



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RATLARDA OMURİLİK YARALANMALARINDA
LEVETİRASETAMIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. EGEMEN NURSOY

UZMANLIK TEZİ

KIRIKKALE

2017



T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**RATLARDA OMURİLİK YARALANMALARINDA
LEVETİRASETAMIN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. EGEMEN NURSOY

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. MUSTAFA ÖĞDEN

KIRIKKALE

2017

İÇİNDEKİLER	Sayfa
KISALTMALAR	7
GRAFİK BAŞLIKLARI	9
RESİM BAŞLIKLARI	10
TABLO BAŞLIKLARI	11
ÖZET	14
1. GİRİŞ	15
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. Epidemiyoloji	16
2.2. Tarihçe	17
2.3. Embriyoloji	18
2.4. Anatomi	19
2.5. Omurilik Yaralanmasında Deneysel Modeller	21
2.6. Omurilik Yaralanmalarında Patofizyoloji	22
2.6.1. Birincil Omurilik Hasarı	22
2.6.2. İkincil Omurilik Hasarı	24
2.6.3. Myeloperoksidasyon mekanizmaları	29
2.6.4. Lipid Peroksidasyon mekanizmaları	30
2.6.5. Araşidonik Asit Metabolizmaları	30
2.6.6. Apoptoz	31
2.6.7. Omurilik Hasarında Bazı Sitokinler	32
2.7. Omurilik yaralanmalarında medikal tedaviler	33
2.7.1. Akut tedaviler	33
2.7.2. Kronik tedaviler	33
2.7.3. Omurilik hasarında potansiyel olarak etkili olabilecek ilaçlar	33
2.7.4. Metilprednisolon	34
2.7.5. Levetirasetam	35
3. MATERYAL VE METOT	37
3.1. Materyal	37
3.2. Omurilik yaralanması modeli	38
3.3. Histopatolojik inceleme	40
3.4. Biyokimyasal inceleme	41
3.5. İstatistiksel analiz	41
4. BULGULAR	43
4.1. Akut döneme ait bulgular	43
4.1.1. Işık mikroskopisi	43
4.1.2. Histopatolojik inceleme	46
4.1.3. Biyokimyasal inceleme	49
4.2. Subakut döneme ait bulgular	52
4.2.1. Işık mikroskopisi	52
4.2.2. Histopatolojik inceleme	54
4.2.3. Biyokimyasal inceleme	60

4.3. Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması	66
5. TARTIŞMA	67
5.1. Akut Döneme Ait Bulgular	67
5.2. Subakut Döneme Ait Bulgular	68
5.3. Herbir Grubun Akut ve Subakut Döneme Ait Verilerinin İkili Karşılaştırılması	69
5.4. Çalışmanın Kısıtlılıkları	70
6. SONUÇLAR	71
KAYNAKLAR	73



T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI

Nöroşirürji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan “*Ratlarda omurilik yaralanmalarında levetirasetamin etkilerinin araştırılması*” isimli bu deneysel çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29.09.2017

Doç. Dr. Bülent BAKAR

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

Yard. Doç.Dr. Mustafa Öğden

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı

Yard. Doç. Dr. Ziya Asan

Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak bulunduğum süre içerisinde bu bilim dalında bilgi ve tecrübelerini bana aktaran çok değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail Semih Keskil' e, Prof. Dr. Hakan Murat Göksel' e, Prof. Dr. Mehmet Faik Özveren' e, Doç. Dr. Bülent Bakar' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa Öğden' e ve Yard. Doç. Dr. Mehmet Hüseyin Akgül' e teşekkürlerimi borç bilirim.

Uzmanlık bitirme tezimin danışmanlığında, oluşturulmasında, yürütülmesinde ve sonlandırılmasında aktardığı tecrübe ve katkılarından dolayı Yard. Doç. Dr. Mustafa Öğden'e ve Doç. Dr. Bülent Bakar' a teşekkür ederim. Ayrıca bu tezimin oluşturulmasında katkılarından dolayı Veteriner Patolog Yard. Doç. Dr. Güngör Çağdaş Dinçel' e ve Prof. Dr. Üçler Kısa' ya çok teşekkür ederim.

Çalıştığım süre boyunca yardım ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli çalışma arkadaşlarım Op. Dr. İbrahim Akkurt'a, Op. Dr. Ulaş Yüksel'e, Araştırma Görevlisi arkadaşlarım Dr. Süleyman Akkaya'ya, Dr. Alemiddin Özdemir'e ve Dr. M. İlker Karagedik' e Sağlık Memuru Neşet Bozbıyık' a, Hemşire Canan Altınbudak' a ve Hemşire Tuba Yaka' ya teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip olan sevgili annem ve babama, hekimlik mesleğini seçmemde etkin rol oynayan ablalarım Uzm. Dr. Banu Nursoy Şirvan ve Kadriye Birtan'a teşekkürlerimi sunarım.

KISALTMALAR

ANOVA	: Varyans analizi (analyses of variances)
BAP	: Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
C5a	: Kompleman 5 a
COX	: Siklooksijenaz (cyclooxygenase)
df	: Serbestlik dereceleri (degrees of freedom)
F	: F puanı
GABA	: Gamma-aminobutirik asit
H&E	: Hematoksilin-eosin
IFN- γ	: Interferon-gamma
IGF-1 β	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 beta
IL	: İnterlökin
LV	: Levetirasetam
LV-A	: Levetirasetam akut
LV-S	: Levetirasetam subakut
MDA	: Malondialdehit
MP	: Metilprednizolon
MP-A	: Metilpredisolon akut
MPO	: Myeloperoksidaz
MP-S	: Metilprednisolon subakut
N	: Denek sayısı
NASCIS	: “National Acute Spinal Cord Injury Study”

NK	: “Natural killer”
NO	: Nitrik Oksit
PCR	: Polimerize zincir reaksiyonu (Polymerized Chain Reaction)
PG	: Prostaglandin
PG	: Prostaglandin
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri (Reactive Oxygen Species)
SOD	: Süperoksid dismutaz
t	: t puanı
TGF- β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor-beta)
TNF- α	: Tümör nekrozis faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha)
TXA	: Tromboksan (Thromboxane)
X ²	: Ki-kare
Z	: Z puanı

GRAFİK BAŞLIKLARI

Grafik 1: Akut dönem gruplarına ait kanama şiddeti düzeyi değerleri grafiği

Grafik 2: Akut dönem gruplarına ait vakuolizasyon düzeyi değerleri grafiği

Grafik 3: Akut dönem gruplarına ait nekrotik nöron sayımı sonuçları grafiği

Grafik 4:Subakut döneme ait kanama şiddeti düzeyi değerleri bar grafiği

Grafik 5:Subakut döneme ait vakuolizasyon düzeyi değerleri bar grafiği

Grafik 6:Subakut döneme ait nekrotik nöron sayım sonuçları bar grafiği

Grafik 7:Subakut döneme ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının bar grafiği

Grafik 8: Tüm deney gruplarına ait malondialdehid düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehit)

Grafik 9: Tüm deney gruplarına ait insülin benzeri büyüme faktörü-1beta düzeyi değerleri grafiği

Grafik 10: Tüm deney gruplarına ait interferon-gamma düzeyi değerleri grafiği

Grafik 11: Tüm deney gruplarına ait süperoksitdismutaz düzeyi değerleri grafiği

Grafik 12: Tüm deney gruplarına ait total nitrit/ nitrat düzeyi değerleri grafiği

Grafik 13: Tüm deney gruplarına ait tümör nekrozis faktör-alfa düzeyi değerleri grafiği

RESİM BAŞLIKLARI

Resim 1: Omurilik yaralanmasının deneysel olarak oluşturulma aşamalarına ait makroskopik görüntü

Resim 2: KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 3: SHAM-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 4: MP-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 5: LV-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 6: SHAM-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 7: MP-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 8: LV-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Resim 8: Tüm subakut dönem gruplarına ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının histopatolojik görüntüleri (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

TABLO BAŞLIKLARI

Tablo 1: Deneysel omurilik travma modelleri

Tablo 2: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların tanımlayıcı tablosu (N: denek sayısı, SD: standart sapma)

Tablo 3: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

Tablo 4: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni Düzeltme* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 5: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait biyokimyasal bulguların tanımlayıcı tablosu (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : İnterferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa, SD: Standart sapma)

Tablo 6: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait biyokimyasal bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)* testi ve *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : İnterferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa, F: F puanı. X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

Tablo 7: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni Düzeltme* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 8: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların tanımlayıcı tablosu (N: denek sayısı, SD: standart sapma)

Tablo 9: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (F: F puanı, X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

Tablo 10: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni Düzeltme* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 11: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguların tanımlayıcı tablosu (SD: standart sapma)

Tablo 12: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemde gelişen aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının gruplar arasındaki farklılığının karşılaştırılması tablosu. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

Tablo 13: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguları sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 14: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait biyokimyasal bulguların tanımlayıcı tablosu (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme

faktörü-1beta, IFN- γ : İnterferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa, SD: Standart sapma)

Tablo 15: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait biyokimyasal bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)* testi ve *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : İnterferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa, F: F puanı. X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

Tablo 16: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni Düzeltme* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Tablo 17: Spinal kord yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının her bir grup için karşılaştırma tablosu. *Mann-Whitney U* testi, $p < 0.05$

Tablo 18: Spinal kord yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait biyokimyasal inceleme sonuçlarının her bir grup için karşılaştırma tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bağımsız Değişkenler t* testi, $p < 0.05$ (t: t puanı)

ÖZET

Omurilik yaralanmaları hali hazırda tedavi edilmesi mümkün olmayan ancak rehabilite edilebilen bir hastalıktır. Omurga biyomekaniği araştırmalarında ve cerrahi tekniklerde ilerlemelere ve rehabilitasyon sürecindeki gelişmelere rağmen omurilik hasarını onaracak ve nörolojik iyileşme sağlayacak bir tedavi yöntemi konusunda henüz belirgin bir ilerleme sağlanamamıştır. Omurilik yaralanmalarında ortaya çıkan ikincil hasarın esas mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte akut hasar gören omurilikte erken inflamatuvar yanıtın ikincil doku hasarını tetiklediği düşünülmektedir. Yapılan bu çalışmada metilprednisolon ve levetirasetam isimli ilaçların omurilik hasarı üzerindeki potansiyel iyileştirici etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada 300-350 gram ağırlığında 54 adet erkek Wistar Albino rat kullanıldı. Ratlar Kontrol grubu, akut dönem ve subakut dönem olmak üzere üç ana gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki ratların omuriliğine T5-8 dorsal laminektomi yapıldıktan sonra 1 dakika süreyle “geçici vasküler anevrizma klipi” konularak omurilik hasarı oluşturuldu. Yaralanma oluşturulduktan ve beklenen süre tamamlandıktan sonra vasküler klip yerinden çıkarılıp cerrahi katlar anatomiye uygun olacak şekilde kapatıldı. Dört saat sonra kontrol ve SHAM grubu dışındaki ratlara metilprednisolon ve levetirasetam intraperitoneal yoldan uygulandı. Akut döneme ait ratlar 72 saat ve subakut döneme ait ratlar 7 gün sonunda sakrifiye edildi. Takiben hasarlı omurilik dokusu çıkarılarak histopatolojik inceleme (kanama şiddeti, vakuolizasyon, nekrotik nöron sayımı, aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme) ve biyokimyasal inceleme (doku malondialdehit, insülin benzeri büyüme faktörü-1beta, interferon-gamma, süperoksit dismutaz, total nitrit/nitrat ve tümör nekrozis faktör-alfa düzeyleri) yapıldı.

Bu deneysel çalışmanın sonunda her iki farmakolojik ajanın da ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut döneminde dokularda histopatolojik olarak iyileştirici etkinliğinin olduğu ancak bu etkinliği subakut dönemde devam ettiremediği saptandı. diğer yandan gerek akut ve gerekse subakut dönemde her iki farmakolojik ajanında biyokimyasal veriler üzerinde değiştirici etkinliğinin olmadığı bulundu.

Tüm bu bulgular ışığında levetirasetam isimli farmakolojik ajanın omurilik yaralanmasının akut döneminde dokularda histopatolojik olarak iyileştirici etkilerinin hangi inflamatuvar süreçler üzerinden ortaya koyduğuna yönelik ileri düzey deneysel çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşüncesine ulaşıldı.

Anahtar kelimeler: metil prednisolon, omurilik, omurilik yaralanması, levetirasetam.

ABSTRACT

Spinal cord injuries are a disease that still cannot be treated but just can be rehabilitated. Despite advances in spinal biomechanic researches and surgical techniques, and improvements in the rehabilitation processes, no significant improvement has been identified in the treatment of spinal cord injury and neurological recovery. Although the main mechanisms of secondary injury in spinal cord injuries are not fully understood, it is thought that the early inflammatory response in the acutely damaged spinal cord triggers the secondary tissue damage. In this study, the potential therapeutic effects of methylprednisolone and levetiracetam on spinal cord injury were investigated.

In this study, 54 male Wistar Albino rats weighing 300-350 grams were divided into three main groups: CONTROL group, acute and subacute stage groups. The T5-8 dorsal laminectomy was performed to the spinal column of the rats except the control group, and a "temporary vascular aneurysm clip" was attempted to the spinal cord for 1 minute to create spinal cord injury. After the injury was established and the expected time was complete, the vascular clip was removed from the site and the surgical incisions were closed anatomically. Four hours from the clippage, methylprednisolone and levetiracetam were administered intraperitoneally to the rats except the CONTROL and SHAM groups. The rats of acute stage groups were sacrificed at 72 hours and the rats of the chronic stage groups were sacrificed at the end of 7 days. Subsequently, damaged spinal cord was removed and in the damaged spinal cord tissue, hemorrhage severity, vacuolization, necrotic neuronal cell count, axonal fragmentation, axonal degeneration and axonal swelling were examined histopathologically; and tissue malondialdehyde, insulin-like growth factor-1beta, interferon-gamma, superoxide dismutase, total nitrite /

nitrate and tumor necrosis factor-alpha levels were measured by using enzyme linked immunoabsorbent assay biochemically.

At the end of this preliminary experimental study, it was determined that both pharmacological agents improved the histopathological architecture in damaged neural tissues during acute period of spinal cord injury in rat, but could not sustain this activity in subacute period. On the other hand, any pharmacological agent affected the to biochemical data in both acute and subacute stages. In all these findings, it was considered necessary to carry out advanced studies to identify the effects of the levetiracetam to healing processes of on spinal cord injury.

Key words: methyl prednisolone, spinal cord, spinal cord injury, levetiracetam.

1. GİRİŞ

Omurilik yaralanması morbidite ve mortaliteye sebep olan bütün dünyada 20-40/1.000.000 sıklıkta görülen önemli bir sağlık problemidir. En sık sebeplerini motorlu taşıt kazaları, spor yaralanmaları, iş kazaları ve evde düşmeler oluşturmaktadır (1,2).

