elde edilen hücre süspansiyonu, hücre konsantrasyonu ml'de 1×10^6 hücre olacak şekilde hazırlanır.
- 3) Hazırlanan solusyon 10 ml'si 25 cm² flasklara aktarılır. Flasklar 37 °C'de, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 48-72 saat inkübe edilir.
- 4) İnkübasyonun 48-72'nci saatinde medyum flask içerisinden alınır ve adhere (yapışmayan) olmayan hücreler ortamdan uzaklaştırılıp 10 ml taze medium flask içerisine eklenir.
- 5) Her üç günde bir flask içeriği alınarak taze 10 ml medyum ile yenilenir ve fotoğrafları çekilir.
- 6) İnkübasyonun 7. gününde flasklar invert mikroskop ile incelenerek oluşan fibroblast karakterli adhere koloniler değerlendirilir.
- 7) 14. Gün tüm flaskı kaplayacak olan koloniler tripsinizasyon ile yerlerinden kaldırılarak yeniden kulture edilir (pasajlama) veya hedeflenen çalışmalar için kullanılabileceği gibi dondurularak saklanabilir.

C.MKH'lerin Vybrant DIO ile boyanması

- 1) Hücreler tripsin edilir ve hücre sayımı yapılır.
- 2) Her bir hayvan için 1,500,000 hücre hazırlanmalıdır.
- 3) Hücreler 50 ml' lik falkonda toplanır.
- 4) 1500 rpm' de 15 dakika santrifuj yapılır.
- 5) Süpernatant atılır, pelet üzerine 1 ml PBS + 5 µl Dil koyulur.
- 6) 1 saat inkübe edilir.(aralıklar ile homojenize edilir.)
- 7) 1500 rpm' de 15 dakika santrifuj yapılır.
- 8) Süpernatant alınır. pelet üzerine 450 µl PBS konur, karıştırılır.
- 9) İnsülin iğnesine 400 µl çekilir.(Örneğin saklanması gerekiyor ise + 4 dereceye konur

3.3. Anestezi

Bir gece önceden aç bırakılan deneklerde genel anestezi, 60 mg/kg Ketamin (Ketalar® Pfizer) ve 10mg/kg Xylazine (Rompun®-%2 Bayer) karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanmıştır (12). Anestezi, denekler ağrıya yanıtız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlanmış, gerektiğinde ek doz verilmiştir. Deney sırasında deneklerin vücut sıcaklıkları rektal ısı probu ile kontrol edilerek 37 C° sabit tutulmuştur. İşlem sırasında nasal maske ile 1.5 lt/dk. dan O₂ verilmiştir. Çalışma sonrası denekler normal oda ısısında (23-25 C°) tutulmuşlardır.

Sakrifikasyon ise derin anestezi altında kalpten kan alma ve intrakardiak perfüzyon-fiksasyon yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir (3, 6).

3.4. Cerrahi İşlem

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi Deney Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Anesteziden sonra sırt bölgesi tıraş edilen sıçanlar ameliyat masasına yatırıldı. Povidin-iodine (Betadine®) ile yapılan lokal antisepsiden sonra, spinöz çıkıntıları ortalayan orta hat insizyonu ile cilt-ciltaltı geçildi. Paravertebral kaslar künt diseksiyonla sıyrıldı. Torakal 9, 10 vertebra laminaları ortaya konuldu ve mini rongeur yardımıyla torakal 9, 10 total laminektomi yapıldı. Spinal kanal ortaya konuldu (Şekil 3.1). Bu işlemler sırasında omurilikte travma olmamasına özen gösterildi ve teknik hata nedeniyle lezyon meydana gelen hayvanlar çalışma dışı bırakıldı. Cerrahi işlemler sırasında dura mater sağlam bırakıldı. Bu aşamadan sonra Grup II , III, IV , V ve VI deneklerinde modifiye Allen ağırlık düşürme metodu ile omurilik yaralanması oluşturuldu (Şekil 3.2). Hemostazı takiben tabakalar katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı.

3.5. Travmatik Omurilik Yaralanması Oluşturulması

Sıçanlar için özel olarak üretilmiş ucu künt, 5 gram ağırlığındaki çelik ağırlıklar, 10 cm uzunluğundaki özel yapım çelik ve cam borular içerisinden (Modifiye Allen yöntemine

uygun olarak) omuriliğe dik olacak şekilde düşürülerek omurilik yaralanması oluşturuldu (Şekil 3.3).

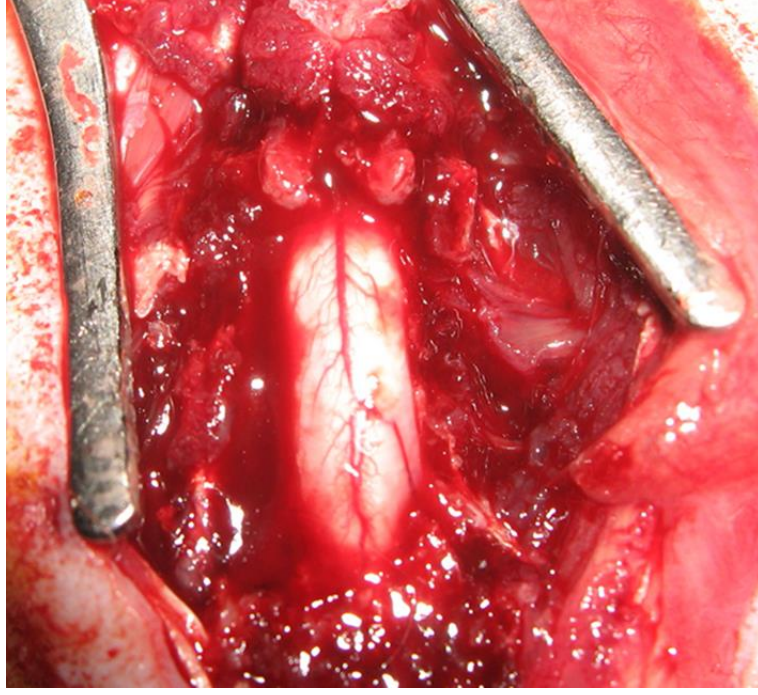
3.6. Kök Hücre Uygulanması

OY'ndan hemen sonra Grup 4' e travma bölgesine Hamilton şırınga ile toplam 2µL/ 100,000 insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1- Dioctadecyl-3.3.3'.3'- tetramethylindocarbocyanine) işaretli MKH 5 dakikada mikroskop eşliğinde travma bölgesine ve toplam 3x 2µL/ 100,000 insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1- Dioctadecyl-3.3.3'.3'- tetramethylindocarbocyanine) işaretli MKH 5 dakikada travma bölgesinin 1.5 mm kaudal ve rostrale verildi (Şekil 3.4).

Grup 3 ise Hamilton şırınga ile 2 µl SF travma bölgesine, 1,5 mm kaudal ve rostrale olmak üzere toplam 6µL SF uygulandı.

Grup 5' e travma bölgesine Hamilton şırınga ile toplam 2µL/ 100,000 insan (erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1- Dioctadecyl-3.3.3'.3'- tetramethylindocarbocyanine) işaretli MKH 5 dakikada mikroskop eşliğinde travma bölgesine ve toplam 3x 2µL/ 100,000 insan(erkek) kemik iliğinden elde edilmiş Dil (1.1- Dioctadecyl-3.3.3'.3'- tetramethylindocarbocyanine) işaretli MKH 5 dakikada travma bölgesinin 1.5 mm kaudal ve rostrale bir şırınga pompası 9. saat implante edildi.

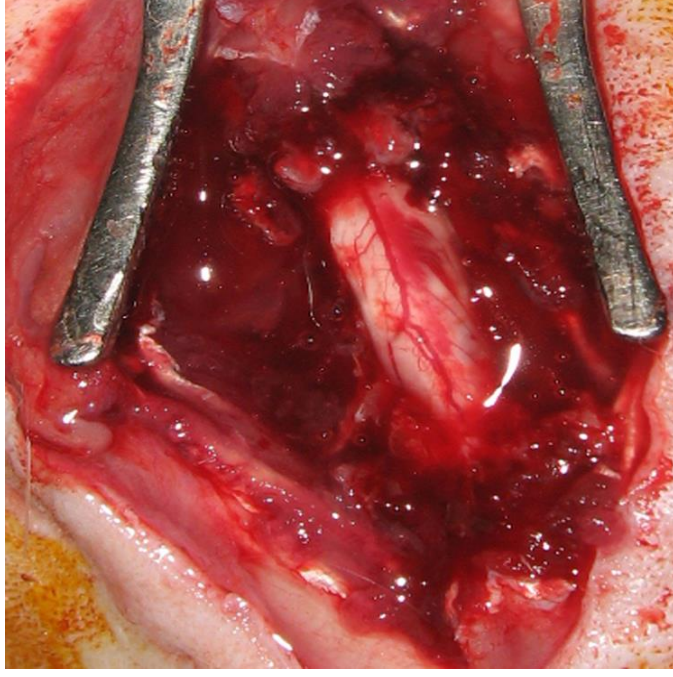
Grup 6 ise Hamilton şırınga ile 2 µl SF travma bölgesine, 1,5 mm kaudal ve rostrale olmak üzere toplam 6µL SF uygulandı.



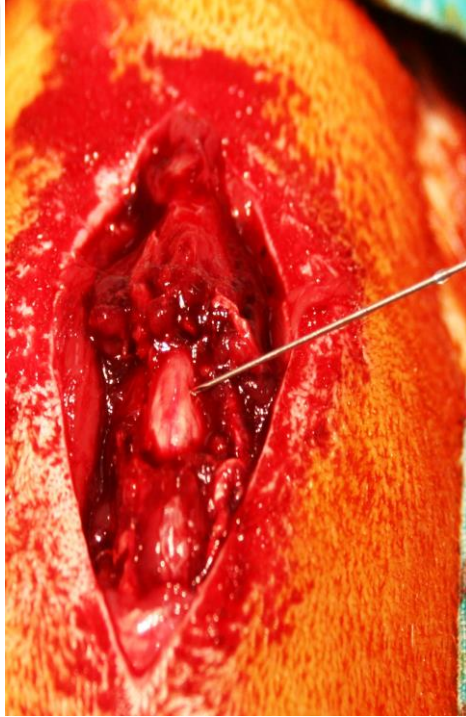
Şekil 3.1. Total laminektomi (T9-10) sonrasında sağlam omurilik dokusunun görüntüsü



Şekil 3.2. Modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemi ile omurilik travması oluşturulması



Şekil 3.3. Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusunun görüntüsü



Şekil 3.4. Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusuna Hamilton şırınga kök hücre verilmiş görüntüsü

3.7. Histopatolojik İnceleme Yöntemleri

Omurilik yaralanması sonrası histopatolojik inceleme yapılacak denekler 28. günde intraperitoneal ketamin enjeksiyonu ile derin anestezi altına alındı. Toraks duvarı, prosesus ksifoideus'dan başlanıp, kostaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve kranyal yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve perikardiyum kesildi. Serum fizyolojik ile perfüzyon yapıldıktan sonra ışık mikroskopisi bakılacak denekler ise formaldehit ile fikse edildi. Eski dorsal insizyon açılarak laminektomi sahasından yaklaşık 2 cm'lik omurilik örnekleri alındı.

3.7.1. Histopatoloji

Omurilik doku örnekleri %10'luk formalin içinde fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Bütün doku örneklerinden multiple koronal kesitler alındı. Hematoksilen eosin (H&E) ile boyanan kesitlerde enflamatuar hücreler ve fibrozis arandı. Kesitlerde görülen makrofajlar ve perivasküler alandaki nötrofiller enflamatuar hücreler olarak kabul edildi. Fibrotik alanlar da damar duvarı ve leptomeningeal alanlarda değerlendirildi. Kesitler semikantitatif olarak skorlandı.

FISH uygulaması ve Hibridizasyon

Hücrelerin Y kromozomu sinyali içerdiğinin teyid edilmesi amacıyla spinal kord kesitlerinde Y kromozomuna özgü sentromer probu ile inceleme yapıldı. Parafin doku kesitlerine FISH yöntemi uygulanmadan önce parafine gömülmüş dokuları açığa çıkarmak ve daha iyi bir hibridizasyon sağlamak için deparafinizasyon denilen ön işlem uygulanır. Paraffin pretreamant reagent kit II oda sıcaklığında saklanır. İçerisinde; pretreatment Solution (NaSCN), protease bufferII (0,2N HCL), protease (2500-3000U/mg protease) bulunur.

GEREKLİ SARF MALZEMELER:

Saf ethanol, hemo-de clearing solüsyon, 10%buffered formalin solüsyon(4%formaldehid in PBS),distile su, şale,37°C ve 80°C su banyosu

Ön Hazırlık:

1. 3 şaleye hemo-de clearing solüsyonu koyulur (Kullanım süresi 1 haftadır.)
2. Pretreatment solution (NaSCN) 50ml kadar bir şaleye koyulur ve su banyosuna koyularak $80 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanır. Sadece bir kez kullanılır ve atılır.
3. Protease buffer(62,5ml) $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ su banyosuna koyulur. Kullanmadan 30 dakika önce içine - 20°C de bulunan protease (250mg) eklenir, iyice karıştırılır. Sadece bir kez kullanılır ve atılır.
4. Distile su şalesi hazırlanır. Oda ısısında kullanılır.

Uygulama:

1. 4-5 μ kesitler alınır
2. Parafinli Preparat 56°C de bir gece bekletilir.
3. Preparat hemo-de clearing solüsyonda 5dk oda sıcaklığında bekletilir.
4. 3.step 2 kez tekrar edilir. Her seferinde taze solüsyon kullanılır.
5. Suyu uzaklaştırmak için Preparat 1dk 100% ethanolde bekletilir. Bu işlem iki kez yapılır ve Preparat 2-5 dk kurutulur.
6. Preparat 80°C deki preatretment solüsyonda (NaSCN) 10dk bekletilir.
7. Sonra distile suda 3dk süre ile tutulur.
8. Preparat distile sudan çıkartılır, kâğıt havluyla etrafındaki fazla su emdirilir.
9. Preparat 37°C de bekletilen protease solüsyonunda 15 dk bekletilir.
10. Preparat 3 dk distile suda bekletilir; 2-5 dk kurutulur. Deparafinizasyon işlemi bitmiştir. Bu işlemden sonra hibridizasyon işlemine geçilebilir ya da hibridizasyondan önce önerilen ancak zorunlu olmayan fiksasyon işlemi uygulanabilir.

Fiksasyon İşlemi

1. Bir şaleye 50 ml 10% buffered formalin solüsyonu koyulur.
2. Preparat önce sırasıyla 70%,85%, 100% alkol serisinden 1'er dakika süre ile geçirilir.
3. Sonra 10% buffered formalin solüsyonunda 10 dakika bekletilir.

Distile suda 3 dakika bekletilir ve kurutulur. Ön fiksasyon işlemi bitmiştir. Hibridizasyon prosedürüne geçilir.

Hibridizasyon

Kullanılan prob; Vysis Cep X SO Cep Y SG DNA Probe Kit (Abbott Molecular Inc. Des Plaines, IL 60018 USA)

1. Prob -20°C’de, saklanır. Kullanılmadan 5 dakika önce çıkarılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlanır.
2. Eriyen prob vortekslenir ve mini santrifüj cihazında yaklaşık 15 saniye çevrilir.
3. Uygulanacak alan büyüklüğüne göre önerilen miktarda (5 µl) prob mikropipetle alınır ve koruyucu zarı sıyrılmış plastik lamelin (Hybrislip) üzerine damlatılır.
4. Örnek preparat lamelin üzerine kapatılır hafifçe bastırarak probun lamın üzerinde dağılması sağlanır.
5. Kenar kısımlara “*rubber cement*” (Fixogum) sürülerek hava alması engellenir.
6. Preparat hibridizasyon cihazına (Hybrite) konulur. 75°C’de 5 dakika denatürasyon, 37 °C’de 16-20 saat (o/n) hibridizasyon olan program uygulanarak hibridizasyon yapılır.
7. Ertesi sabah yıkama işlemine geçilir.

Yıkama sırasında kullanılan solüsyonlar

1. Rapid Wash Solüsyonu (73°C’de su banyosunda kullanılır)
2. 10ml 20XSSC
3. 1,5 ml NP-40
4. 475 ml distile su ile karıştırılır ve 13,5 ml distile su ile 500 ml’ye tamamlanır
5. 2XSSC %1, NP – 40 Solüsyonu (Oda sıcaklığında kullanılır)
6. 100 ml 20xSSC
7. 849 ml distile su
8. 1ml NP-40(pH=5,9) karıştırılarak NaOH yardımı ile pH’ı 7,00±0,2’ye ayarlandıktan sonra 50 ml distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

Yıkama işlemi karanlık ortamda yapılır.

1. Bir şaleye rapid wash solüsyonu doldurulur. Ağzı kapalı olarak su banyosuna konulur. Su banyosu açılarak 73 °C’ye gelmesi beklenir.