Omurilik yaralanmasında oluşan hasarın iki mekanizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Birincil yaralanma, daha çok travma anında oluşan mekanik etkilere bağlı oluşur. Birincil hasarı oluşturan mekanik güçler, fleksiyon, ekstansiyon, aksiyal yüklenme, rotasyon, distraksyonu içerir. Bu güçler osteoligamentöz vertebranın hasarlanmasına sebep olarak nöral doku hasarı, aksonların kaybı, kanama, arterial ve venöz yapılarda hasarlanma gibi sonuçlar doğurur. İkincil yaralanma, birincil yaralanmadan dolayı oluşan hücre ölümü ve ortama salınan pek çok faktörün başlattığı kaskadlara bağlı oluşan metabolik ve biyokimyasal bir sürecin sonucudur. İkincil hasar kavramı ilk defa 1911 yılında Allen tarafından tanımlanmıştır. Köpekler üzerinde yaptığı çalışmalarda öncelikle deneysel omurilik hasarı oluşturmuş, daha sonra myelotomi ve hematomyelin drenajı yaparak nörolojik fonksiyonlarda düzelme olduğunu göstermiş ve ikincil hasar kavramını ortaya atmıştır.

Omurilik hasarı oluştuktan kısa bir süre sonra ortama salınan kimyasal mediatörler yoluyla inflamasyon oluşmaktadır. Özellikle protein ve polipeptid yapıdaki sitokinler (proinflamatuvar sitokinler (TNF, IL-1, IL-12, IFN-g, IL-6 vb.), bunlarla zıt etkileri olan antiinflamatuvar sitokinler (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-1 β , PG-E₂, IL-1 reseptör antagonisti) gibi) önemli roller üstlenmektedir (3, 4).

Omurilik yaralanmalarında ikincil hasarı önlemeye ve etkilerini azaltmaya yönelik pek çok tedavi metodu üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Ancak günümüzde yüksek doz metilprednizolon dışında bir ajan rutin kullanıma girmeyi

başaramamıştır. (5, 6, 7) Metilprednizolonun ikincil hasarda oluşan serbest radikalleri, ödemi, lipid peroksidasyonu azaltarak etkisini gösterdiği düşünülmektedir. Ancak günümüzde metilprednizolonun etkileri hala tartışılmaya devam etmektedir.

Bu çalışma omurilik yaralanmasında levetirasetam isimli farmakaolojik ajanın ikincil hasarın etkilerini azaltmaya yönelik olası olumlu ve tedavi edici etkilerini ortaya koymaya yönelik olarak yürütüldü.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epidemiyoloji

Dünya üzerinde, omurilik yaralanması insidansı yılda 7.500-10.000, prevalansı 23/1000000 arasında olmaktadır (8, 9). ABD verilerine göre %40 motorlu taşıt kazası, % 20 yüksekten düşme, % 5-10 spor yaralanmalarını oluştururken en sık 16-30 yaş aralığında gerçekleşmektedir. Ülkemizde ise en sık sebep % 48.8 oranla motorlu araç kazalarıdır (10). Servikal lezyonlarda tetrapleji izlenirken, hasar aşağı seviyelere indikçe torakal ve lomber bölgelerde parapleji izlenmektedir. Yaralanmaların yaklaşık yarısı tetrapleji ya da parapleji ile sonuçlanmaktadır (11). Türkiye’de omurilik yaralanmasının insidansının 12.7/1000000, erkek kadın oranının ise 2.5/ 1 olduğu bildirilmiştir (12).

2.2. Tarihçe

Tarihte omurilik yaralanmasına ait ilk yazılı belgelere antik mısır papirüslerinde rastlanmaktadır. M.Ö. 3000 ile 2500 yıllarına ait olduğu düşünülen bu belgeler 1862’ de Edwin Smith tarafından Mısır’ da bulunmuştur (13). M.Ö 460 ile 370 yılları arasında yaşadığı düşünülen Hipokrat da paraplejiyi tanımlamıştır. Bunun yanı sıra omurganın anatomisi ile bilgiler veren Hipokrat, tüberküloz spondilit, travmaya bağlı omurga eğrilikleri, dislokasyon ve kırıklar ile ilgili çalışmalar yapmış ve tedavi için kullanılan aletler tasarlamıştır. Bu ilkel yöntemler günümüzün omurga cerrahisinde uygulanan tekniklerin öncüleridir (14). Galen omurilik kesileri üzerinde çalışmalar yapmış, omuriliğin yarım kesisi sonrası hemiplejiyi tanımlamıştır. Bu bilgiler ile omurilikteki yaralanma seviyesini, motor ve duysal kayıp gelişen bölgeyi ve lezyon alanını inceleyerek tespit edebilir konuma gelmiştir (15).

Tablo 1: Deneysel omurilik travma modelleri (16)

ARAŞTIRMACI	DENEY	TARİH
Galen	Omurilik kesisi	İkinci yüzyıl
Watson	Köpekleri yüksekten düşürme	1891
Allen	Omurilik üzerine ağırlık düşürme	1911
McVeigh	Omurilik üzerine parmakla basma	1923
Tarlov	Epidural aralıkta balon şişirme	1953
Fontaine	Omurilik klempleme	1954
Rivlin	Omurilik anevrizma klip kompresyonu	1978
Watson	Omurilik lazer kesisi	1986
Benzel	Omurgayı klemp ile sıkıştırma	1990
Stokes	Elektromekanik kontüzyon	1990

2.3. Embriyoloji

Embriyoda sinir sisteminin gelişiminden önce üç temel hücre tabakası farklılaşması görülür. En içerideki katman olan endodermden gastrointestinal trakt, akciğerler ve karaciğer gelişir. Mezoderm ileri safhalarda kasları, bağ dokuyu ve vasküler sistemi meydana getirir. Üçüncü ve en dıştaki tabaka olan ektodermden ise sinir sistemi oluşmaktadır. Ektoderm katmanından meydana gelen sinir sisteminin gelişmesi embriyonik diskin oluşması ile başlar. Embriyonik yaşamın 18. gününde nöral plak, nöral tüp ve tepe oluşur. Nöral tüpün sefalik kısmından primitif beyin vezikülleri gelişirken kaudal kısmından ise omurilik oluşur. Nöral tüp duvarlarındaki matris hücrelerinin bölünerek çoğalmaları sayesinde nöral tüp genişler ve uzar. Daha sonra nöroblastlar gelişir ve artık bu safhadan sonra

nöroblastlarda bölünme gerçekleşmez. Nöroblastların yanı sıra matriks hücrelerinden astrosit ve oligodendrositler oluşur.

Omurilikteki üç bölgeli temel yapı erişkinde de bulunmaktadır. Ependimal bölge santral kanalın duvarını kaplayan bir tabaka oluşturur. Omuriliğin gri cevherini manto bölgesi hücreleri oluştururken, beyaz cevheri marjinal bölge hücreleri oluşturur. Böylece omurilik aksiyal kesitlerdeki “H” şeklindeki görüntü meydana gelir (17).

2.4. Anatomi

Medulla oblongatanın uzantısı olan omurilik yaklaşık olarak erkeklerde 45 cm, kadınlarda 42-43 cm uzunluğunda ve 30 gr ağırlığındadır. Vertebral kanalın yaklaşık 2/3'ünü kaplayan omurilik, C1 vertebraı olan atlasın üst kenarından başlayarak genellikle L1-L2 sınırında konus medullaris ismiyle sonlanır. Konus medullarisden sonra fibröz bir yapı olan filum terminale koksikse kadar uzanır. Omurilik dıştan içe doğru dura mater, araknoid mater, pia mater isimli 3 kat membran ile sarılıdır. Pia mater ve araknoid mater arasında beyin-omurilik sıvısı (BOS) dolanımının olduğu subaraknoid mesafe izlenir. Pia mater omuriliğe yapışarak, lateral yüzey boyunca dura matere uzanan ligamentum dentikulatum isminde ince bant yapılarını oluşturur (18). Omurilikten 8 adet servikal, 12 adet torakal, 5 adet lomber, 5 adet sakral, 1 adet koksigeal olmak üzere toplam 31 çift sinir çıkar ve her biri dorsal ve ventral kökler içerir. Omurilik ve vertebral kolon gelişimindeki görece eşitsizliğin bir sonucu olarak embriyoda intervertebral foramenlere yatay olarak ulaşan sinir kökleri, yukarıdan aşağıya doğru gittikçe oblikleşerek lomber ve sakral seviyelerde çıkış noktalarında neredeyse vertikal hale gelmişlerdir. Omuriliğe tutunduklarında oluşturdukları görüntü “*cauda equina*”

olarak adlandırılır. Yaklaşık 20 cm uzunluğunda ince bir filament olan filum terminale, konus medullarisin tepesinden aşağı doğru uzanır.

Omurilik içyapısına bakıldığında anterior median fissur ve posterior median sulkus omuriliği ortada komissural sinir bandıyla birleşen iki simetrik bölüme ayırır. Bu bölümlerin gri ve beyaz maddeden oluştuğu görülmektedir. Gri madde bütün olarak H şeklini alır. Koronal planda santral kanaldan geçen hayali bir çizgi anterior, posterior kolonlar olmak üzere ikiye ayırır. Posterolateral sulkustan ince bir ak madde tabakası olan *Lissauer traktusu* ile ayrılır. Gri madde lateral funikulusa doğru çıkıntılar yaparak anterior ve posterior kolonlar arasında retikuler formasyon denilen bir ağ sistemi oluşturur. Santral kanal, omurilik boyunca seyreder. Kanal önündeki gri madde anterior gri kommissur, arkası ise posterior gri kommissur olarak adlandırılır. Kanal medulla oblangatanın alt kısmında ilerleyerek 4. ventriküle açılır ve filum terminaleye ulaşır (18).

Vertebral arterin dalları olan anterior spinal arter, posterior spinal arter ve bir segmentten intervertebral foremene giren radiküler arterler omuriliğin beslenmesinde görevlidir. Anterior spinal arter, anterior median fissürden, konus medullarise kadar ilerleyerek kauda ekuina ve filum terminalede dallara ayrılır. Posterior spinal arter, posterolateral sulkuslar boyunca devam eder. Radiküler arterler ise, her seviyede farklı bir arterden çıkarlar. Vertebral arter, inferior tiroidal arter, asenden servikal arter, interkostal arterler, iliolumbalis ve sakral arterden çıkarlar. %80 oranında sol interkostal lomber arterden çıkan ve T9-L2 arasının beslenmesinde görevli artere Adamakiewicz arteri (arteri radikularis magna) ismini alır. Venler ise, omurilikte arterlerle beraber seyreder ve arter dallarıyla aynı ismi alırlar. Longitudinal venler üst uçta internal juguler ven ve vertebral ven yoluyla vena cava superiora dökülür. İntervertebral venler hem internal vertebral venöz

pleksüs hem de foramenden kanal dışındayken, sakral, lumbar, interkostal ve servikal venlere ve bu yolla inferior vena cavaya dökülür (19).

2.5. Omurilik Yaralanmasında Deneysel Modeller

Omuriliğin künt travması ile ilgili fizyopatolojik sürece ait bilgilerin pek azı insana ait çalışmalardan elde edilmiştir. Genellikle bu bilgiler omurilik hasarı gerçekleştirilen hayvan modellerinden sağlanmıştır. Kantitatif bir travmaya bağlı oluşan omurilik hasarının mikroskobik ve fonksiyonel düzelmesi ile uyum gösterebilecek standart ve tekrarlanabilir bir hayvan modeli, insanlardaki akut travmatik omurilik hasarına yönelik çalışmalarda kullanılabilir. Bunun için geliştirilen pek çok farklı model vardır. Akut kinetik kompresyon (kaf, klip, balon, vertebral dislokasyon, “*impactor*”), akut statik kompresyon (ağırlık kullanılarak basınç uygulanması), ağırlık düşürme, akselerasyon-deselerasyon, distraksiyon, transeksiyon (lazer, bistüri, koter gibi aletlerle yapılan tam ya da parsiyel kesi) gibi fiziksel travma ile oluşturulan hasarlar, iskemi (aort ya da selektif arter ya da ven oklüzyonu), tümör kompresyonu, kimyasal hasar gibi fiziksel travma olmadan oluşturulan hasarlar şeklinde özetlenebilir. Omurilik künt biçimde hasarlandırıldığında, hasarlı segmentin çevresinde sağlam kalan akson demetlerinin rejenere olması, incelemede yanlış pozitif sonuçlar vermektedir. Omuriliğin tam kat ya da bir bölümünün kesildiği modeller ise akson yenilenmesi için uygun olurken, insanlarda oluşan omurilik hasarını iyi temsil edememektedirler. Künt omurilik yaralanması için en sık olarak kullanılan yüksekte ağırlık düşürme, klip veya balon kompresyon modelleridir. Klip kompresyon modeli 1978 yılında Tator ve Rivlin tarafından geliştirilmiştir (20). Bu modelde çeşitli zaman aralıklarında omuriliğin anevrizma klipi ile komprese edilerek travma oluşturulmaktadır. Klip kapanma süresi ve gücü travmanın şiddetini etkileyen faktörlerdir. Omuriliğin

tamamının travmaya maruz bırakılabilmesi ve aynı zamanda iskemi de oluşturulabilmesi bu modelin avantajı olarak ortaya çıkmaktadır. Böylece insanlarda oluşan travmatik omurilik hasarına benzer bir hasar oluşturulabilmektedir. Ucuz, kolay elde edilebilir, insan ile anatomik benzerlik ve dayanıklılık deney hayvanı olarak sıçanların kullanımını avantajlı kılmaktadır. Sıçanlarda omurilik hasarı oluşturan tekniklerden olan, ağırlık düşürme, klip kompresyon, ekstradural balon kompresyon metodları 1983 yılında Khan ve Griebel tarafından karşılaştırılmıştır (21). Bu çalışmada klip kompresyon modelinin tam bir laminektomi gereksinimine rağmen en iyi yöntem olduğu ortaya konmuştur.

2.6. Omurilik Yaralanmalarında Patofizyoloji

Omurilik travmasında doku hasarı iki mekanizmaya bağlı olarak gerçekleşir

- a. Birincil omurilik hasarı
- b. İkincil omurilik hasarı (1)

2.6.1. Birincil Omurilik Hasarı

Omurilikte oluşan birincil hasar mekanik zedelenmeye bağlı travma esnasında gerçekleşen hasardır. Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon, rotasyon ile ilgili kuvvetlerin tümü ve penetran yaralanmalar, omuriliğin kendisinde, zarlarında, ligamentlerinde veya damarlarında gerilme ya da yırtılmalara neden olurlar. Bunların dışında kemik yapılarının, kopan ligament parçalarının ve kanal içi hematoma oluşturduğu bası etkisi diğer mekanik etkiler olarak sayılabilir (22, 23). Yukarıda saydığımız kuvvetler yalnızca travma sırasında oluşan akut etkilerle değil, daha sonra oluşan posttravmatik kifoz gibi kalıcı deformitelere bağlı olarak, kronik dönemde omuriliği yaralamaya devam edebilir. Omurilik üzerinde oluşan hasarın boyutları omurilik kanalının boyutları ile de ilgilidir. Kanal içindeki görece geniş

alanlar mekanik travmaya karşı bir tampon işlevi görürken, görece dar alanlarda böyle bir destek yoktur (24).