2. Başka bir şaleye oda sıcaklığında kullanılacak olan 2XSSC %1 NP – 40 solüsyonu doldurulur. Bu sırada Vysis marka DAPI II -20°C'den çıkarılır. Kullanmadan önce mutlaka short spin verilir.
3. Preparatlarının üzerindeki hybrislip'ler sıcak yıkama solusyonuna daldırılarak kendiliğinden ayrılması sağlanır.
4. Preparatlar 73 °C'da su banyosundaki Rapid Wash solüsyonunda 2 dakika bekletilir. Bir şaleye 4'ten fazla preparat aynı anda konmamalıdır.
5. Sürenin sonunda çıkarılan preparatlar oda sıcaklığındaki 2XSSC %1 NP – 40 solüsyonunda 1 dakika bekletilir.
6. Yıkama işlemi biten lamalar dikey olarak kurutulur.
7. Oda sıcaklığına gelmiş olan DAPI II santrifuj edilir.
8. Cam lamellerin üzerine 5 µl DAPI II mikropipetle damlatılarak prepatlar üzerine kapatılır (DAPI II, uygulanan prob miktarı kadar konulur). Üzerine hafifçe bastırarak lama dağılması sağlanır.
9. İşlemi biten prepatlar kapalı ışık görmeyen bir kutuda (tercihan kapağı şeffaf olmayan ya da alüminyum folyo ile kaplanmış preparat kutusunda) +4°C'de saklanır.

3.9. Davranış Analizi

Deneklerin travmatik omurilik yaralanması sonrası 1, 7, 14, 21, 28. günlerde nörolojik durumlarını değerlendirmek amacıyla Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) lökomotor değerlendirme ölçeği ve eğik düzlem değerleri kullanıldı (15, 17, 77).

3.9.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Lökomotor Değerlendirme Ölçeği

BBB ölçeği, deneklerin arka ayak eklem hareket fonksiyonlarının, adımlama yeteneklerinin, trunkal stabilitelerinin ve ön-arka ayak koordinasyonlu adımlama yeteneklerinin ölçüldüğü 22 birimli bir ölçektir (Tablo 3.1).

Her test yaklaşık 4 dakika sürer ve birbirinden bağımsız iki ayrı gözlemci tarafından puanlamalar yapılır. BBB değerlendirilmesi yapılmadan önce, 5 gün boyunca denekler testin yapılacağı kaydırmaz zeminli açık alanda günde beş dakika serbest bırakılırlar. Bu

deneklerin değerlendirme sonucunu negatif etkileyebilecek olan korku ve stres faktörünün minimuma indirilmesi için gerekli bir egzersizdir ve her değerlendirme öncesinde yapılmalıdır (77).

3.9.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi

Eğik düzlem değerlendirilmesi –yukarı doğru ve aşağı doğru- deneklerin ayak kuvvetini gösteren önemli bir testtir. Eğik düzlem değerlendirilmesinde, deneklerin eğik bir düzlem üzerine yatay pozisyonda yerleştirilmesinden sonra, düzlemin zeminle olan açısı zamanla beşer derece arttırılır. Deneğin beş saniye süresince devrilmeden durabildiği en yüksek açı, o deneğin eğik düzlem derecesi olarak belirlenir (15, 17).

Tablo 3.1. Basso-Beattie-Bresnahan lokomotor değerlendirme ölçeği ve tanımları (113)

0	Hiçbir arka ayak hareketi gözlenmiyor
1	Bir veya iki eklemden kısıtlı hareket, genellikle kalça ve/veya diz eklemi
2	Bir eklemde geniş hareketi veya bir eklemde geniş hareketi ve diğer eklemde kısıtlı hareketi
3	İki eklemde geniş hareket
4	Arka ayakların her üç eklemde de kısıtlı hareket
5	İki eklemde kısıtlı hareket ve üçüncü eklemde geniş hareket
6	İki eklemde geniş hareket ve üçüncü eklemde kısıtlı hareket
7	Arka ayakların her üç eklemde de geniş hareket
8	Ağırlık taşımaksızın süpürme hareketi yapmak veya ağırlık taşımaksızın ön pençenin plantar yüzünün yere teması
9	Sadece durma esnasında ağırlık taşıyan pençenin plantar yüzünün yere teması veya nadiren, sıkça veya sürekli ağırlık taşıyan pençenin dorsal yüzünün yere teması ve plantar yüzün yere temas etmemesi
10	Nadiren ağırlık taşıyan plantar adımlar, ön-arka ayak koordinasyonu mevcut değil
11	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve ön-arka ayak koordinasyonu mevcut değil
12	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve nadir ön-arka ayak koordinasyonu
13	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve sık ön-arka ayak koordinasyonu
14	Sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar, sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve hareket esnasındaki (yere ilk temas ve ayağı yerden kaldırma aşamasında) baskın pençe hareketinin rotatuar olması (içe veya dışa) veya sıkça plantar adımlama, sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve nadiren dorsal adımlama
15	Sürekli plantar adımlama ve sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ayak parmak temizlemesi yok veya ilerlerken nadiren ayak parmak temizlemesi mevcut
16	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas sırasında baskın pençe pozisyonu yere paralel iken kaldırma esnasında rotatuardır
17	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paraleldir
18	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sürekli ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas sırasında baskın pençe pozisyonu yere paralel iken kaldırma esnasında rotatuardır
19	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paraleldir ve kuyruk genellikle veya her zaman aşağıdadır
20	Sürekli plantar adımlama ve sürekli koordine duruş, sürekli ayak parmak temizlemesi, yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paralel, kuyruk sürekli havada ve trunkal instabilite mevcut
21	Sürekli plantar adımlama ve koordine duruş, sürekli ayak parmak temizlemesi, duruş esnasında baskın pençe pozisyonu yere paralel, kuyruk sürekli havada ve trunkal stabilite mevcut

Kısıtlı: Eklem hareket açıklığının yarısından daha az gerçekleşen parsiyel eklem hareketi

Geniş: Eklem hareket açıklığının yarısından daha fazla gerçekleşen eklem hareketi

Süpürme Hareketi: Arka ayakların ritmik hareketi (Her üç eklem önce ekstansiyonda, sonra tamamen fleksiyonda ve sonra tekrar ekstansiyonda), denek genelde sıralar, pençenin plantar yüzü yere temas edebilir veya etmeyebilir, arka ayaklar hareket esnasında ağırlık taşımaz

Ağırlık Taşınamaması: Pençenin plantar yüzünün yere teması esnasında arka ayak ekstansör kaslarında kontraksiyon gözlenmemesi veya arka uyluğunu kaldıramaması

Ağırlık Taşıma: Pençenin plantar yüzünün yere teması esnasında arka ayak ekstansör kaslarında kontraksiyon gözlenmesi veya arka uyluğunu kaldırabilmesi

Plantar Adımlama: Pençenin ağırlık taşımakla birlikte yere plantar yüzle teması, takiben arka ayakların ileriye hareketi ve tekrar pençenin yere plantar yüzle teması

Dorsal Adımlama: Yürüyüş siklusunun herhangi bir aşamasında ağırlığın pençenin dorsal yüzüyle taşınması

Ön-arka ayak koordinasyonu: Yere temas eden her ön ayak adımı için bir arka ayağın yerden kaldırılması veya tam tersi

Nadiren: ≤%50

Sık: %51-94

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

Deneyde elde edilen değerler SPSS 11.5 programı kullanılarak analiz edildi. Grupların parametrik test ön şartlarına uyanlarına tek yönlü parametrik varyans analizi (ANOVA), şartları sağlamayanlara parametrik olmayan varyans analizi (Kruskall Wallis testi) uygulandı. Gruplar arasında fark olup olmadığını bulmak için parametrikte Tukey testi, non parametrikte ise Dunn testi uygulandı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Oranların karşılaştırılması için Z testi yapıldı. $Z > 1,96$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Doku Enflamasyon Düzeyleri

Yapılan çalışmamızdaki alınan örneklerdeki enflamatuar hücre düzeylerine bakıldı. Enflamatuar hücre düzeyleri yok minimal orta ve ağır olarak değerlendirildi. Enflamatuar hücre düzeyi hiç olmayanların % 66.7'si sadece laminektomi yapılan A grubu olup % 16.7'si hiperakut travma oluşturulup kök hücre verilen grup diğer % 16.7' si ise akut travma oluşturulup SF verilen gruptur. Enflamatuar hücre düzeyinin ağır olduğu gruplar % 28.6' lık oranla akut ve hiperakut travma oluşturulup kök hücre verilen gruplardır. Çalışmamızda enflamatuar hücre düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.005$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Doku Enflamatuar hücre analiz sonuçları

Enflamatuar Hücre Grubu	Yok	Minimal	Orta	Ağır
Kontrol	66,7	14,3	0	0
Travma	0	14,3	23,8	14,3
Travma+ hiperakut SF	0	14,3	23,8	14,3
Travma + hiperakut KH	16,7	19	14,3	28,6
Travma + akut KH	0	19	19	28,6
Travma + akut SF	16,7	19	19	14,3

4.2. Doku Fibrozis Düzeyleri

Çalışmamızda gruplar arasındaki fibrozis derecesi incelendi. Fibrozis deceleri yok minimal orta ve ağır olarak değerlendirildi. Fibrozis sadece laminektomi yapılan A grubunda %31.6 ile hiç görülmemiştir. Diğer gruplarda bu oranlar sırası ile %26.3-%15.8-10.5-0-%15.8 değerlendirilmiştir. Fibrozisin ağır olarak görüldüğü grup akut travma oluşturulup kök hücre uygulanan gruptur ve oranı % 100 olarak saptanmıştır. Çalışmamızdaki diğer bir grup olan hiperakut travma oluşturulup kök hücre verilen grupta fibrozisin ağır olarak görülme yüzdesi 0 olarak saptanmıştır .Bu çalışmamızda fibrozis derecesi arasında anlamlı fark bulunmuştur.($p<0.05$) (Tablo 4.2)

Tablo 4.2. Doku Fibrozis analiz sonuçları

Doku Fibrozis düzeyi	Yok	Minimal	Orta	Ağır
Kontrol	31,6	3,7	0	0
Travma	26,3	14,8	0	0
Travma+ hiperakut Sf	15,8	22,2	0	0
Travma + hiperakut kök hücre	10,5	25,9	16,7	0
Travma + akut kök hücre	0	14,8	50	100
Travma + akut SF	30	50	20	0

4.3. Doku Sinyal Düzeyleri

Çalışmamızda Y kromozom sinyali akut ve hiperakut travma oluşturulup kök hücre verilen gruplarda sinyal yok veya var şeklinde değerlendirildi. Y kromozom sinyali %88.9 oran ile akut travma oluşturulup kök hücre verilen grupta gözükür iken % 11.1 ile de hiperakut travma oluşturulup kök hücre verilen grupta bulunmuştur. Çalışmamızda doku Y kromozom sinyali açısından anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 4.3).

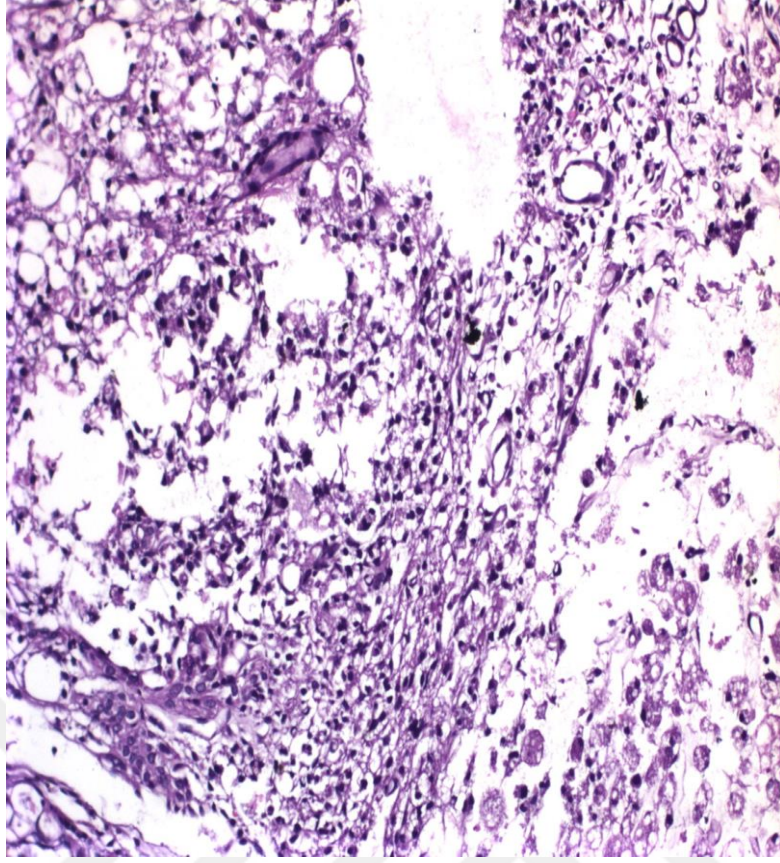
Tablo 4.3. Doku sinyal düzeyi analiz sonuçları

Sinyal Düzeyleri	Var	Yok
Travma + hiperakut kök hücre	11,1	81,8
Travma + akut kök hücre	88,9	18,2

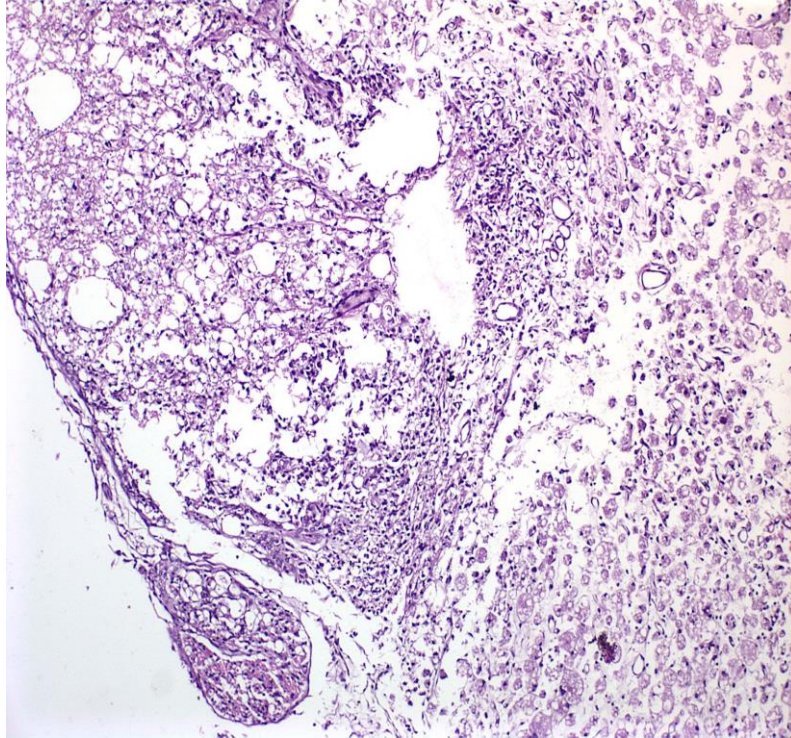
4.4. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

4.4.1. Işık Mikroskopisi İnceleme Sonuçları

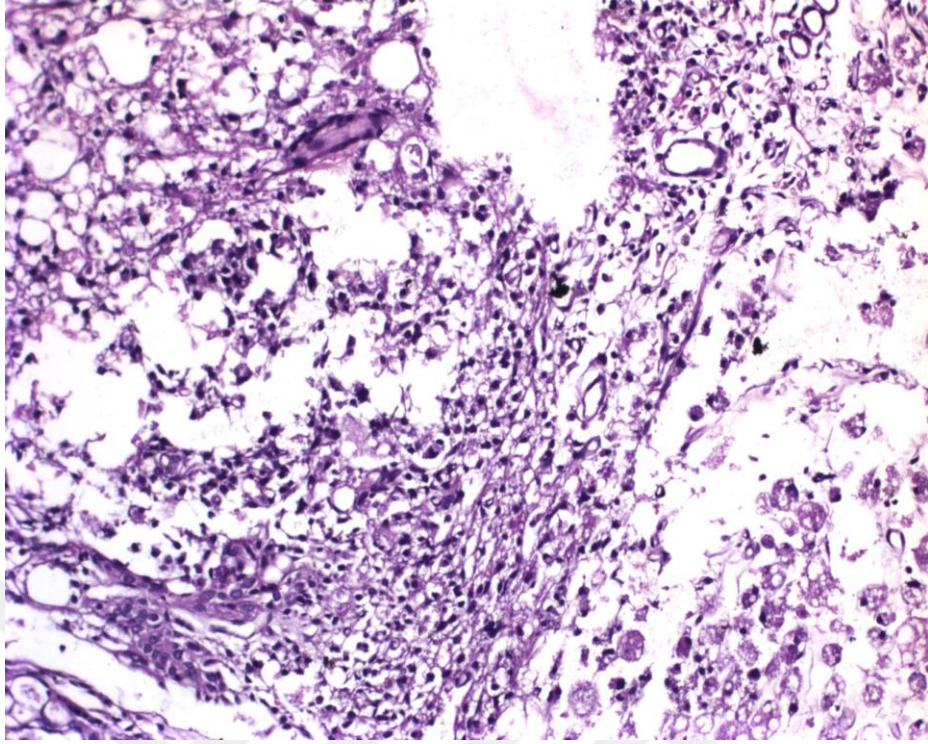
Kontrol grubunda normal histolojik yapı görüldü (Şekil 4.1). Laminektomi ve travma grubunda, orta derecede enflamatuar hücre ve minimal fibrozis görüldü. (Şekil 4.2). Hiperakut travma oluşturulup ve SF verilen grupta orta derecede enflamatuar hücre ve minimal fibrozis görüldü. Hiperakut travma oluşturulup Mezenkimal kök hücre (MKH) verilen grupta enflamatuar hücre ve fibrozis minimal olarak görüldü. Travma sonrası 8 saat sonra MKH verilen akut travma grubunda orta derecede enflamatuar hücre ve ağır derecede fibrozis görüldü. Travma sonrası 8 saat sonra SF verilen akut travma grubunda orta derecede enflamatuar hücre ve minimal fibrozis görüldü (Şekil 4.4).