Birincil omurilik hasarının dört tipik mekanizması vardır.

- a. Persistan kompresyon ve darbe
- b. Transient kompresyon ile darbe
- c. Distraksiyon
- d. Laserasyon ve transeksiyon

Persistan kompresyon ve darbe birincil omurilik hasarındaki en yaygın ve ilk oluşan travma mekanizmalarıdır. Bu durum, omurganın patlama kırıklarında, akut disk yırtıklarında, omurganın dislokasyonlarında ortaya konmuştur. İkinci sırada olan geçici kompresyon ile darbe dejeneratif servikal omurga hastalığı olan kişilerde hiperekstansiyon yaralanmalarında meydana gelir. Üçüncü sıradaki distraksiyon, omuriliği aksiyel planda geren kuvvetlerin oluşturduğu mekanizmadır. Omuriliği ya da onun damarsal yapılarını gererek yırtılmasına sebep olan fleksiyon, ekstansiyon, rotasyon ve dislokasyon kuvvetlerinden kaynaklanır. Radyolojik olarak bir patoloji izlenmezken ortaya çıkan klinik durumun altında yatanın bu tip bir yaralanma olabileceği akıldan çıkarılmamalıdır. Çocuklarda ise kas ve vertebra kemik yapısının gelişmemiş olması, ligamentöz bağların gevşek olması bu tip travmaların ortaya çıkmasında predispozan faktörlerdir. Dördüncü ve son mekanizma, ateşli silah yaralanması, keskin kemik parçalarını dislokasyonu ve ileri derece distraksiyondan kaynaklanan laserasyon ve transeksiyondur. Klinikte, komplet transeksiyondan minör yaralanmaya kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkar (25).

2.6.2. İkincil Omurilik Hasarı

Omurilikte birincil yaralanma sırasında, aksonal ve nöral nekroz, enfarkt, ödem, kanama ve bunların sonucu olarak demiyelinizasyon gibi patolojik sonuçlar ortaya çıkar. İkincil yaralanma mekanizmalarından üzerinde en fazla durulan vasküler değişiklikler, serbest radikal teorisi, enflamasyon, spinal şok, hücre içi Ca^{+2} artışı, endojen opioidler, apoptoz teorileridir (23, 26). İkincil yaralanma 1911 yılında ilk kez Allen tarafından tanımlanmıştır. Allen köpeklerde yaptığı çalışmada myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin çıkarılmasının düzelme sağladığını göstermiş, hemorajik nekrotik materyalde zararlı bir biyokimyasal faktörün varlığından bahsetmiştir. Bu çalışma travma sonrası ikincil hasarın ilk deneysel ispatıdır. Bu çalışmada Allen, köpeklerdeki patolojik süreci de açıklamıştır (23, 26). İlk yaralanmanın ardından, 15 dakika içerisinde beyaz cevherde ödem, gri cevherde peteşiyal tarzda kanamalar gözlenir. İkinci saatte gri cevherdeki kanama odaklarında artış, dördüncü saatte şişmiş silindir eksenleri izlenir. Altı gün sonra ileri derecede nekroz olduğu gösterilmiştir (23,26).

Omurilik hasarını akut, subakut ve kronik dönem olmak üzere üç gruba ayırarak incelemek mümkündür.

Spinal şok, aksonal yaralanma, nöral nekroz, damarsal yapılarda kopma, iskemi, ödem, iyonik dengede bozulma, nötrofil infiltrasyonu ile karakterize ilk 72 saatlik süreç akut dönem olarak adlandırılır.

Yaralanmanın yedinci gününden sonraki dönem subakut dönem olarak adlandırılır. Bu dönem inflamasyonun olduğu dönemdir. Oksidatif stres, oksijen radikallerinin oluşumu, lipid peroksidasyonu, makrofaj ve lenfositlerin yaralanma sahasına migrasyonu gözlenir.

Son dönem olan kronik dönem ise, yaralanmadan birkaç hafta sonra başlayan dönemi kapsar. Kronik dönemde demiyelinizasyon, oligodentrositlerin apoptozu, aksonal rejenerasyonda bozulma, glial hücrelerin oluşturduğu fibrozis izlenir (27).

İlk travmadan yaklaşık 20 dakika sonra başlayan eritrositlerin damar dışına çıkmaları 24. saatte en yüksek seviyeye ulaşır. Travmatik dokudan salınan kemokin ve sitokinlerin vasküler geçirgenliği, inflamasyonu artırmasıyla yaralı dokuda ödem ve staz oluşur. Granülosit ve monositler yaralı dokuya göç ederler (28). Akut dönemde yaralı bölgeye öncelikle IL-8, interferon-gamma (IFN- γ), kompleman-5a (c-5a) gibi maddeler tarafından uyarılan nötrofiller ulaşır. Nötrofiller hem TNF- α , proteazlar, elastazlar, myeloperoksidazlar (MPO) ve reaktif oksijen ürünleri (reactive oxygen species=ROS) (süperoksitler, hidroksil radikalleri, kloraminler gibi) sentezleyip salarlar hem de fagositozda görevlidirler. Travmayı takip eden ilk haftanın sonunda monosit ve makrofajların ortamda arttığı görülür. Tıpkı nötrofiller gibi hem fagositozda görevlidirler hem de TNF- α , IL-1 β , NO, prostaglandinler (PG) ve lökotrienler sentezleyip salarlar. Ortamda önemli görevler üstlenen makrofajlar M1 ve M2 olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bunlar arasındaki fark, M1 makrofajlar inflamatuvar cevabın oluşmasını sağlayan TNF- α , IL-1 β salınımda ve fagositozda görevli iken, M2 makrofajlar IL-10, IL-1RA, kemokinler sentezler. Ayrıca M2 makrofajlar remodelling de görev üstlenirler. Bütün bunlar olurken ortamda mikroglia hücrelerinde de artış izlenir. Mikroglia beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sisteminde bir glial kökenli hücre grubudur. Mikroglialar beyindeki hücrelerin 10-15%'ini oluşturur. Mikroglialar da tıpkı makrofaj hücreleri gibi bağışıklık sisteminin bir elemanı olarak çalışırlar. Nöronal herhangi bir hasar olduğu zaman bu hücreler dinlenme durumundan aktif forma dönüşerek ilgili

bölgeye göç ederler. Beynin bir bölgesinde plaklar, hasarlar, istenmeyen nöron veya sinapslar oluşursa mikroglialar bölgeye intikal eder ve gerekli operasyonları başlatırlar. Bir diğer önemli hücre grubu astrositlerdir. Omurilik yaralanması olan hastaların serumlarında ilk bir haftada yüksek düzeylerde ölçülen CXCL1 omurilik astrositleri tarafından IL-1 reseptörleri altında sentezlenir ve salınır. Santral sinir sistemi yaralanmalarında NF- κ B kinase- β alt ünitesinin inhibitörünün engellenmesinin CXCL1 sekresyonunu nötralize ettiğini ve böylece nötrofil fonksiyonlarını azalttığı ve doku korunmasının ve nöronal motor fonksiyonların iyileşmesinin artırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (27). Ancak yapılan yeni çalışmalar nötrofillerin daha sonra gelecek olan lökositler için öncül olmalarının yaralanmanın geç dönemlerinde bu lökositler tarafından gerçekleştirilecek doku onarımı ve aksonal rejenerasyon için çok gerekli olduklarını göstermektedir. Bu doku onarımında özellikle makrofajlardan salınan doku büyüme faktörü-1beta (tissue growth factor=TGF-1 β) hem nöronlar için faydalı etkilere sahiptir ve hem de oligodendrosit toksisitesini azalmada etkilidir. Santral sinir sistemi makrofajları ve mikrogliaları bir yandan glutamat eksitotoksitesini azaltırken diğer yandan yaralı aksonun büyümesini de düzenlemektedir. Yaralanmanın kronik döneminde ortama lenfositler de gelmeye ve sitokin salmaya başlarlar ancak bunların sayısı diğer inflamatuvar hücrelere göre daha düşüktür. Özellikle önce gelen T lenfositler hem kemoatraktanlar sentezleyip salarlar ve hem de otoimmün bir cevabın ilk aşamalarında yer alırlar. Bu T lenfosit göçünü B lenfositler takip eder ve bunlar santral sinir sistemine karşı olan otoantikolar sentezleyip salarlar (28). İkincil omurilik hasarındaki mekanizmalar aşağıda başlıklar halinde özetlenmiştir.

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi

Kan basıncında kısa süreli artış, sonra uzun süreli hipotansiyon

Periferik dirençte azalma

Kardiak debide azalma

Omurilik dolaşımında lokal vasküler hasar

Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma

Özellikle gri cevherde hemoraji

Mikrodolaşımda kayıp (mekanik, tromboz, vazospazm)

Biyokimyasal değişiklikler

Serbest radikal üretimi

Lipid peroksidasyonu

Eksitotoksitite (glutamat)

Nörotransmitter birikimi

Ketokolaminler (noradrenalin,dopamin)

Araşidonik asit salınması

Eikazanoid üretimi

Prostaglandinler

Endojen opioidler

Sitokinler

Elektrolit dengesindeki değişiklikler

İntasellüler kalsiyumda artış

Ekstrasellüler potasyumda artış

İntrasellüler sodyumda artış

İnflamatuvar cevap

Serbest radikal üretimi

Makrofajlar

Aksonal yıkım ve miyelin artıklarının salınımı

Sitokinlerin salınması

Glial hücre aktivasyonu

Oligodensitlerde sitotoksik etkiler

Wallerian dejenerasyonu

Ödem

Apoptozis

Enerji Metabolizmasında kayıp

ATP üretiminde azalma (29)

2.6.3. Myeloperoksidasyon Mekanizmaları

Monosit ve nötrofil hücrelerindeki granüllerde bulunan myeloperoksidazlar, 146 kDa ağırlığında, homodimer yapısında bir protein yapılı moleküldür. Myeloperoksidazlar, monosit ve nötrofil öncülleri olan promyelosit ve promonositlerde sentezlenmeye başlar, ancak insanlarda ana üretim yeri nötrofillerdir. Travmanın akut fazında ortama gelen ilk bağışıklık hücreleri olan nötrofiller sitokin ve kemokinler salgılayarak makrofaj, monosit ve dentritik hücrelerin yaralı dokuya migrasyonunu sağlarlar. Nötrofillerin primer granüllerinde myeloperoksidazlar ile beraber katepsin-G, proteinaz 3, elastaz, nötral serin proteazlar, lizozomal hidrolaz ve defensin gibi pek çok proteolitik enzimler bulunur. Bu enzimler granüllerin içinde inaktif ve yüksek pH değerlerinde depolanırlar. Travma, enfeksiyon gibi nötrofilleri aktive eden bir durum olduğunda hücre membranında bulunan NADPH oksidaz enzimi aktifleşerek süperoksitleri,

süperoksitler ise süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivasyonuna ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (30). Myeloperoksidaz enzimi, H_2O_2 ile klorürden hipoklorik asit oluşumunu katalizler ve hipokloritler, kloraminler, hidroksil radikalleri, superoksitler, ozon gibi oksidanların oluşmasını sağlar (31). Oluşan bu oksidanlar protein yapıların özellikle tirozin bölgelerini hedef alırlar. Reaksiyon sonucunda oluşan 3-klorotirozin, 3,5-diklorotirozin molekülleri myeloperoksidaz aktivitesi için belirteç görevi görürler. Bunların yanısıra, myeloperoksidazlar makrofajlardan TNF- α ve IFN- γ salınımına ve makrofajların fagositoz ve öldürme aktivitelerinde artışa sebep olur. Yine bu etkileşim kronik inflamatuvar hastalıkların oluşum mekanizmalarında da yer alır. Myeloperoksidaz molekülü, lökositlerin migrasyonunu, infiltrasyonunu ve adhezyonlarını da etkiler. Ayrıca nötrofillerin adhezyon, aktivasyon ve yaşam sürelerinin ve inflamasyonun zamansal sürecinin belirlenmesinde de myeloperoksidaz aktivitesinin yeri vardır (27).

2.6.4. Lipid Peroksidasyon Mekanizmaları

Daha çok lipid moleküllerinden oluşan hücre membranının yıkım süreci olarak da tarif edilen lipid peroksidasyon mekanizmaları serbest oksijen radikalleri ile hücre zarındaki fosfolipidlerin reaksiyona girmesi ile başlar (32). Lipid peroksidasyon mekanizmasını tetikleyen ise oksidatif strestir. Lipid radikalleri, serbest radikalın poliansature yağ asitlerinin metil karbonundan bir hidrojen atomu koparması ile oluşur. Daha sonra oksijen atomu ile reaksiyona girerek peroksil radikalini oluşturur. Peroksil radikali ise hücre membranını oluşturan poliansature yağ asitleri ile reaksiyona girmeye devam ederek hücre membranının yapısı bozulur ve bu süreç hücreyi ölüme götürür. Ratlarda yapılan deneysel omurilik hasarı çalışmalarında lipid peroksidasyon düzeylerinin iki defa pik yaptığı gösterilmiştir.

İlki yaralanmayı takip eden 6. saatte olurken, diğeri 24. saatten sonra olmakta ve yaklaşık 120 saat boyunca devam etmektedir. İkinci artışın ortamda artan nötrofillerden ve makrofajlardan salınan sitokinlerin, myeloperoksidaz ve reaktif oksijen ürünleri gibi faktörlerin sonucu olduğu düşünülmektedir (33).

2.6.5. Araşidonik Asit Metabolizması

Ca^{+2} bağımlı proteazlar ve kinazlar hücre membranını tahrip ederler. Araşidonik asit fosfolipaz A2'nin membran fosfolipidlerini hidrolize etmesi sonucu oluşur. Lipaz, lipoksijenaz ve siklooksijenazların (COX) aktive olması, araşidonik asidin tromboksan, prostaglandin ve lökotriene dönüşmesini sağlar (25, 34). Bu dönüşüm dakikalar içinde gerçekleşir. Na^{+}/K^{+} ATPaz pompasının inhibe olması ve dokuda oluşan ödem araşidonik asit seviyelerinde 24 saat sonra yükselmeye sebep olur. Böylece COX-1'in birikimi izlenir. Bunun sonucu olarak lokal kan akımında yavaşlama, vazokonstrüksiyon, trombositlerin agregasyonu görülür. Oluşan bu inflamatuvar yanıt lipid peroksidasyonuna, serbest radikallerin oluşumuna ve membran hasarına neden olur. Bu kaskad endojen antioksidanlar olan SOD ve alfa tokoferol tarafından durdurulur (25).