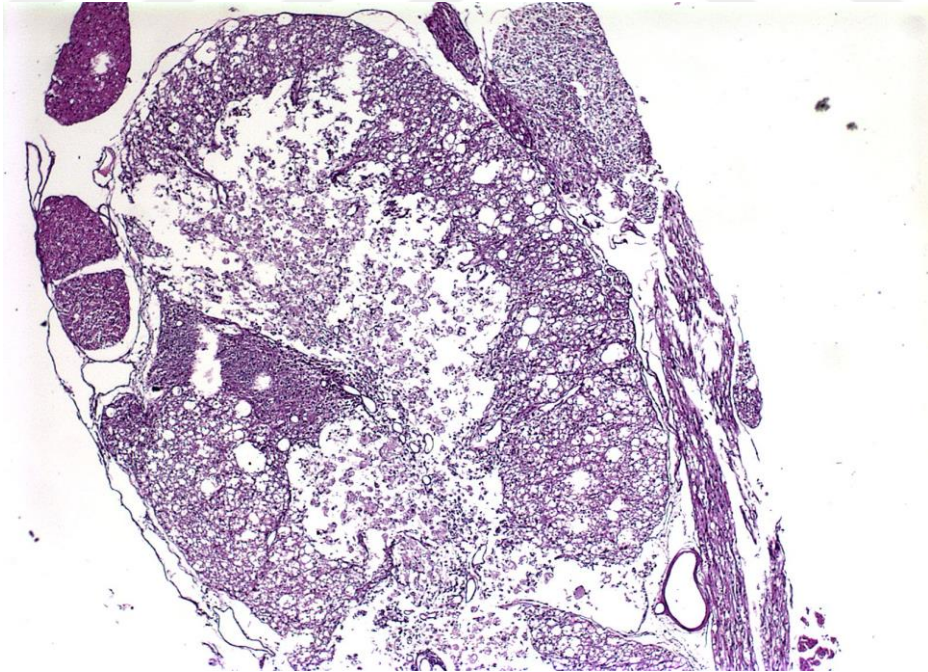
Şekil 4.1. Kontrol grubu. (H&E X200 lük büyütme)



Şekil 4.2. Travma grubu. (H&E X100 lük büyütme)



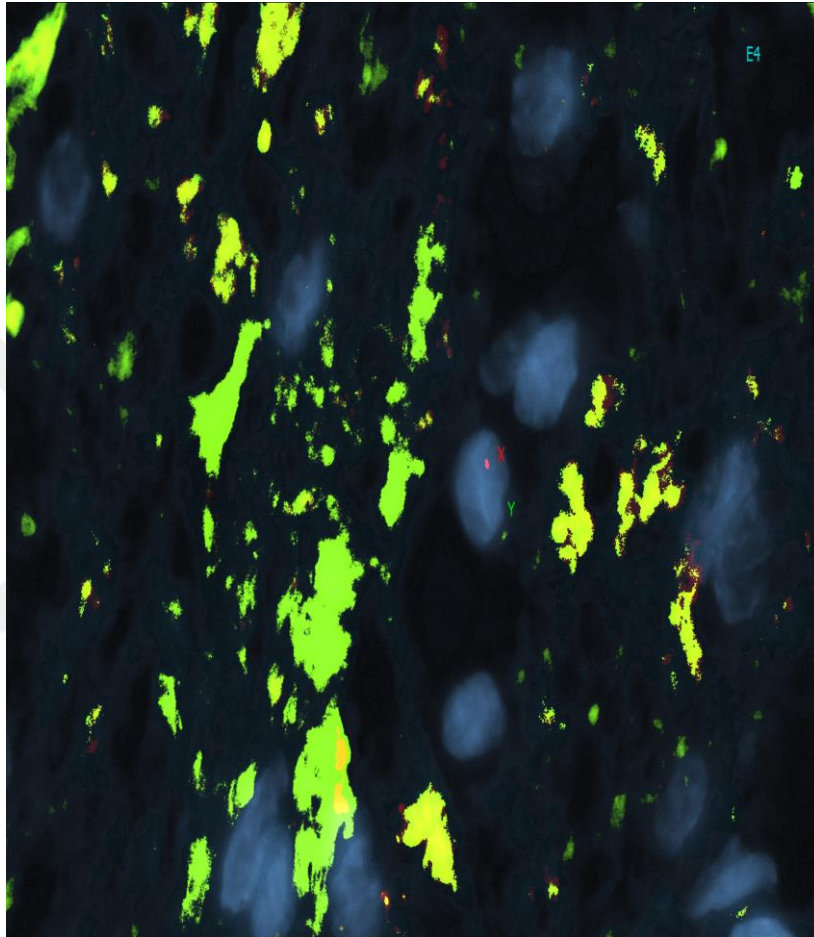
Şekil 4.3. Akut travma grubu. (H&E X100 lük büyütme)



Şekil 4.4. Hiperakut travma grubu (H&E X 40 lık büyütme)

4.5. FISH Çalışma Sonuçları

Omurilik travması oluşturulup travmadan hemen sonra MKH verilen hiperakut travma grubunda sadece 1 deneğin preperatlarında X ve Y sinyalleri görüldü. OT oluşturulup travmadan 9 saat sonra MKH verilen akut grupta ise 8 deneğin preperatlarında X ve Y sinyalleri görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. FISH çalışması

4.6. Davranış Analizi Sonuçları

4.6.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Lökomotor Değerlendirme Ölçeği

Travmadan sonraki 1. gün yapılan ölçümlerde her 5 gruptaki deneklerin hemen hepsinin arka ayaklarında ileri derecede paralizi görüldü. Takip eden haftalarda arka ayak fonksiyonlarında parsiyel gelişmeler kaydedildi (Tablo 4.4) (Şekil 4.6). MKH' yı 9 saat sonra alan akut grup, MKH' yı travma sonrası hemen alan hiperakut gruba göre 7.

günden başlayıp çalışmanın sonuna kadar devam eden, istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme kaydetti ($p<0,05$).

4.6.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi

Eğik düzlem değerlendirmelerinde denekler, yukarı ve aşağı eğimlere doğru test edildiler. Yukarı çıkma testinde daha çok ön ayaklar test edilirken, aşağı inme testinde ise arka ayak koordineli motor fonksiyonlar test edildi. Yukarı çıkma testinde kök hücre grupları ve SF alan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.5). Aşağı inme testinde ise kök hücre grupları ve SF grupları arasında 1. günden başlayarak tüm çalışma boyunca devam eden, anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p<0,05$) (Tablo 4.6). Kök hücre gruplarının kendi aralarındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.7, Şekil 4.8) .

Davranış analizi sonuçlarına göre, kök hücre tedavisinin omurilik yaralanmasına bağlı bozulan arka ayak fonksiyonlarını olumlu yönde etkilediği tespit edildi.