Hücre içindeki iyonik dengenin Ca^{+2} lehine bozulması, membran ilişkili fosfolipazları aktiveleştirerek araşidonik asit salınımına neden olur. Artan hücre dışı eksitatör nörotransmitterler nöronal aktivasyonu tetikler. Böylece COX-2'nin salınması sağlanır. Öte yandan aktive olmuş nötrofillerden ve makrofajlardan da COX-2 enzimi eksprese olur ve bu da COX-2 enzim seviyesinin artışına katkıda bulunur. İnflamasyon ve oksidatif stres basamaklarında önemli bir rol oynadığı ve yaralanmalarda süperoksit anyonlarını (hidroksil radikalleri gibi) oluşturarak ve bunlar üzerinden lipid peroksidasyon, protein ve DNA yıkımlarına sebep olarak nöronal hücrelerde hasar ve ölüme katkıda bulunduğu gösterilmiştir (30).

2.6.6. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olarak isimlendirilen apoptoz, hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde izlenir. Canlılarda gelişim sürecinde (parmakların oluşumu gibi), hemostazda ve hastalıklarda istenmeyen hücrelerin yok edilmesinde görev alır. Siklosporin-A ve FK 506 gibi fosfataz inhibitörleri apoptozisi önler. Glukokortikoidler programlanmış hücre ölümünün bazı formlarını önleyebilir (35). Apoptozis farklı iki yolla aktive olabilir.

- a. Reseptör bağımsız ya da intrinsik yol
- b. Reseptör bağımlı ya da ekstrinsik yol

Reseptör bağımsız yol hücre içi sinyallerle aktive edilir. Bu yüzden intrinsik yol olarak da isimlendirilir. Bu yolun aktive olması omurilik hasarı sonrası nöronlarda tanımlanmış ve artan hücre içi Ca^{+2} miktarının mitokondri hasarını, sitokrom c salınımını ve alternatif programlı kaspaz aktivasyonunu tetiklediği düşünülmüştür. Kaspaz-9'un aktive olması için sitokrom c ile apoptoz aktivasyon faktör birleşerek, kaspaz-6 ve 3 aktive edilir (25).

Reseptör bağımlı yol ya da ekstrinsik yolda TNF ailesi ve reseptörleri rol alırlar. Aktive olan kaspaz-3 ise kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder. Bu aktivasyon da sitoplazmik ve nükleer apoptotik süreci başlatır. Burada hem sitoplazmik proteinlerde ve hem de nükleer DNA' da kesilmeler (cleavage) ve fragmentasyonlar meydana gelir ve hücre yaşamsal aktivitesini devam ettiremeyerek programlanmış ölüme gider. Kaspaz-3 aynı zamanda bir interlökin dönüştürücü proteazdır (36, 37).

2.6.7. Omurilik Hasarında Bazı Sitokinler

TNF- α : Omurilik hasarında ve sonrasında nötrofillerden, trombositlerden, mast hücrelerinden, fibroblastlardan salgılanan proinflamatuvar sitokin grubundan

bir moleküldür. TGF-1 β üzerine baskılayıcı özelliğindedir. Bunun yanında kollajen üretiminin azaltılması, neovaskülarizasyon ve reepitelizasyonda görevlidir (38).

IFN- γ : TNF- α ile benzer özelliklere sahip bir moleküldür. T lenfositlerden ve natürel killer hücrelerinden salınan proinflatuar bir sitokindir. TGF-1 β üzerine baskılayıcı özelliğindedir. Antifibrotik ve kollajen üretimini azaltıcı etkiye sahiptir (38).

TGF-1 β : Trombositlerde, makrofajlarda, mast hücrelerinde, fibrositlerde ve fibroblastlarda sentezlenip salınan dimerik yapılı bir proteindir. Nötrofilleri, makrofajları ve fibroblastları uyararak fibrozisi arttırdığı gibi mezenşimal hücreleri uyararak da hücre proliferasyonunu, neovaskülarizasyonu, proteoglikan üretimini artırır. Yaralanmadan hemen sonra salınımı başlar. Matriks metalloproteinazları inhibe ederken, proteaz inhibitörlerini de indükler (38, 39).

2.7. Omurilik Yaralanmasında Medikal Tedaviler

Omurilik yaralanmasında medikal tedaviler ana olarak 3 alt başlığa ayrılmaktadır (40).

2.7.1 Akut Tedaviler

Akut tedaviler nöroprotektif tedavileri içerir ve dört gruba ayrılırlar

- a- Antioksidanlar
- b- Nörotransmitter reseptör blokerleri
- c- Fosfokinaz stimulatörleri
- d- Fosfataz inhibitörleri

2.7.2. Kronik Tedaviler

Kronik tedaviler, rejenerasyon ve remiyelinizasyon yoluyla fonksiyonların restorasyonunu sağlarlar.

Restoratif tedavi üç kategoride incelenir.

- a- Büyümei inhibe eden faktör blokörleri
- b- İntraselüler haberci modölatörleri
- c- Nakledilebilen hücreler veya materyaller

2.7.3. Omurilik Hasarında Potansiyel Etkili Olabilecek İlaçlar

- Metilprednizolon (MP)
- Gangliozid
- Larazoidler
- Opiyat antagonistleri
- Eksitator aminoasit antagonistleri
- Kalsiyum kanal blokörleri
- Potasyum kanal blokörleri
- Serbest radikal tutucuları
- Antiinflamatuar ajanlar
- Nörotransmitter reseptör agonistleri
- Nörotropik faktörler
- Fetal doku transplantasyonu
- Nötralizan antikolarlar
- Melatonin
- Hiperbarik oksijen
- Sistemik hipotermi
- Minosiklin
- Eritropoetin (40).

2.7.4. Metilprednisolon

Metil prednizolon sentetik bir glukokortikoid ilaçtır. Beyin ödemi ve omurilik yaralanmasında uzun zamandır kullanılmaktadır (41). Erime noktası 232,5 °C, molekül ağırlığı 374.48 g/ mol ve kimyasal formülü C₂₂H₃₀O₅ olan metil prednizolonun asetat, sodyum süksinat ve hemisüksinat tuzları bulunmaktadır.

Metilprednisolonun nöroprotektif etkisinin esas mekanizmasının omurilik hasarı sonrası oluşan lipid peroksidaz inhibisyonu üzerinden olduğu düşünülmektedir. Bu etki sayesinde biyolojik membranın yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü korunur. Çalışmalar göstermektedir ki sıçan omurilik kompresyon yaralanması tedavisinde metilprednisolon verilmesinin ardından MDA düzeylerinde belirgin düşme meydana gelmiştir. Buna rağmen hasar görmüş dokunun yenilenmesi veya işlevinin geri kazanılması üzerine bir etkisi olmadığı bildirilmiştir. Hücre içi ve hücre dışı kalsiyum akımını stabilize ederek hücrenin asit-baz dengesinin yeniden oluşmasına yardımcı olur. Na⁺/ K⁺ ATPaz aktivitesinin tekrar oluşumunu sağlar. Lezyon yerinde sodyum ve su tutulumunu azaltır ve potasyum kaybını önler. Yüksek doz metilprednisolonun omurilik kan akımını arttırarak nörolojik kayıpları azalttığı bildirilmiştir. NASCIS II protokoluna göre omurilik yaralanması sonrası ilk 8 saat içerisinde 30 mg/ kg dozunda 15 dakika içinde yükleme ve takiben idame tedavisinde 5.4 mg/ kg dozunda 23 saat süreyle infüzyon halinde uygulanan metilprednisolonun morbidite ve mortaliteyi azalttığı izlenmiştir (6, 42). NASCIS III çalışmasına göre yaralanma sonrası ilk 3 saat içinde tedaviye alınan ve tedavi protokolu 48 saat sürdürülen hastalarda sonuçların daha iyi olduğu bildirilmiştir (43, 44).

Günümüzde yapılan çalışmalarda metilprednisolonun iyileştirici etkisi tartışılmasına rağmen omurilik hasarının tedavisine yönelik olarak klinikte halen kullanılan tek tedavi seçeneği yüksek doz sistemik metilprednisolon olmuştur (33).

2.7.5. Levetirasetam

Levetirasetam 2000 yılında klinik kullanıma girmiş, α -etil-2-okso-1-pirolidin asetamidin S-enantiomeri, pirasetamın etil analogunun S-kimyasal bileşeni olan antiepileptik bir ilaçtır. Diğer antiepileptik ilaçlarla kimyasal benzerliği bulunmamaktadır (45,46).

Levetirasetamın antiepileptik etki mekanizması hala tam olarak açıklanamamış olsa da yapılan *in vitro* çalışmalarda N-tipi yüksek voltajlı kalsiyum kanallarını kısmi olarak kapatıp hücre içi kalsiyum seviyesini azaltarak ve gamma-aminobutirik asit (GABA) ve glisin ile düzenlenen akımlardaki azalmayı kısmen tersine çevirerek etki ettiği gösterilmiştir (45, 47, 48).

Karaciğer tarafından metabolize edilmediği için karaciğer yetmezliği olanlarda kullanılabilir. Ayrıca fenitoinin bir yan etkisi olan karaciğer enzimlerini indüklemesi levetirasetam da görülmez. Plazma proteinlerine bağlanma oranı düşük olduğundan, diğer antiepileptik ilaçlarla alındığında etkileşime girmez. 2 gün içinde kararlı plazma düzeyine ulaşmaktadır. Vücuda alınan miktarın % 66-76'sı değişmeden böbrekler tarafından idrar ile atılmakta ve % 27'si aktif olmayan metabolitlere dönüşmektedir. Yarılanma ömrü 7 saat olup böbrek yetersizliğinde bu süre uzamaktadır (45, 47). Yapılan çalışmalarda levetirasetamın tedavi dozunun birkaç kat üstünde dahi nöron ölümüne neden olmadığı ve bu durumun fenobarbital, fenitoin, valproat gibi geleneksel antiepileptik ilaçlara göre önemli bir üstünlük olduğu ileri sürülmüştür.

Yapılan hayvan deneylerinde levetirasetamın antiepileptik etkisinin yanında nöroprotektif olduğu da gösterilmiştir (49). Ratlarda deneysel olarak oluşturulan

beyin hasarının etkilerinin levetirasetam ile gerilediği gösterilmiştir. Hanon ve ark. ratlar üzerindeki deneysel çalışmalarında levetirasetamın antiepileptik etkisinin yanında epilepsi gelişimini (epileptogenezis) de önlediğini bildirmişlerdir (50). Oliver ve ark ise yaptıkları çalışmada ratlarda pilokarpin ile indüklenen epilepside, levetirasetamın hipokampüste lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi azaltıcı etkisi olduğunu göstermişlerdir (51). Kim ve ark status epileptikus oluşturulmuş yenidoğan sıçanlardaki çalışmasında levetirasetamın yüksek dozlarda beyin dokusunda apoptozisi önlediği histopatolojik olarak tespit edilmiştir (52).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Çalışmanın tamamı Kırıkkale Üniversitesi Etik Kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler doğrultusunda ve gerekli onay alındıktan sonra yürütüldü (Karar tarihi:31.03.2016 ve Karar numarası: 16/43).

Ayrıca bu tez alışması Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından finansal açıdan desteklendi (Proje Numarası: 2016/ 102).

Deneysel araştırma protokolunda iki farmakolojik ajan test edildi ve isimleri aşağıda sıralandı:

- Metil prednizolon (Depo-Medrol®, Pharmacia&Upjohn Company, Kalamazoo, USA)
- Levetirasetam (Netrolex, Sanovel İlaç Sanayi ve Tic. A.ř., İstanbul, Türkiye)

Yukarıda adı geçen farmakolojik ajanların omurilik yaralanmasının fizyopatogenezine etkilerinin test edilmesi için bu deneysel çalışma 300-350 gram ağırlığında ve erkek cinsiyette 48 adet Wistar Albino rat üzerinden yürütüldü. Ratlar randomize şekilde kontrol grubu, akut dönem ve subakut dönem olmak üzere üç ana gruba ayrıldı. Gruplar aşağıda belirtildi:

- KONTROL grubu (hiçbir omurilik yaralanması ve/ veya farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 6)

Akut dönem (omurilik yaralanmasının ilk 3 günü) üç alt grupta incelendi:

- SHAM-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 6)
- MP-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve 30 mg/kg dozda metil prednisolon intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)
- LV-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve levetirasetam 5 mg/ kg intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)

Subakut dönem (omurilik yaralanmasının ilk 7 günü) üç alt grupta incelendi:

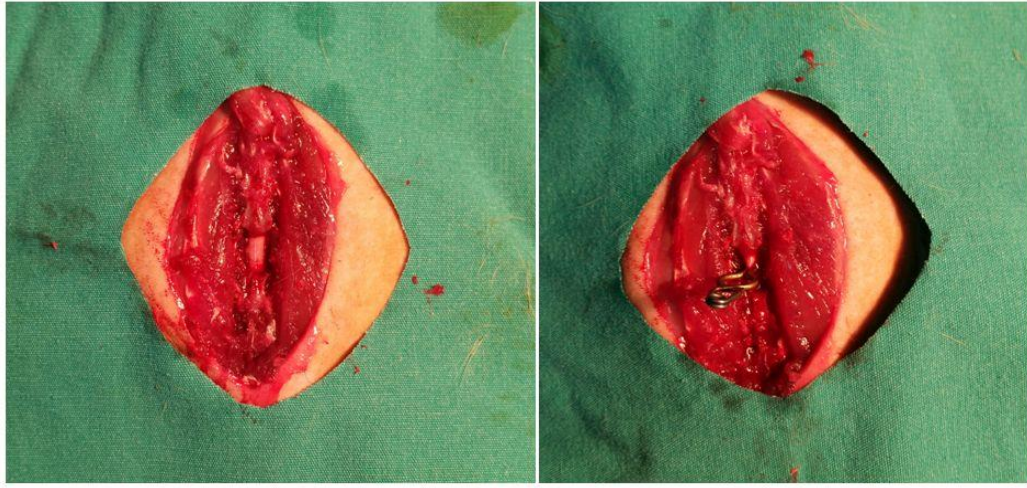
- SHAM-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 6)
- MP-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve 30 mg/kg dozda metil prednisolon intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)
- LV-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve levetirasetam 5 mg/ kg intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)

Sedasyon anestezi için intraperitoneal yoldan 40 mg/ kg ketamine HCl (KetalarR; Pfizer Inc, USA) ve 5 mg/ kg xylazine HCl (RompunR %2; Bayer HealthCare AG, Germany) kullanıldı.

3.2. Omurilik yaralanması modeli

Deney modeli medikal literatürde tarif edilmiş ve omurilik hasarı oluşturulmasında metot olarak kabul görmüş olan omuriliğin geçici vasküler anevrizma klip (temporary vascular aneurysm clip) ile kliplenmesi yoluyla oluşturulan “omurilik kompresyonu metodu” kullanıldı (20). KONTROL grubunda yer alan denekler hariç olmak

üzere diğer tüm deney hayvanlarına intraperitoneal yoldan 40 mg/ kg ketamine HCl ve 5 mg/ kg xylazine HCl verildi ve sedasyonel anestezi uygulandı. Takiben denekler prone pozisyonda yatırılarak sırt kısımlarının orta hattı derisine yaklaşık 5-7 cm uzunluğunda cilt kesisi yapıldı ve omurga etrafını saran kaslar diseke edildi. Daha sonra torakal 7 ve 8 omurgalar ortaya kondu ve bu omurgalara dura matere zarar verilmeden “total laminektomi” yapıldı ve açığa çıkarılan omurilik segmentine omuriliğin tamamını komprese edecek şekilde 60 saniye süre ile “geçici vasküler anevrizma klibi (Mizuho® Aneurysm Clip, Mizuho, Japan)” konularak omurilik kompresyon yaralanması oluşturuldu.



Resim 1: Omurilik yaralanmasının deneysel olarak oluşturulma aşamalarına ait makroskopik görüntü

Yaralanma oluşturulduktan sonra vasküler klip yerinden alınıp cerrahi katlar anatomiye uygun olacak şekilde kapatıldı (Resim 1). Takiplerinde tüm deney hayvanlarının deneye katılmasında lökomotor kayıp oluşması ön koşul olarak kabul edildi. Deneklerin cerrahi yapılan alanında veya başka yerinde ortaya çıkacak enfeksiyon, cerrahi alanın izlem sırasında açılması, yiyecek ve su alımında azalmaya ikincil genel vücut ağırlığında azalma, diğer hayvanlar tarafından cerrahi alana veya diğer vücut bölgelerine zarar verilmesi (doku kaybına neden olabilecek kadar ciddi düzeyde dişlenmesi, tırnaklanması yada yenmesi) durumunda bu denekler deney protokolünden çıkarıldı. Deney sonrası yara iyileşmesi sürecinde olumsuz ve bozucu etki oluşturma olasılığı nedeni

ile deney hayvanlarına antibiyotik ve/ veya ek doz analjezik/ anti-inflamatuar ilaç verilmedi. Deney hayvanları kendi kafeslerinde yaşatıldı ve hayvanların kafesleri içinde 12 saat gündüz ve 12 saat gece ritminde serbest su ve yiyecek ulaşımına ve serbest dolaşımına izin verildi.

Omurilik yaralanması oluşturulduktan 3 gün sonra akut döneme ait deneklere ve 7 gün sonra subakut döneme ait deneklere ve KONTROL grubundaki hayvanlara tekrar sedasyon anestezisi uygulandı. Takiben tüm deneklere laparotomi yapıldı ve abdominal aortadan tüm vücut kanı alınarak ötenazi uygulandı. Sonrasında denekler prone pozisyona alınıp eski cilt insizyonları tekrar açıldı ve laminektomi sınırları genişletilerek omuriliğin yaralanma oluşturulan segmenti en az 1.5 cm uzunluğunda seyri boyunca total olarak çıkarıldı. Elde edilen dokular histopatolojik ve biyokimyasal inceleme yöntemleri kullanılarak incelendi.

3.3. Histopatolojik inceleme

Histopatolojik inceleme için ayrılan dokular 48 saat süre ile fosfat tamponlu salin (pH=7.4) içinde %4 lük paraformaldehit ile fikse edildi. Ardından dokular alkol ve xylene serilerinden geçirilip dehidrate edildikten sonra parafin bloklara gömüldü ve bu dokulardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler rutin hematoksilin-eosin (H&E), Masson-Trikrom (MTS) ve toluidin mavisi boyama yöntemleri kullanılarak boyandı ve elde edilen preparatlar çalışma gruplarına ve araştırılan etken maddelere kör veteriner patolog tarafından binokuler mikroskop (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) altında incelendi. Hematoksilin-eosin ile boyanan preparatların incelenmesinde Black ve arkadaşları tarafından tarif edilen ve Dincel ve arkadaşları tarafından modifiye edilen puanlama tablosu kullanıldı ve omurilik hasarında oluşan “*kanama şiddeti*”, “*vakuolizasyon*” düzeyleri belirlendi (54).

- Düzey 0-3: omurilikte histopatolojik düzeyde doku hasarı yok.

- Düzeý 4-6: omurilikte hafif düzeýde nöral doku hasarı var; nöral hücre kaybına neden olmayan hafif düzeýde polimorfonükleer hücre infiltrasyonu var ve omurilik arka kolonu yaralanmadan etkilenmiş.
- Düzeý 7-9: omurilikte orta düzeýde nöral doku hasarı var ve beyaz cevher kaybına ve santral kavitasyona neden olan makrofaj ve/ veya histiyosit infiltrasyonu var.
- Düzeý 10-12: omurilikte ağır nöral doku kaybı var ve omurilik beyaz cevherinde kistik nekroz ve gliosis var.

Ayrıca elde edilen preparatlarda üç ayrı büyütme sahasındaki “*nekrotik nöronlar sayısı*” bulundu ve bunların ortalamaları alınarak kaydedildi. İlâveten MTS uygulanan preparatlarda doku iyileşme düzeyleri incelendi. Toluidin mavisi ile boyanan prepreparatlarda ise subakut döneme ait aksonal yaralanmanın şiddeti (fragmantasyon, dejenerasyon ve şişme) yukarıda tarif edilen puanlama tablosu kullanılarak değerlendirildi.

3.4.Biyokimyasal inceleme:

Biyokimyasal analiz çalışmaları için ayrılan dokular kuru hava ortamında -80°C ’de hemen dondurularak saklandı. Takiben yaralı dokulardaki malondialdehit (MDA), insülin benzeri büyüme faktörü-1beta (IGF-1 β), interferon-gamma (IFN- γ), süperoksit dismutaz (SOD), total nitrit/ nitrat (NO), ve tümör nekrozis faktör-alfa (TNF- α) düzeyleri incelenmek üzere dokular fosfat tampon salin solusyonu ile yıkandı ve buz içindeki salin solusyonunda homojenize edildi (Labor Technique, Germany). Homojenize edilmiş dokular 10 dakika süre ile $+4^{\circ}\text{C}$ ortamda santrifüj (1500 g) edildi. Santrifüjden elde edilen süpernatantta MDA değerlerini tespit etmeye yönelik Armstrong ve Al-Awadi tarafından tariflenen teknik uygulandı (55). Miranda ve ark tarafından tarif edilen yöntem kullanılarak dokularda total nitrit /nitrat düzeyi (NO) umol/ g protein cinsinden elde edildi (56). Sonuçların kalibrasyon eğrisini ölçmeye yönelik standart dilüsyonlarda 1–25 nM “1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane” (Sigma, USA) kullanıldı ve elde edilen değerler “nmol/ mg

protein” şeklinde yorumlandı. Ayrıca yine elde edilen süpernatantta IGF-1 β (pg/ mg protein) (IGF-1: Wuhan Elabscience Biotechnology Co., Ltd., Texas, USA); IFN- γ (pg/ mg protein) (IFN- γ : Thermo Fisher Scientific, MA, USA); SOD (ng/ mg protein) (SOD rat assay kit: Sunred Biological Technology Co., Ltd; Shanghai, China) ve TNF- α (pg/ mg protein) (TNF- α ; Thermo Fisher Scientific, MA, USA) düzeyleri orijinal ELİSA (enzyme linked immunoabsorbent assay) kitleri kullanılarak çalışıldı.

3.5. İstatistiksel analiz:

Çalışmada etik kurallar gereği istatistiksel analiz yapılmasına izin verebilecek minimum sayıda deney hayvanı kullanılmıştır. Diğer yandan rastgele istatistiksel sonuç elde etme riskini ortadan kaldırmaya yönelik deneyden elde edilen veriler akut dönem grupları için kendi içinde ve subakut dönem grupları için kendi içinde istatistiksel olarak incelendi. Değerlerin normal ve homojen dağılıp dağılmadığını belirlemeye yönelik verilere *Kolmogorov-Smirnov* testi ve Levene’s testi uygulandı.

Akut ve subakut döneme ait histopatolojik derecelendirme sonuçlarının karşılaştırılmasında değerlerin normal ve homojen dağılmadığı gözlemlendi. Ayrıca akut döneme ait gruplarda MDA, IGF-1 β , SOD ve TNF- α değerlerinin ve subakut döneme ait grupların IGF-1 β , SOD ve NO değerlerinin de normal ve homojen dağılmadığı gözlemlendi. Bu nedenle bu veriler için grupların istatistiksel farklılık karşılaştırmalarında *Kruskal Wallis* testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi kullanıldı. Tüm testlerde $p < 0.0083$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Diğer yandan akut döneme ait grupların IFN- γ ve SOD değerlerinin ve subakut döneme ait grupların MDA, IFN- γ ve TNF- α değerlerinin normal ve homojen dağıldığı tespit edildi. Bu nedenle bu veriler için grupların istatistiksel farklılık karşılaştırmalarında

tek yönlü varyans analizi (*One-Way Analysis of Variance; One-Way ANOVA*) testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

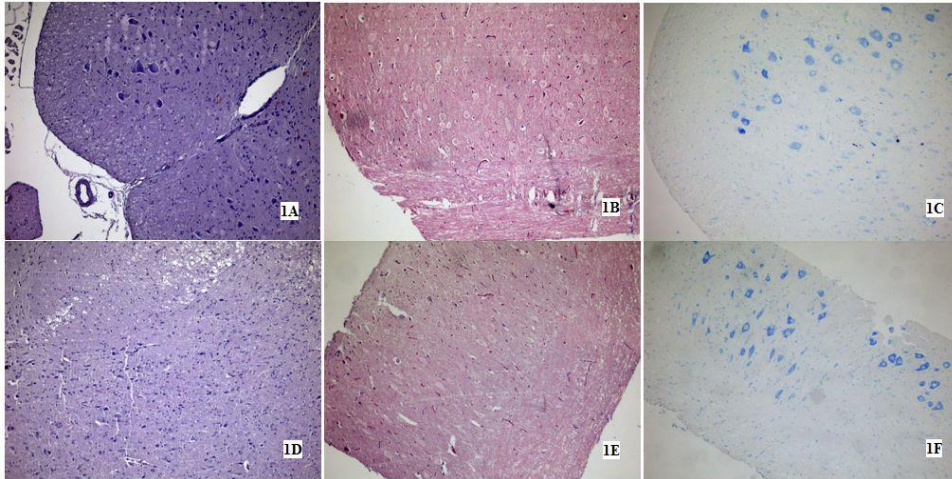
Benzer grupların (örneğin SHAM-A ve SHAM-S gibi) akut ve subakut dönemlere ait histopatolojik evreleme verilerinin istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Ayrıca benzer grupların akut ve subakut dönemlere ait biyokimyasal analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve bağımsız değişkenler *t* (*Independent Samples t*) testi kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Akut döneme ait bulgular

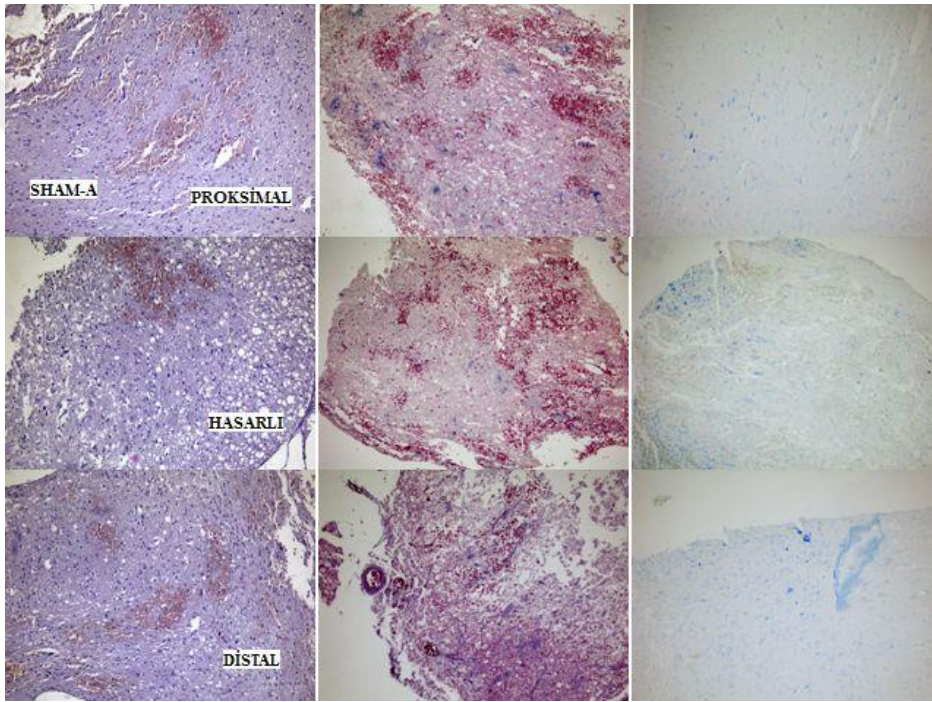
Histopatolojik incelemeler için hematoksilin-eosin, MTS ve Toluidin mavisi ile boyanan preparatlardaki bulgular birbirlerini destekler nitelikte olduğu görüldü. Dolayısıyla bulgular tek bir paragrafta birlikte değerlendirilip yazıldı.