Tablo 4.4. BBB değerleri

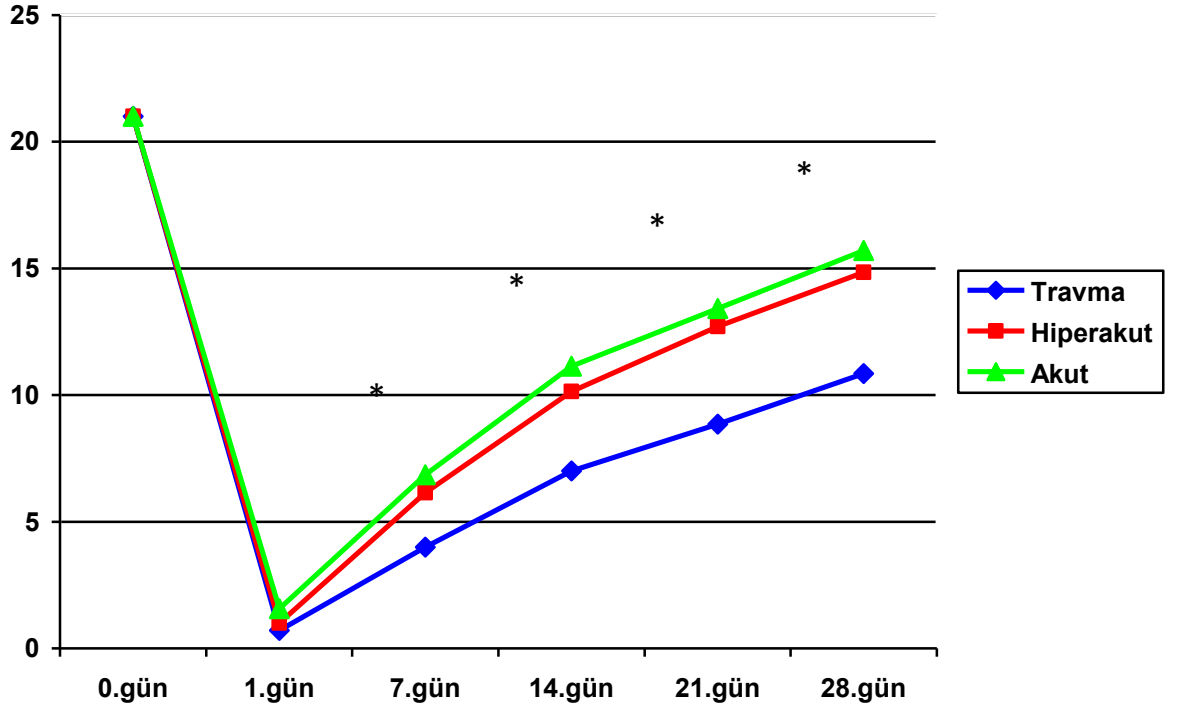
	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	0,69±0,285	3,5±0,377	6,68,00±0,308	8,35±0,340	10,55±0,340
Median	1,00	4,00	7,00	9,00	11,00
Min-Max	0,00-2,00	3,00-5,00	6,00-8,00	8,00-10,00	10,00-12,00
MKH(Hiperakut)					
Ort±SH	1,37±0,202	6,25±0,340	10,14±0,340	11,42±0,297	13,71±0,184
Median	2,00	7,00	11,00	14,00	16,00
Min-Max	1,00-2,00	6,00-8,00	10,00-12,00	12,00-14,00	15,00-16,00
MKH(Akut)					
Ort±SH	1,00±0,218	6,14±0,340	10,14±0,260	12,71±0,359	14,85±0,340
Median	1,00	6,00	10,00	12,00	15,00
Min-Max	0,00-2,00	5,00-7,00	9,00-11,00	12,00-14,00	14,00-16,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

Tablo 4.5. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri

	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	45,57±2,608	53,28±2,542	55,7±2,369	60,14±2,142	63,28±2,542
Median	50,00	55,00	60,00	65,00	65,00
Min-Max	35,00-55,00	40,00-60,00	45,00-65,00	50,00-65,00	50,00-70,00
MKH(Hiperakut)					
Ort±SH	51,57±0,922	57,28±0,714	60,85±1,010	64,42±0,922	66,97±0,922
Median	55,00	60,00	65,00	65,00	65,00
Min-Max	50,00-55,00	55,00-60,00	60,00-65,00	65,00-70,00	65,00-70,00
MKH(Akut)					
Ort±SH	51,12±2,608	56,14±1,010	61,12±0,922	63,71±2,020	65,85±1,010
Median	50,00	55,00	60,00	70,00	70,00
Min-Max	40,00-60,00	55,00-60,00	60,00-65,00	60,00-70,00	65,00-70,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

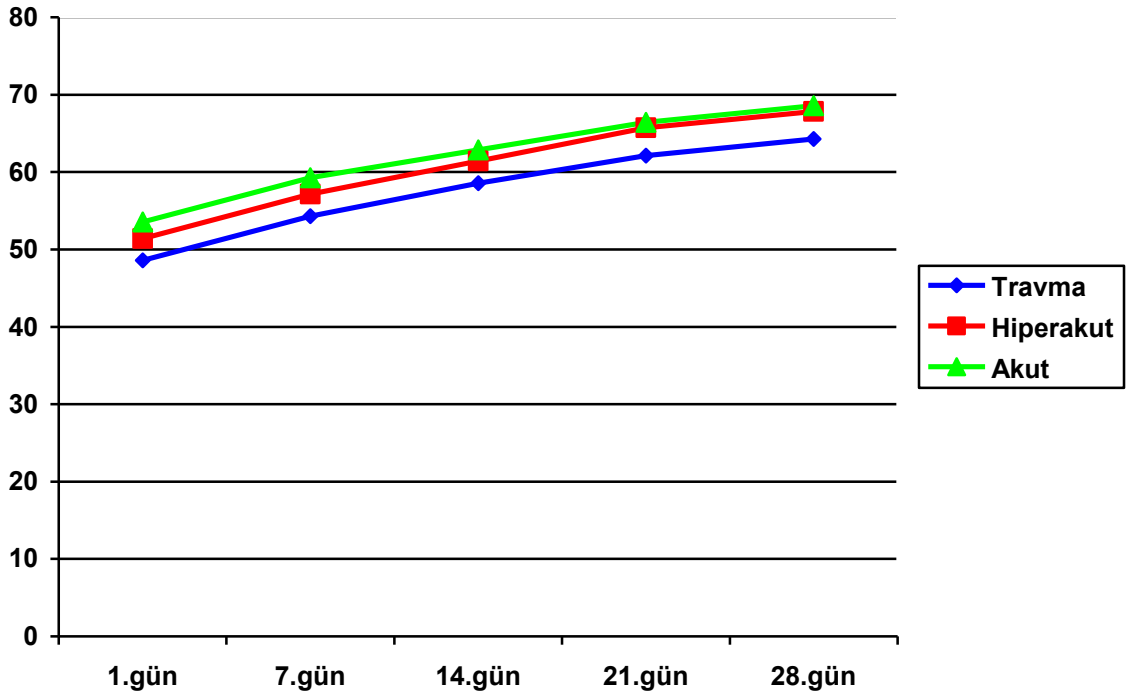
Tablo 4.6. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri

	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	11,35±1,844	16,04±2,640	22,32±2,102	23,42±2,102	31,52±2,608
Median	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00
Min-Max	10,00-20,00	10,00-30,00	15,00-30,00	20,00-35,00	25,00-40,00
MKH(Hiperakut)					
Ort±SH	40,42±0,922	45,62±0,922	51,32±0,922	56,14±1,010	62,65±1,010
Median	40,00	45,00	50,00	55,00	65,00
Min-Max	40,00-45,00	45,00-50,00	50,00-55,00	55,00-60,00	60,00-65,00
MKH(Akut)					
Ort±SH	40,00±2,182	43,28±1,700	47,28±2,020	53,28±2,020	57,28±2,020
Median	40,00	45,00	50,00	55,00	60,00
Min-Max	30,00-50,00	35,00-50,00	40,00-55,00	45,00-60,00	50,00-65,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

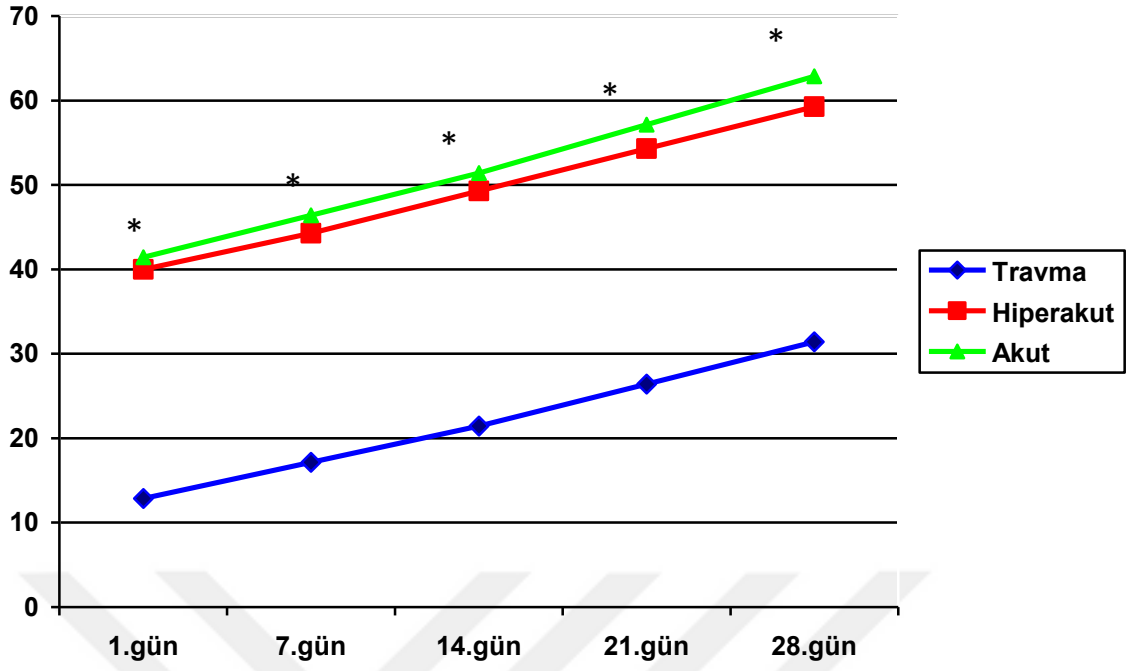


Şekil 4.6. BBB skoru

*: $p < 0,05$



Şekil 4.7. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri



Şekil 4.8. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri

*: $p < 0,05$

5. TARTIŞMA

Son yıllarda omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi üzerine yapılan çok sayıda çalışma, ilk kez 1914 yılında Allen tarafından ortaya atılan iki basamaklı mekanizma kavramının - birincil ve ikincil yaralanma- önemini bir kez daha vurgulamıştır. O tarihten günümüze tüm çabalara rağmen yaralanmış omuriliğin rejenerasyonu insanda henüz başarılamamıştır (4-11, 23-25, 28).

Birincil yaralanma, santral sinir sisteminde genel olarak travma anında ortaya çıkan ve nöral dokunun kompresyon, kontüzyon ve/veya laserasyonu ile sonuçlanan duruma verilen addır. Travmanın şiddetiyle orantılı olarak ortaya çıkan kaçınılmaz bir süreçtir. Birincil yaralanma ile ilgili yapılabilecekler ancak koruyucu yöntemlerdir. Eğitim ile kazaların meydana gelmesini engellemek ve yaralanma sırasında aktif ve pasif güvenlik önlemlerinin alınmasıyla vücudun stabilizasyonunu sağlamak birincil yaralanmanın şiddetini düşürebilir (2, 28).

İkincil yaralanma ise birincil yaralanmayı takiben dakikalar, saatler içinde başlayıp haftalarca devam eden bir süreçtir. Vasküler bozukluklar, hemoraji, iskemi, metabolik yetmezlik, eksitotoksisite, serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu, sitokin salınımı ve inflamasyon gibi mekanizmaları içerir. Bu mekanizmalar nöronlarda ve oligodendrositlerde nekroza, apoptoza, demyelinizasyona ve aksonal hasara neden olurlar (28, 67). Bu nedenle, ikincil yaralanmanın önlenmesi tedavi denemelerinin asıl hedefini oluşturmaktadır (3-9, 78).

Şimdiye kadar olan MKH ile yapılan çalışmaları incelediğimiz zaman, genel olarak verilen kök hücre sayısının $1 \times 2 \mu\text{L}/100.000$ insan(erkek) kemik iliğinden elde edilmiş MKH verildiğini gördük (83) ancak Teng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada verilen MKH miktarının $3 \times 2 \mu\text{L}/100.000$ MKH olması gerektiğini önermişler (81). Ayrıca Kabataş ve Karaöz' ün yürüttüğü bir çalışmada MKH' lerin hem travma bölgesine hem de travma bölgesinin 1.5 mm rostral ve kaudal bölgelerine verilmesini önermişlerdir (82). Biz de bu çalışmamızda sıçanlara MKH sayısının $3 \times 2 \mu\text{L}$ 100.00 olarak belirledik ve Hamilton iğnesi ile mikroskop eşliğinde hem travma bölgesine hem de travma bölgesinin 1.5 mm rostral ve kaudal kısımlarına MKH enjekte ederek uyguladık.

Çalışmamızda, modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemi ile deneysel TOY oluşturduk. Kolay uygulanması ve insanlardaki yaralanma modeline benzerlik göstermesi bu yöntemi seçmemizin en önemli sebepleridir. Yaratılan travmanın subjektif olması ve şiddetinin homojen olarak ölçülememesi bu yöntemin başlıca dezavantajlarıdır (2, 3).

Literatürde umut verici sonuçları olan MKH uygulamalarında travma bölgesinde ikincil hasarda rol oynayan inflamuar süreçteki makrofaj sayısının MKH uygulanan deneklerde anlamlı olarak azaldığı gösterilmiş.

Çalışmamızda davranış analizi için BBB lokomotor değerlendirme ölçeği ve eğik düzlem değerlendirilmesi kullanıldı (17, 77). Eğik düzlem değerlendirmesinde –aşağı doğru- MKH tedavisi alan denekler, travma grubu ile karşılaştırıldığında 1. günden itibaren postürün korunması ve koordinasyonlu arka ayak hareketlerinde daha hızlı ve daha iyi derecede düzelme gösterdiler. Oluşturduğumuz travmanın yerine bağlı olarak ön ayak fonksiyonları çok etkilenmediği için yukarı doğru eğik düzlem değerlendirmesinde MKH tedavisi alan grupta belirgin bir fark saptanmadı. BBB lokomotor değerlendirme ölçeği ile total arka ayak fonksiyonel iyileşmesini değerlendirildi. MKH tedavisi alan denekler, travma grubu ile karşılaştırıldığında 7. günden itibaren istatistiksel olarak belirgin bir düzelme gösterdiler. Ayrıca MKH tedavisini travma sonrası alan hiperakut grup ile MKH tedavisini travma sonrası 9.saatte alan akut travma grubu arasında istatistiksel olarak belirgin farklılık görüldü. Teng ve arkadaşları çalışmalarında, fonksiyonel iyileşmenin travma grubu ile karşılaştırıldığında eğik düzlem testinde –aşağı doğru- 7. günde, BBB testinde ise 21. günde belirginleştiğini bildirmişlerdir (17). Doku rejenerasyonu için daha uzun bir zaman gerektiğinden, fonksiyonel iyileşmenin 7 gün gibi erken bir dönemde başlamasını, MKH nöroprotektif etkinliğine bağlayabiliriz. Sonuç olarak davranış analizi sonuçlarımız daha daha önce yayınlanan çalışmalarla benzer şekilde MKH nöroprotektif etkinliğini destekler niteliktedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmamızda MKH tedavisinin, travmatik omurilik yaralanması oluşturulmuş sıçanlarda travma bölgesindeki enflamasyon derecesini azalttığı ve fonksiyonel düzelmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir.
- Hiperakut ve akut MKH verilen tedavi grupları arasında enflamasyon ve fibrozis derecesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır.
- Deneysel travmatik omurilik yaralanması modellerinde, Allen tekniğinin yerine bilgisayar destekli otomatik ağırlık düşürme cihazlarının kullanılması daha homojen, objektif travmalar yaratmak açısından önemli ve kullanışlıdır.
- Hiperakut ve akut MKH verilen tedavi grupları arasında MKH sinyali açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Gilbert RR. The Foundation for Spinal Cord Injury Prevention, Care & Cure (FSCIPCC) Erişim: (<http://www.fscip.org/>). Erişim tarihi: 25/11/2009.
- 2) Kaptanoglu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Temel Nöroşirürji (Aksoy K.), 1. Baskı, Ankara, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, Cilt 2, 1144-1155, 2005.
- 3) Tufan K. Deneysel akut omurilik yaralanmasında lamotrijinin etkisi. Uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, 2004.
- 4) Kaptanoglu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. J Neurosurg, 91 (2 Suppl): 200-204, 1999.
- 5) Kaptanoglu E, Beskonakli E, Solaroglu I, Kilinc A, Taskin Y. Magnesium sulfate treatment in experimental spinal cord injury: emphasis on vascular changes and early clinical results. Neurosurg Rev, 26 (4): 283-287, 2003.
- 6) Kaptanoglu E, Caner H, Solaroglu I, Kilinc K. Mexiletine treatment-induced inhibition of caspase-3 activation and improvement of behavioral recovery after spinal cord injury. J Neurosurg Spine, 3 (1): 53-56, 2005.
- 7) Kaptanoglu E, Solaroglu I, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Blockade of sodium channels by phenytoin protects ultrastructure and attenuates lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. Acta Neurochir (Wien), 147 (4): 405-412; discussion 412, 2005.
- 8) Solaroglu I, Kaptanoglu E, Okutan O, Beskonakli E., Attar A, Kilinc K. Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats. Surg Neurol, 64 Suppl 2: S17-21, 2005.
- 9) Beril Gok H, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. J Clin Neurosci, 14 (2): 138-142, 2007.
- 10) Fehlings MG, Baptiste DC. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. Injury. Jul;36 Suppl 2:B113-22, 2005.
- 11) Hawryluk GW, Rowland J, Kwon BK, Fehlings MG. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. Neurosurg Focus. 25(5):E14, 2008.
- 12) Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. Spine (Phila Pa 1976) 26 (24 Suppl): S39-46, 2001.
- 13) Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. Lancet Neurol. Dec;3(12):744-51, 2004.