4.1.1. Işık mikroskopisi



Resim 2: KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

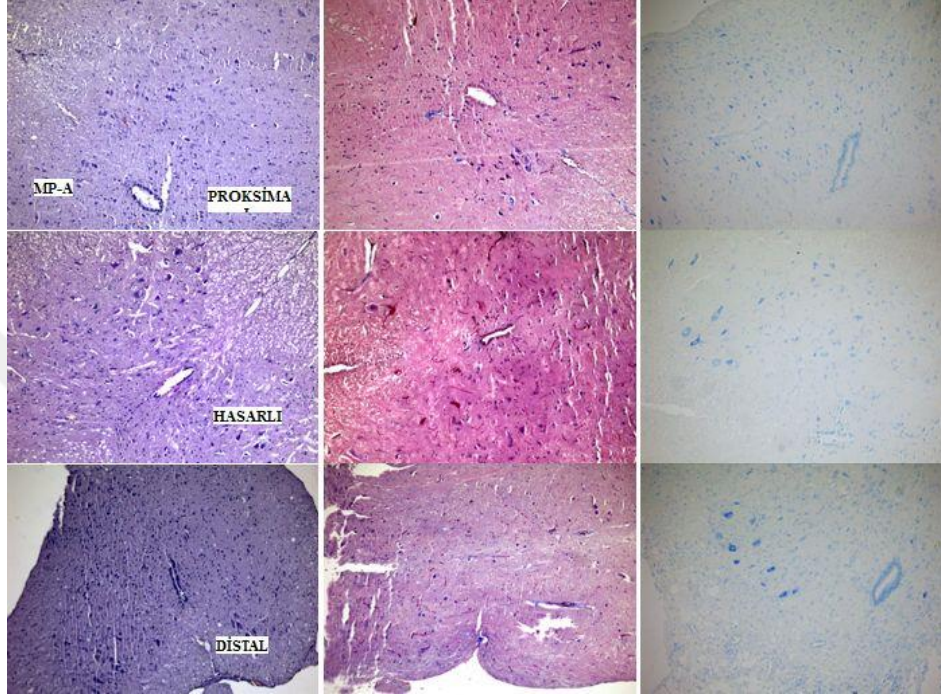
Laminektomi sonrası sakrifiye edilen kontrol grubu ratların medulla spinalislerinin normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Spinal kordun beyaz madde yapısı, aksonlar ve miyelin kılıfların normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Bununla beraber gri maddede yer alan multipolar motor nöronlar, sağlıklı hücre gövdeleri ve belirgin çekirdekçik yapısıyla da herhangi bir histopatolojiye rastlanmadı. Longitudinal kesiti görülen medulla spinalisin akson yapısı ve etrafını saran miyelin kılıflar histolojik yapıda olup herhangi bir histopatolojiye yine rastlanmamıştır (Resim 1).



Resim 3: SHAM-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

SHAM-A grubunda tüm ratlara ait medulla spinalislerde gri ve beyaz maddenin tamamen bütünlüğünün bozulduğu ve birbirleri arasındaki ayrımın kaybolduğu görüldü. Bununla beraber yaygın nöronal nekrozlar ve neredeyse tüm bölgeyi saran yoğun kanama alanlarıyla birlikte yaygın ödemin varlığı görüldü. Yine mononükleer hücre infiltrasyonları ve yaygın vakuoler makrofajlara rastlandı. Gri ve beyaz maddede şiddetli kistik kavitasyonlar da ayrıca gözlemlendi. Beyaz maddedeki miyelin kılıflarda şiddetli

dejeneratif değişiklikler ve şişmelerin oldukça belirgin olduğu görüldü. Medulla spinalisin akson yapısı bozulmuş durumda olduğu görüldü. Bunun yanında hemorajik alanlar dikkati çekmektedir. Aksonal uzantılarda kopmaların çok şiddetli olduğu görüldü.

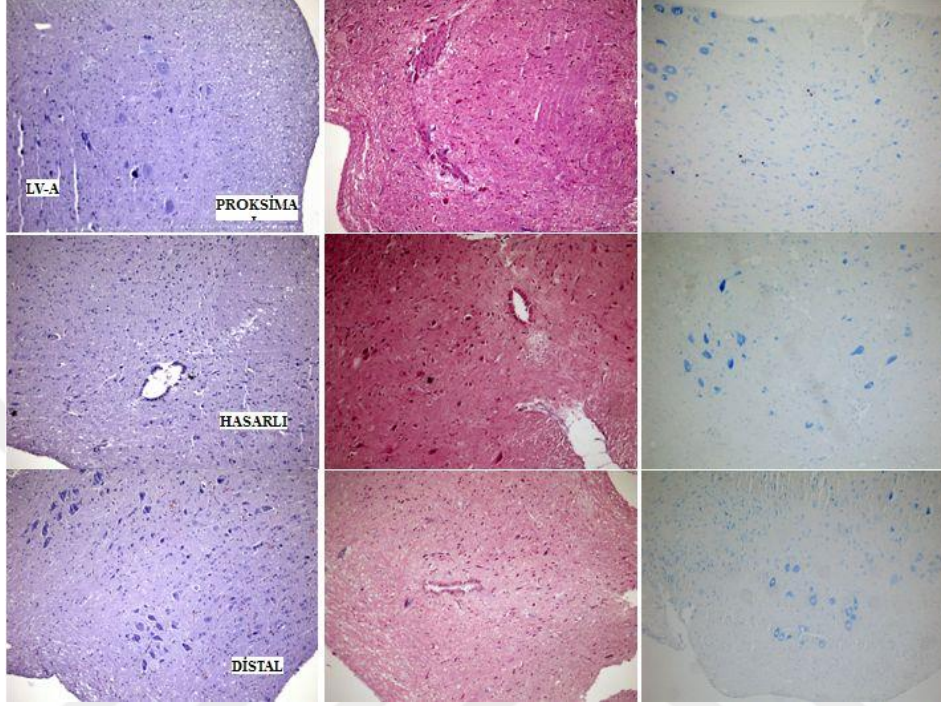


Resim 4: MP-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

MP-A grubunda genel durumun kısmen SHAM-A grubuna yakın ancak SHAM-A grubu bulguları kadar şiddetli olmadığı görüldü. Kistik kavitasyonların varlığı ve nöronal nekrozlar görüldü. Yaygın hemorajinin olmadığı ve yer yer resorbe olduğu dikkati çekti. Canlılığını sürdüren nöronlarda çekirdekçiğın belirginleşmesi ve sitoplazmik genişlemenin görülmesi gibi reaktif değişiklikler saptandı.

MP-A grubunda SHAM-A grubuna göre biraz daha ılımlı bir tablo görülmesine karşın histopatolojik bulguların yine şiddetli olduğu görüldü. Medulla spinalisin

longitudinal kesitlerinde akson yapısında dejeneratif değişiklikler ve miyelin kılıflarda şişmelerin belirgin olduğu görüldü. Aksonal uzantılarda kopmaların belirgindi.



Resim 5: LV-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

LVS-A grubunda genel durumun MP-A grubuna göre kısmen daha iyi olduğu görüldü. Histopatolojik incelemelerinde azalmış doku hasarı dikkati çekti. Yer yer çok küçük hemorajik alanlar dikkati çekti ancak geniş çapta hemorojinin resorbe olduğu görüldü. Canlılığını sürdüren nöronlarda reaktif değişikliklerin belirgin olduğu görüldü. LVS-A grubunda MP-A grubuna kıyasla tablonun daha iyi olduğu ama yinede yakın histopatolojik bulgulara rastlandı. Medulla spinalisin longitudinal kesitlerinde akson yapısında dejeneratif değişiklikler ve miyelin kılıflarda şişmeler görüldü. Aksonal uzantılarda kopmaların diğer gruplara göre daha az şiddetli olduğu tespit edildi.

4.1.2. Histopatolojik inceleme

Çalışmanın akut dönem gruplarının histopatolojik değerlendirme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve dağılım grafiği aşağıda sunuldu (Tablo 2, Grafik 1, Grafik 2, Grafik 3).

Elde edilen histopatolojik düzeylerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında kanama şiddeti ($X^2=19.775$, $p<0.001$), vakuolizasyon ($X^2=19.559$, $p<0.001$) ve nekrotik nöron sayımı ($X^2=20.465$, $p<0.001$) sonuçları arasında anlamlı düzeyde farklılık olduğu tespit edildi (Tablo 3).

Tablo 2: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların tanımlayıcı tablosu (N: denek sayısı, SD: standart sapma)

GRUP		N	Minimum	Maksimum	Medyan	SD
KONTROL	Kanama şiddeti	6	0	3	1	1.26
	Vakuolizasyon	6	0	2	0	0.84
	Nekrotik nöron sayımı	6	0	2	1	0.82
SHAM-A	Kanama şiddeti	6	9	12	11	1.21
	Vakuolizasyon	6	8	11	10	1.21
	Nekrotik nöron sayımı	6	11	14	13	1.21
MP-A	Kanama şiddeti	6	5	8	7	1.03
	Vakuolizasyon	6	4	8	7	1.47
	Nekrotik nöron sayımı	6	8	10	9	0.63
LV-A	Kanama şiddeti	6	5	8	7	1.21
	Vakuolizasyon	6	5	7	6	0.89
	Nekrotik nöron sayımı	6	8	9	9	0.55

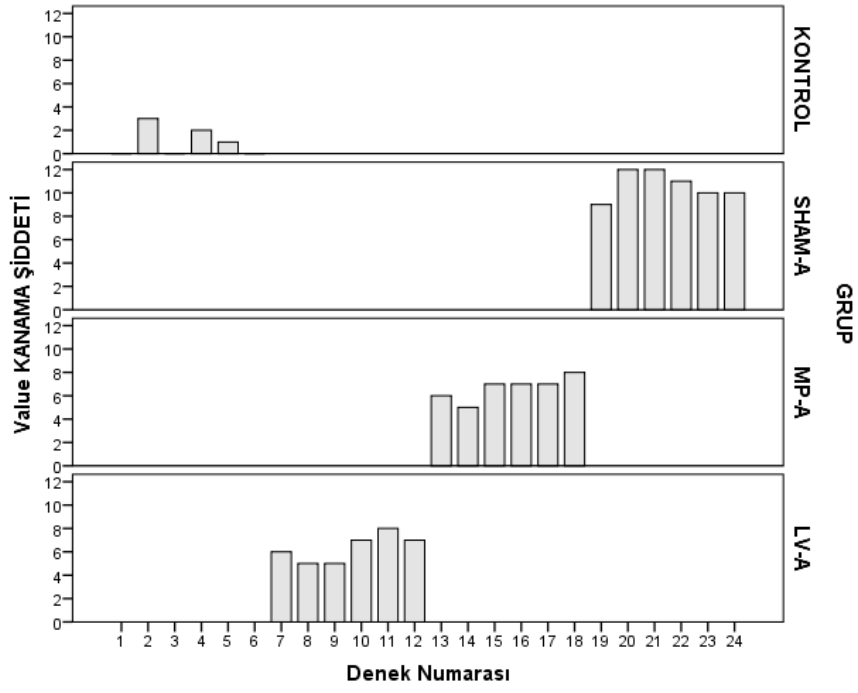
Tablo 3: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

DEĞİŞKEN	X^2	df	p
Kanama şiddeti	19.775	3	<0.001
Vakuolizasyon	19.559	3	<0.001
Nekrotik nöron sayımı	20.465	3	<0.001

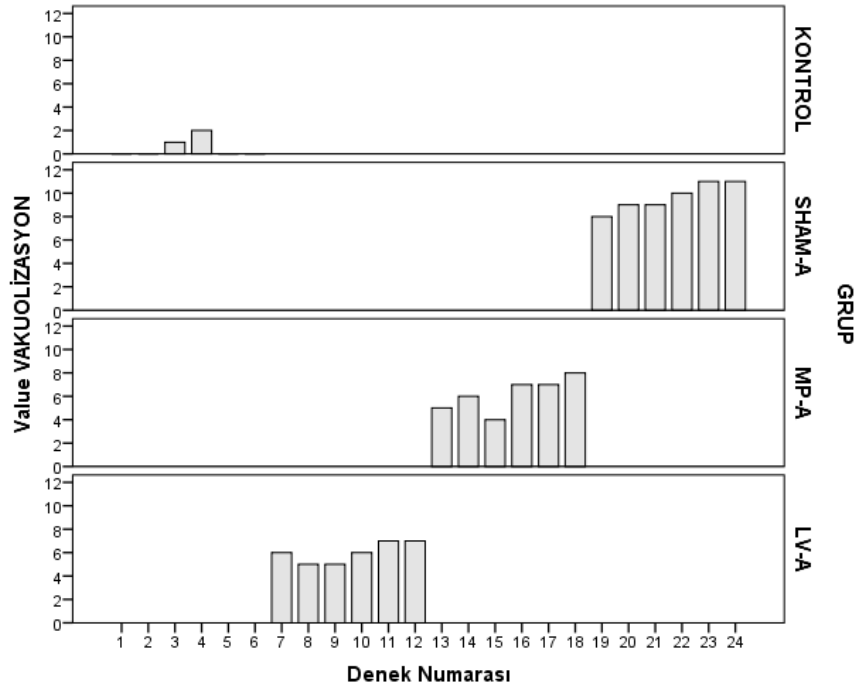
Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında gruplar arasında MP-A/ LV-A grupları hariç kanama şiddeti, vakuolizasyon ve nekrotik nöron sayımı sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi (Tablo 4).

Tablo 4: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni correction* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

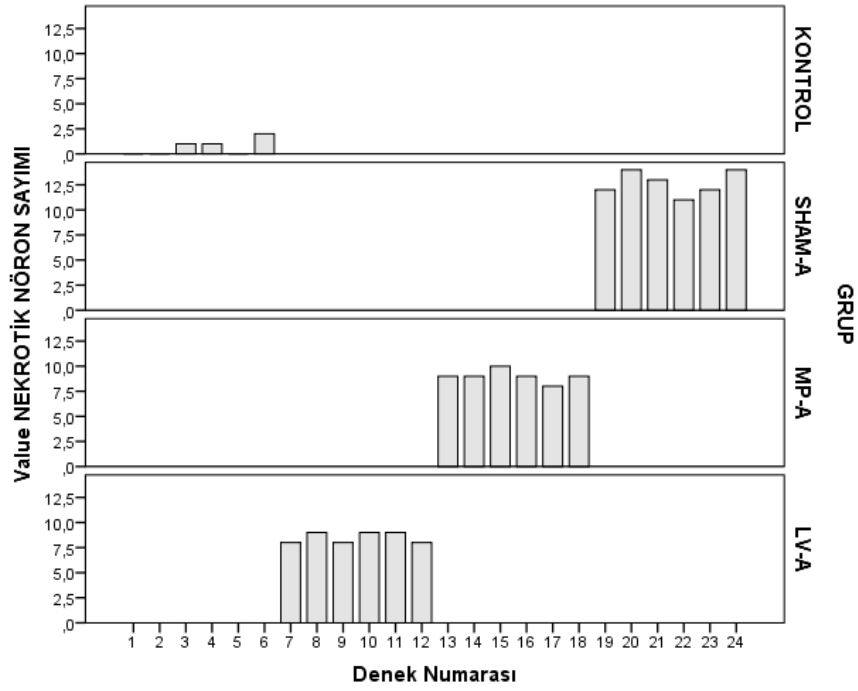
GRUP (I/ J)	Kanama şiddeti		Vakuolizasyon		Nekrotik nöron sayımı	
	Z	p	Z	p	Z	p
KONTROL/ SHAM-A	-2.913	0.004	-2.945	0.003	-2.918	0.004
KONTROL/ MP-A	-2.923	0.003	-2.939	0.003	-2.961	0.003
KONTROL/ LV-A	-2.913	0.004	-2.950	0.003	-2.950	0.003
SHAM-A/ MP-A	-2.913	0.004	-2.822	0.005	-2.945	0.003
SHAM-A/ LV-A	-2.903	0.004	-2.908	0.004	-2.934	0.003
MP-A/ LV-A	-0.504	0.614	-0.331	0.741	-1.369	0.171



Grafik 1: Akut dönem gruplarına ait kanama şiddeti düzeyi değerleri grafiği



Grafik 2: Akut dönem gruplarına ait vakuolizasyon düzeyi değerleri grafiği



Grafik 3: Akut dönem gruplarına ait nekrotik nöron sayımı sonuçları grafiği

4.1.3. *Biyokimyasal inceleme*

Çalışmanın akut dönemine ait biyokimyasal inceleme sonuçları aşağıdaki tanımlayıcı tabloda ve dağılım grafiklerinde ayrıntılı olarak verildi (Tablo 5).

Gruplar arasında IGF-1 β ($X^2=8.967$, $p=0.030$) ve TNF- α ($X^2=9.487$, $p=0.023$) değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptandı (Tablo 6).

Akut döneme ait verilerin ikili gruplar halinde yapılan karşılaştırmalarında sadece TNF- α değerleri açısından KONTROL/ MP-A grupları ($Z=-2.722$, $p=0.006$) arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 5: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait biyokimyasal bulguların tanımlayıcı tablosu (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : Interferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tumor nekrozis faktör-alfa, SD: Standart sapma)

GRUP		N	Minimum	Maksimum	Ortalama /Medyan (*)	SD
KONTROL	MDA		5.05	18.02	8.91	4.62
	IGF-1 β		14.31	123.57	76.87	35.97
	IFN- γ	6	134.94	234.49	170.59	41.45
	SOD		4.68	11.68	7.78	2.94
	NO		19.76	56.10	33.55	12.17
	TNF- α		14.48	60.31	40.36	16.32
SHAM-A	MDA		4.93	13.98	6.98*	3.29
	IGF-1 β		16.82	134.11	83.22*	46.65
	IFN- γ	6	82.32	226.80	117.35	54.29
	SOD		8.22	22.61	11.64*	5.00
	NO		12.02	64.66	33.05	21.28
	TNF- α		2.21	39.55	16.65*	13.73
MP-A	MDA		4.52	20.82	6.90*	6.38
	IGF-1 β		6.72	71.64	14.27*	25.55
	IFN- γ	6	107.75	177.71	141.80	25.71
	SOD		8.58	49.46	14.49*	15.37
	NO		9.08	53.58	25.26	19.98
	TNF- α		3.76	28.16	5.95*	9.37
LV-A	MDA		3.34	9.90	5.54*	2.47
	IGF-1 β		13.46	401.88	239.92*	157.34
	IFN- γ	6	57.02	219.27	126.66	70.78
	SOD		4.27	16.91	10.54*	4.68
	NO		7.02	95.71	29.79	36.27
	TNF- α		5.83	143.73	24.30*	50.93

Tablo 6: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait biyokimyasal bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* testi ve *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : Interferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tumor nekrozis faktör-alfa, F: F puanı. X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

Akut dönem			
DEĞİŞKEN	X^2/ F^*	df	p
MDA	2.287	3	0.515
IGF-1 β	8.967	3	0.030
IFN- γ	1.259*	3	0.315
SOD	6.967	3	0.073
NO	0.151*	3	0.928
TNF- α	9.487	3	0.023

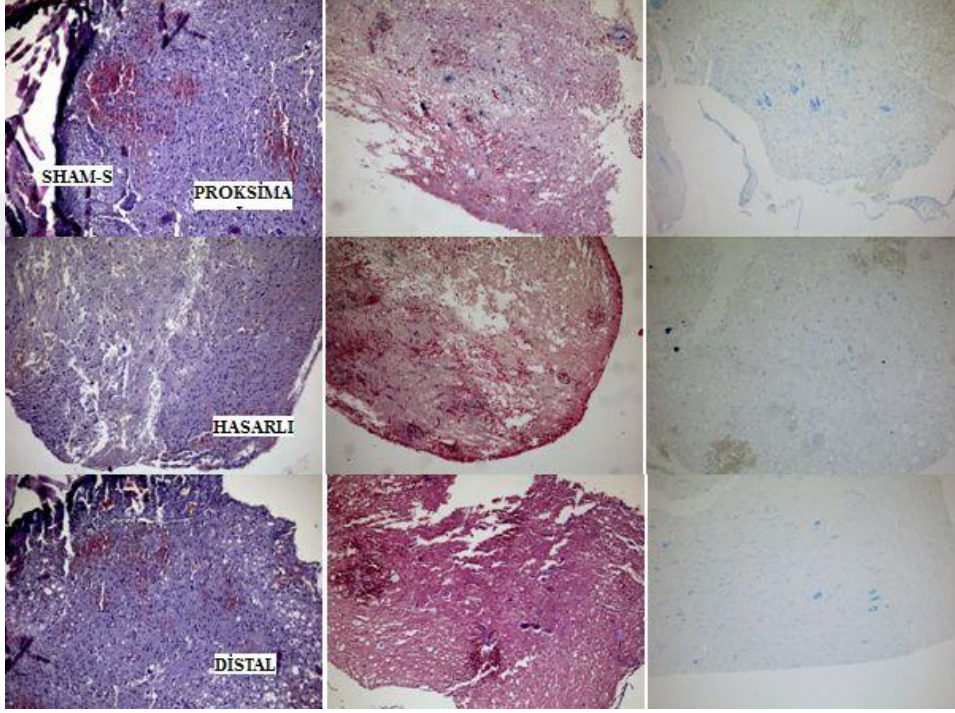
Tablo 7: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni correction* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

Akut dönem			
GRUP (I/ J)	Değişken	Z	p
KONTROL/ SHAM-A	IGF-1 β	-0.160	0.873
	TNF- α	-2.082	0.037
KONTROL/ LV-A	IGF-1 β	-1.121	0.262
	TNF- α	-0.641	0.522
KONTROL/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025
	TNF- α	-2.722	0.006
SHAM-A/ LV-A	IGF-1 β	-1.281	0.200
	TNF- α	-.961	0.337
SHAM-A/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025
	TNF- α	-0.961	0.337
LV-A/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025
	TNF- α	-2.082	0.037

4.2. Subakut döneme ait bulgular:

Histopatolojik incelemeler için hematoksilin-eosin, MTS ve Toluidin mavisi ile boyanan preparatlardaki bulgular birbirlerini destekler nitelikte olduğu görüldü. Dolayısıyla bulgular tek bir paragrafta birlikte değerlendirilip yazıldı.

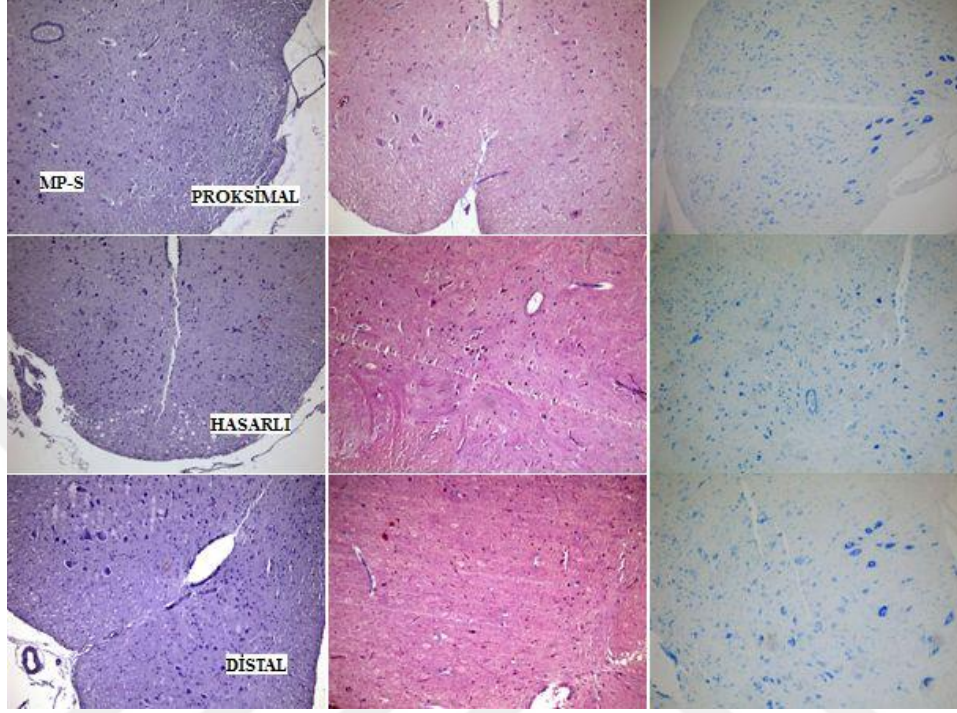
4.2.1. Işık mikroskopisi



Resim 6: SHAM-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

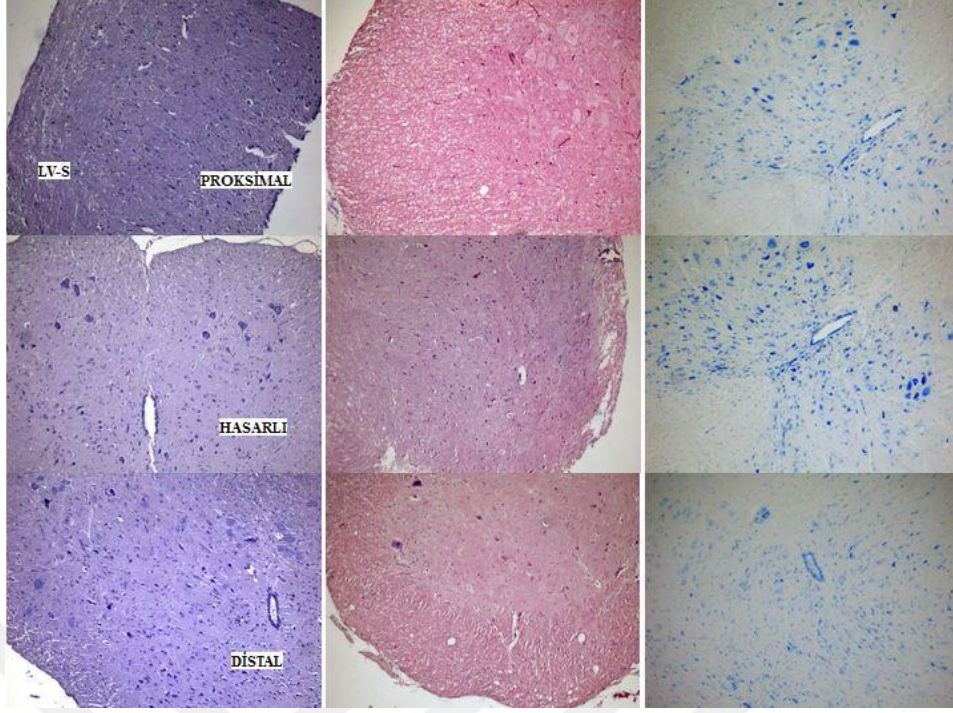
SHAM-S grubunda beyaz ve gri madde sınırı kaybolmuş durumdadır. Hemorojinin yer yer görülmesine karşın büyük oranda rezorbe olduğu dikkati çekti. Geniş kistik kavitasyonlar ve likefaksiyon nekrozu alanları belirgindi. Hemosiderin yüklü makrofajların varlığı dikkati çekti. Akut gruba kıyasla hücre infiltrasyonlarının ve genel dejenerasyon tablosunun daha hafif olduğu olduğu görüldü. Beyaz maddedeki miyelin kılıflarda dejeneratif değişikliklerin ve şişmelerin varlığı yine tespit edildi. Medulla spinalisin akson yapısı bozulmuş durumda olduğu görüldü. Bunun yanında hemorajik alanların kısmen

rezorbe olduğu dikkati çekmektedir. Aksonal uzantılarda kopmaların belirgin olduğu görüldü.



Resim 7: MP-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

MP-S grubunda nöronal nekroz alanları tespit edildi ancak doku bütünlüğünün iyi olduğu tespit edildi. Azalmış doku hasarı dikkati çekti. Hemarojinin daha da iyi rezorbe edildiği görüldü. Canlılığını sürdüren nöronlarda reaktif değişikliklerin belirgin olduğu görüldü. İyileşme bulguları belirgindi. MP-S grubunda SHAM-S grubuna göre daha ılımlı bir tablo görülmesine karşın histopatolojik bulguların yine belirgin olduğu görüldü. Medulla spinalisin longitudinal kesitlerinde akson yapısında dejeneratif değişiklikler ve miyelin kılıflarda şişmelerin olduğu görüldü ancak SHAM-S grubu kadar şiddetli olmadığı dikkati çekti. Yer yer aksonal uzantılarda kopmaların belirgin olduğu görüldü.



Resim 8: LV-S grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

LVS-S grubunda genel durumun belirgin düzeyde iyi olduğu görüldü. Doku bütünlüğünün ve kanama alanları rezorpsiyonun diğer gruplara kıyasla çok daha iyi durumda olduğu tespit edildi. Reaktif değişikliklerin belirgin olduğu nöron sayıları MP-S grubuna göre daha fazla ve belirgin olduğu görüldü. Multipolar motor nöronların ve genel yapının histolojik yapıya çok yakın olduğu görüldü. LVS-S grubunda gerek medulla spinalisin longitudinal kesitlerinde akson yapısının incelenmesinde gerekse de beyaz maddedeki miyelin kılıfların histopatolojik değerlendirilmelerinde oldukça iyi yönde bulgular görüldü. Akson yapısının ve miyelin kılıflarının histolojik görünümüne yaklaştıkları tespit edildi. Aksonal uzantılardaki kopmaların yaygınlığı ve şiddetinin önemli düzeyde azaldığı dikkati çekti.

4.2.2. Histopatolojik inceleme

Çalışmanın subakut dönemine ait histopatolojik inceleme sonuçlarının tanımlayıcı tablo ve dağılım grafiği aşağıda sunuldu (Tablo 8, Grafik 4, Grafik 5, Grafik 6):

Elde edilen histopatolojik düzeylerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında kanama şiddeti ($X^2=17.791$, $p<0.001$), vakuolizasyon ($X^2=18.188$, $p<0.001$) ve nekrotik nöron sayımı ($X^2=19.110$, $p<0.001$) sonuçları arasında anlamlı düzeyde farklılık olduğu tespit edildi (Tablo 9).