- 14) Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol.* Feb;51(2):215-23, 2002.
- 15) Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain.* Jul;126(Pt 7):1628-37, 2003.
- 16) Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist.* Aug;11(4):308-22, 2005.
- 17) Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 2;101(9):3071-6, 2004.
- 18) Goodrich JT. Landmarks in the history of neurosurgery. *Principles of Neurosurgery* (Rengachary S, Ellenbogen RG), Second edition, China, Elsevier-Mosby, 1-37, 2005.
- 19) Özsoy MK. Deneysel spinal kord yaralanması sonrası deferoksamının süperoksit dismutaz ve histopatolojik değişiklikler üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana, 2008.
- 20) Naderi S, Zileli M, Özer AF. Omurga cerrahisinin tarihçesi. *Omurga ve Spinal Kord Cerrahisi* (Zileli M, Özer AF), 2. Baskı, İzmir, Cilt 1, 1-13, 2002.
- 21) Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates. The father of spine surgery. *Spine (Phila Pa 1976).* Jul 1;24(13):1381-7, 1999.
- 22) Marketos SG, Skiadas PK. Galen: a pioneer of spine research. *Spine (Phila Pa 1976).* Nov 15;24(22):2358-62, 1999.
- 23) Lifshutz J, Colohan A. A brief history of therapy for traumatic spinal cord injury. *Neurosurg Focus.* Jan 15;16(1):E5, 2004.
- 24) 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.
- 25) Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 37: 291-302, 1991
- 26) Yilmaz G. Deneysel spinal kord yaralanma modelinde clopidogrel'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi, TC Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, 2007.
- 27) Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sumbuloglu G, Kirnap M, Dursun H. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord.* Nov;38(11):697-701, 2000.

- 28) Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev.* Apr;76(2):319-70, 1996.
- 29) Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg.* Jul;75(1):15-26, 1991.
- 30) Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 1: Normal spinal cord. *Neurosurgery.* Aug;33(2):277-83; discussion 83-4, 1993.
- 31) Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: Acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* Aug;33(2):285-91; discussion 92, 1993.
- 32) Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* Dec;35(6):700-8, 1971.
- 33) Khan M, Griebel R, Rozdilsky B, Politis M. Hemorrhagic changes in experimental spinal cord injury models. *Can J Neurol Sci.* Aug;12(3):259-62, 1985.
- 34) Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol.* Oct;56(3):341-58, 1998.
- 35) 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. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Jul-Aug;74(4):241-59, 1989.
- 36) Kobrine AI, Evans DE, Rizzoli HV. The effects of ischemia on long-tract neural conduction in the spinal cord. *J Neurosurg.* May;50(5):639-44, 1979.
- 37) Kaptanoglu E, Palaoglu S, Surucu HS, Hayran M, Beskonakli E. Ultrastructural scoring of graded acute spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.* Jul;97(1 Suppl):49-56, 2002.
- 38) Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* Oct 1;84(7):2068-101, 1994.
- 39) Hallenbeck JM, Jacobs TP, Faden AI. Combined PGI₂, indomethacin, and heparin improves neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg.* May;58(5):749-54, 1983.
- 40) Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery.* Jul;27(1):1-11, 1990.
- 41) Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* Aug;59(2):256-61, 1983.
- 42) Braughler JM, Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma.* Mar;9 Suppl 1:S1-7, 1992.

- 43) Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res.* May 3;547(2):344-8, 1991.
- 44) Greenamyre JT, Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology.* Nov;44(11 Suppl 8):S7-13, 1994.
- 45) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol.* Feb;19(2):105-11, 1986.
- 46) Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci.* Feb 1;17(3):1055-63, 1997.
- 47) Yanase M, Sakou T, Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in acute spinal cord injury. *J Neurosurg.* Nov;83(5):884-8, 1995.
- 48) McAdoo DJ, Hughes MG, Nie L, Shah B, Clifton C, Fullwood S. The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage --> glutamate release --> damage --> glutamate release --> etc. *Brain Res.* Mar 15;1038(1):92-9, 2005
- 49) Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr Med Res Opin.*;18 Suppl 2:s9-13, 2002.
- 50) Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* May 10;252(5007):851-3, 1991.
- 51) Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci.* Sep;17(9):359-65, 1994.
- 53) Hinwood BG, Yeo JD, Kidman AD. Monoamine and tissue fluid levels in contused spinal cord of sheep. *J Neurochem.* Oct;35(4):786-91, 1980.
- 53) Osterholm JL, Mathews GJ. Altered norepinephrine metabolism, following experimental spinal cord injury. 2. Protection against traumatic spinal cord hemorrhagic necrosis by norepinephrine synthesis blockade with alpha methyl tyrosine. *J Neurosurg.* Apr;36(4):395-401, 1972.
- 54) Hamilton AJ, Black PM, Carr DB. Contrasting actions of naloxone in experimental spinal cord trauma and cerebral ischemia: a review. *Neurosurgery.* Nov;17(5):845-9, 1985.
- 55) Sharma HS, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience.* Nov;57(2):443-9, 1993.
- 56) Winkler T, Sharma HS, Stalberg E, Olsson Y. Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis attenuates alteration in spinal cord evoked potentials and edema formation after trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat. *Neuroscience.* Feb;52(4):1057-67, 1993.

- 57) Agrawal SK, Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci.* Jan 15;16(2):545-52, 1996.
- 58) Ildan F, Oner A, Polat S, Isbir T, Gocer AI, Kaya M. Correlation of alterations on Na⁽⁺⁾-K⁺/Mg²⁺ ATPase activity, lipid peroxidation and ultrastructural findings following experimental spinal cord injury with and without intravenous methylprednisolone treatment. *Neurosurg Rev.* ;18(1):35-44, 1995.
- 59) 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.* Dec;38(1-2):165-91, 2001.
- 60) Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery.* Jun;38(6):1176-95, 1996.
- 61) Schanne FA, Moskal JR, Gupta RK. Effect of lead on intracellular free calcium ion concentration in a presynaptic neuronal model: 19F-NMR study of NG108-15 cells. *Brain Res.* 1989 Dec 4;503(2):308-11.
- 62) Schanne FA, Dowd TL, Gupta RK, Rosen JF. Lead increases free Ca²⁺ concentration in cultured osteoblastic bone cells: simultaneous detection of intracellular free Pb²⁺ by 19F NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5133-5
- 63) Guha A, Tator CH, Piper I. Increase in rat spinal cord blood flow with the calcium channel blocker, nimodipine. *J Neurosurg.* Aug;63(2):250-9, 1985.
- 64) Guha A, Tator CH, Smith CR, Piper I. Improvement in post-traumatic spinal cord blood flow with a combination of a calcium channel blocker and a vasopressor. *J Trauma.* 1989 Oct;29(10):1440-7, 1989.
- 65) Aarsman AJ, Mynbeek G, van den Bosch H, Rothhut B, Prieur B, Comera C. Lipocortin inhibition of extracellular and intracellular phospholipases A2 is substrate concentration dependent. *FEBS Lett.* Jul 13;219(1):176-80, 1987.
- 66) Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* Aug 23;66(4):807-15, 1991.
- 67) Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* Jul;41(7):369-78, 2003.
- 68) Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* May 1;6(5):712-24, 1994.
- 69) Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol.* Jul;152(1):74-87, 1998.

- 70) Taoka Y, Okajima K. Role of leukocytes in spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. Mar;17(3):219-29, 2000.
- 71) Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem*. Mar;88(6):1335-44, 2004.
- 72) Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, Citron BA, Watanabe I, Berman NE. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma*. Jul;15(7):459-72, 1998.
- 73) Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. Oct;17(10):915-25, 2000.
- 74) Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*. Dec;89(6):911-20, 1998.
- 75) Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*;25(5):E2, 2008.
- 76) Atalay B, Bavbek M, Cekinmez M, Ozen O, Nacar A, Karabay G. Antibodies neutralizing Nogo-A increase pan-cadherin expression and motor recovery following spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. Dec;45(12):780-6, 2007.
- 77) Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. Feb;12(1):1-21, 1995.
- 78) Tufan K, Oztanir N, Ofluoglu E, Ozogul C, Uzum N, Dursun A. Ultrastructure protection and attenuation of lipid peroxidation after blockade of presynaptic release of glutamate by lamotrigine in experimental spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 25(5):E6, 2008.
- 79) Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. Winter;2(4):257-67, 1985.
- 80) Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT. Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. Jun;16(6):511-21, 1999.
- 81) Yang D. Teng, Dou Yu, Alexander E. Ropper, Jianxue Li, Kabataş S, Dustin R. W., Junmei W., Maryrose P. S., D. Eugene R. Jr., Robert L., Evan Y. Snyder and Richard L. Sidman Functional Multipotency of Stem Cells: A Conceptual Review of Neurotrophic Factor-Based Evidence and Its Role in Translational Research 574 *Current Neuropharmacology*, 2011, 9, 574-585

- 82) Karaöz E, Kabataş S, Ay B, Okçu A, Subaşı C, Duruksu G, Müslüman M, Civelek E Infiltrated Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells in the Injured Rat Spinal Cord Reduces Lesion and Impacts Partially Functionally Recovery
- 83) A. Iwanami, S. Kaneko, M. Nakamura Y. Kanemura, H. Mori, S. Kobayashi, M. Yamasaki, S. Momoshima, H. Ishii, K. Ando, Y. Tanioka, N. Tamaoki, T. Nomura, Y. Toyama, and H. Okano Transplantation of Human Neural Stem Cells for Spinal Cord Injury in Primates