Tablo 8: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların tanımlayıcı tablosu (N: denek sayısı, SD: standart sapma)

		Subakut dönem				
GRUP		N	Minimum	Maksimum	Medyan	SD
KONTROL	Kanama şiddeti	6	0	3	1	1.26
	Vakuolizasyon	6	0	2	0	0.84
	Nekrotik nöron sayımı	6	0	2	1	0.82
SHAM-S	Kanama şiddeti	6	6	9	7	1.17
	Vakuolizasyon	6	7	9	8	0.82
	Nekrotik nöron sayımı	6	8	10	9	0.75
MP-S	Kanama şiddeti	6	2	6	4	1.60
	Vakuolizasyon	6	4	8	5	1.38
	Nekrotik nöron sayımı	6	6	9	7	1.03
LV-S	Kanama şiddeti	6	3	5	4	0.98
	Vakuolizasyon	6	4	7	5	1.26
	Nekrotik nöron sayımı	6	6	8	7	0.82

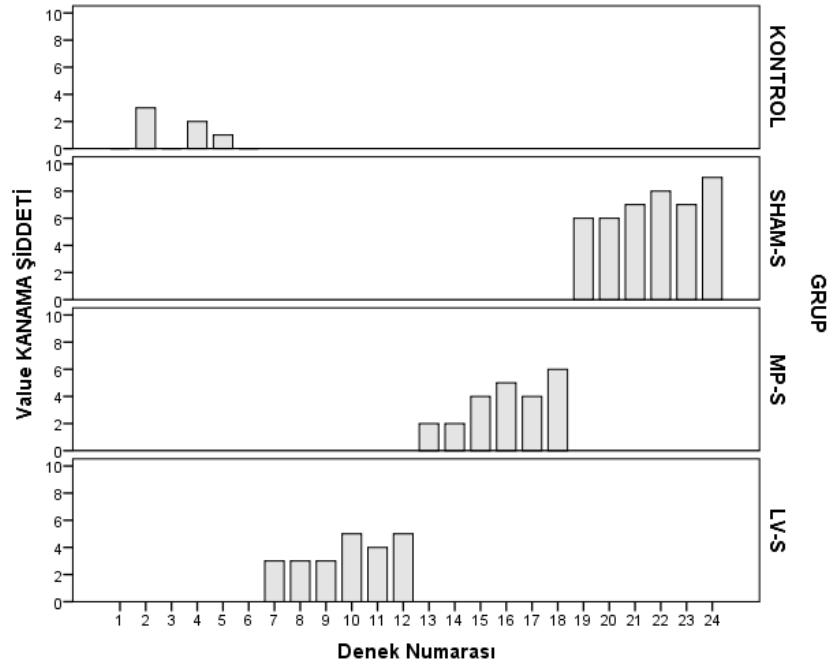
Tablo 9: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (F: F puanı. X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

Subakut dönem			
DEĞİŞKEN	X^2	df	p
Kanama şiddeti	17.791	3	<0.001
Vakuolizasyon	18.188	3	<0.001
Nekrotik nöron sayımı	19.110	3	<0.001

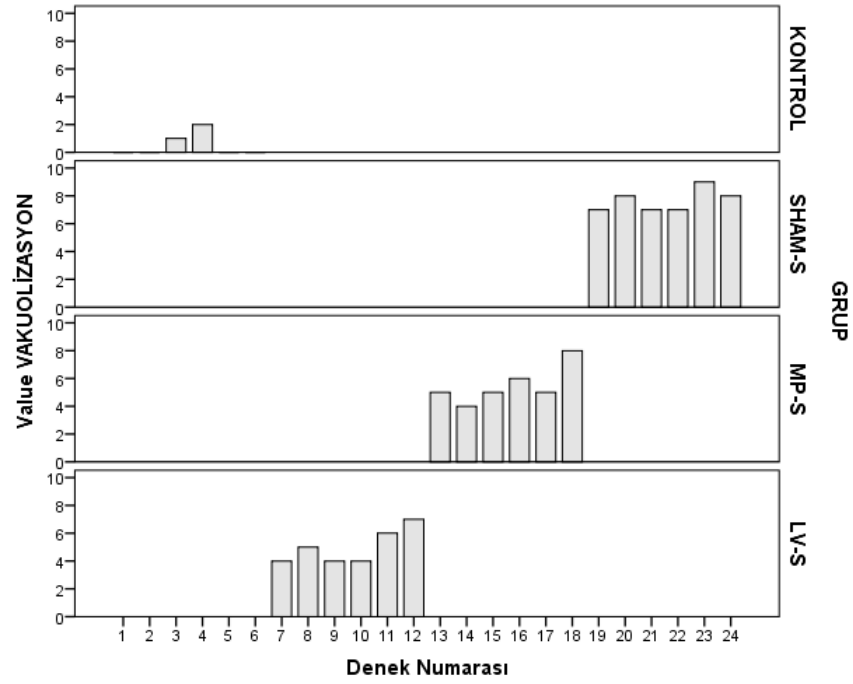
Grupların ikili karşılaştırma sonuçları aşağıda yer alan tabloda ayrıntılı olarak sunulmuştur (Tablo 10).

Tablo 10: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni correction* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

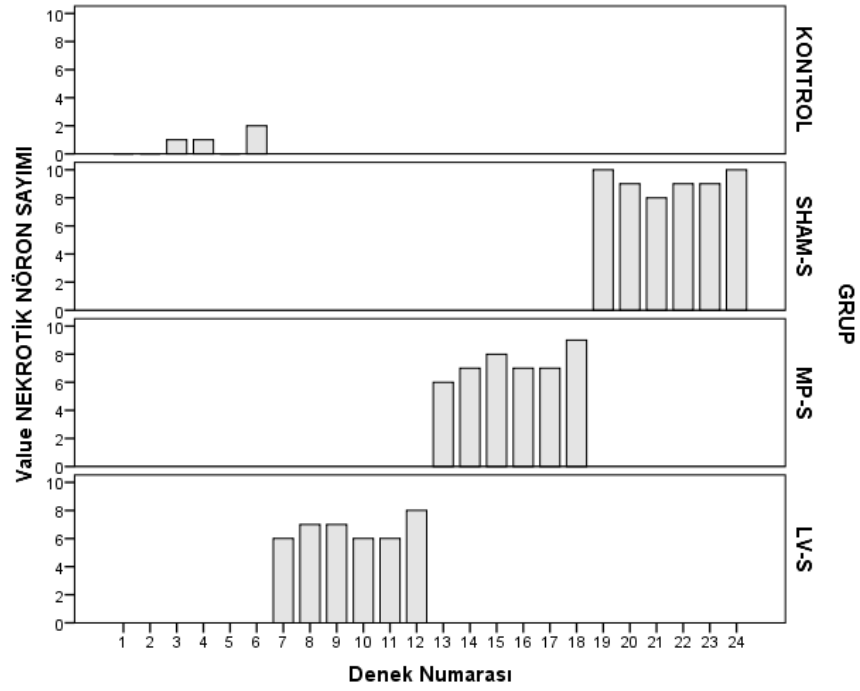
Subakut dönem						
GRUP (I/ J)	Kanama şiddeti		Vakuolizasyon		Nekrotik nöron sayımı	
	Z	p	Z	p	Z	p
KONTROL/ SHAM-S	-2.913	0.004	-2.961	0.003	-2.934	0.003
KONTROL/ MP-S	-2.441	0.015	-2.956	0.003	-2.929	0.003
KONTROL/ LV-S	-2.714	0.007	-2.956	0.003	-2.934	0.003
SHAM-S/ MP-S	-2.756	0.006	-2.290	0.022	-2.472	0.013
SHAM-S/ LV-S	-2.918	0.004	-2.714	0.007	-2.858	0.004
MP-S/ LV-S	0.000	1.000	-0.749	0.454	-1.187	0.235



Grafik 4: Subakut döneme ait kanama şiddeti düzeyi değerleri bar grafiği



Grafik 5: Subakut döneme ait vakuolizasyon düzeyi değerleri bar grafiği

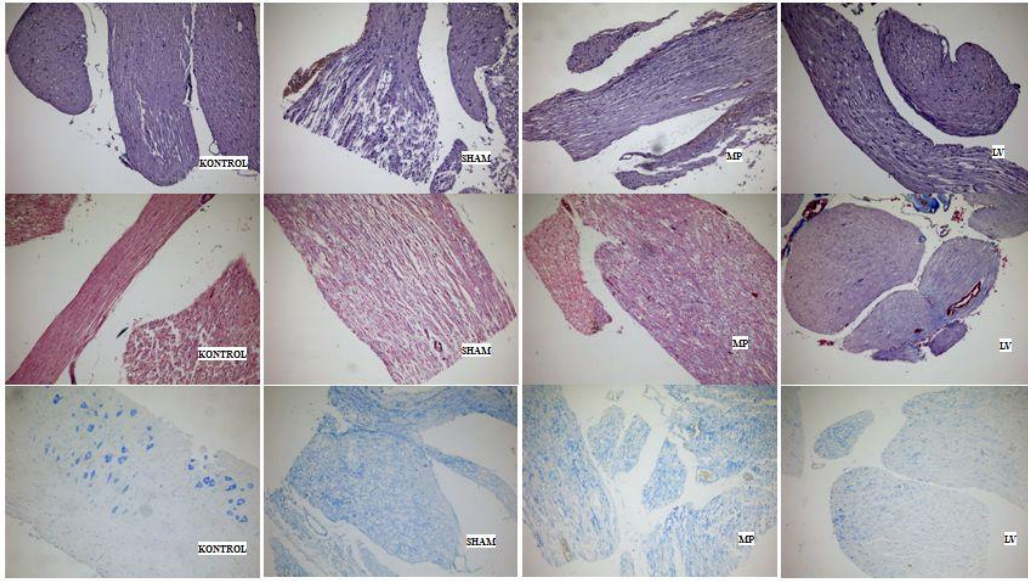


Grafik 6: Subakut döneme ait nekrotik nöron sayım sonuçları bar grafiği

Çalışmanın subakut dönem gruplarına ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının histopatolojik görüntüleri, tanımlayıcı tablosu ve bu değerlerin dağılım grafikleri aşağıda sunuldu (Resim 9, Tablo 11, Grafik 7).

Elde edilen histopatolojik düzeylerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguları bakımından ($X^2=20.496$, $p<0.001$) anlamlı düzeyde farklılık olduğu tespit edildi (Tablo 12).

Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında gruplar arasında MP-A/ LV-A grupları hariç aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguları bakımından istatistiksel anlamlı bir farklılıklar olduğu tespit edildi (Tablo 13, Grafik 7).



Resim 8: Tüm subakut dönem gruplarına ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının histopatolojik görüntüleri (H&E, MTS ve toluidin mavisi; X100 ve X400)

Tablo 11: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguların tanımlayıcı tablosu (SD: standart sapma)

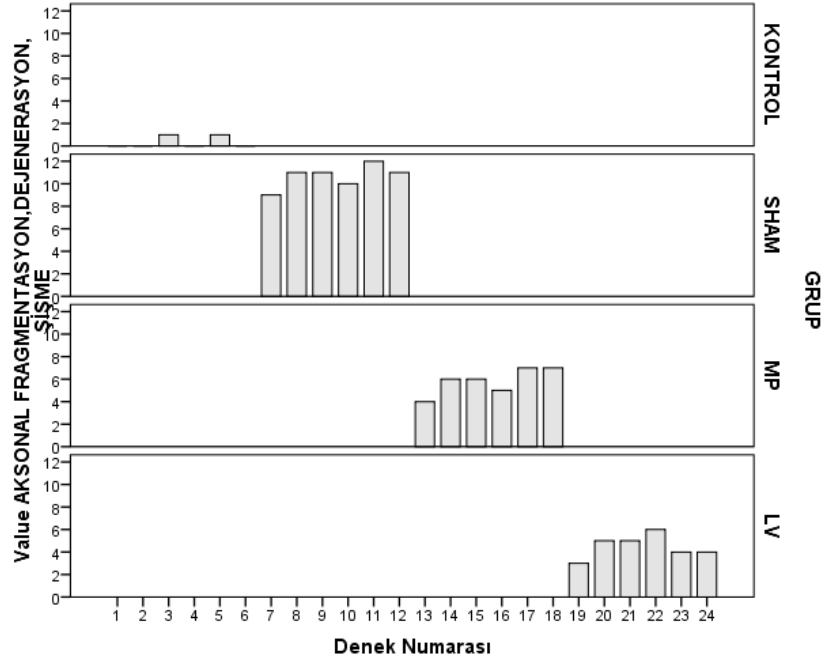
GRUP	Minimum	Maximum	Median	SD
KONTROL	0	1	0	0.52
SHAM	9	12	11	1.03
MP	4	7	6	1.17
LV	3	6	5	1.05

Tablo 12: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemde gelişen aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının gruplar arasındaki farklılığının karşılaştırılması tablosu. *Kruskal-Wallis* testi. $p < 0.05$ (X^2 : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

DEĞİŞKEN	X^2	df	p
Aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme	20.496	3	<0.001

Tablo 13: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulguları sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

GRUP (I/ J)	Aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme	
	Z	p
KONTROL/ SHAM	-2.961	0.003
KONTROL/ MP	-2.950	0.003
KONTROL/ LV	-2.950	0.003
SHAM/ MP	-2.913	0.004
SHAM/ LV	-2.913	0.004
MP/ LV	-1.803	0.071



Grafik 7: Subakut döneme ait aksonal fragmentasyon, dejenerasyon ve şişme bulgularının bar grafiği

4.2.3. Biyokimyasal inceleme

Tablo 14: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait biyokimyasal bulguların tanımlayıcı tablosu (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : Interferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tumor nekrozis faktör-alfa, SD: Standart sapma)

GRUP		N	Minimum	Maksimum	Ortalama /Medyan(*)	SD
KONTROL	MDA		5.05	18.02	8.91	4.62
	IGF-1 β		14.31	123.57	76.87*	35.97
	IFN- γ	6	134.94	234.49	170.59	41.45
	SOD		4.68	11.68	7.78*	2.94
	NO		19.76	56.10	33.55*	12.17
	TNF- α		14.48	60.31	40.36	16.32
SHAM-S	MDA		3.74	10.77	7.49	2.70
	IGF-1 β		8.98	47.07	14.03*	15.24
	IFN- γ		97.46	303.97	202.78	76.86
	SOD		7.13	46.27	16.9100*	13.50
	NO		12.90	97.13	60.55*	33.62
	TNF- α		5.02	65.79	30.31	23.39
MP-S	MDA		2.13	6.44	4.22	1.59
	IGF-1 β		4.28	872.40	12.51*	325.38
	IFN- γ	7	31.99	427.34	183.06	139.56
	SOD		4.17	39.50	18.90*	11.32
	NO		9.73	144.93	36.60*	53.40
	TNF- α		2.94	32.74	12.14	11.53
LV-S	MDA		2.84	10.07	6.66	2.46
	IGF-1 β		10.91	23.97	13.25*	5.42
	IFN- γ	8	32.57	465.98	198.37	132.29
	SOD		6.12	27.10	10.73*	7.24
	NO		7.35	59.79	10.64*	19.93
	TNF- α		4.26	85.29	39.86	32.01

Çalışmanın subakut dönemine ait biyokimyasal inceleme sonuçları aşağıdaki tanımlayıcı tabloda ve dağılım grafiklerinde ayrıntılı olarak verildi (Tablo 14).

Gruplar arasında IGF-1 β ($X^2=9.081$, $p=0.028$) ve SOD ($X^2=9.853$, $p=0.020$) değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptandı (Tablo 15).

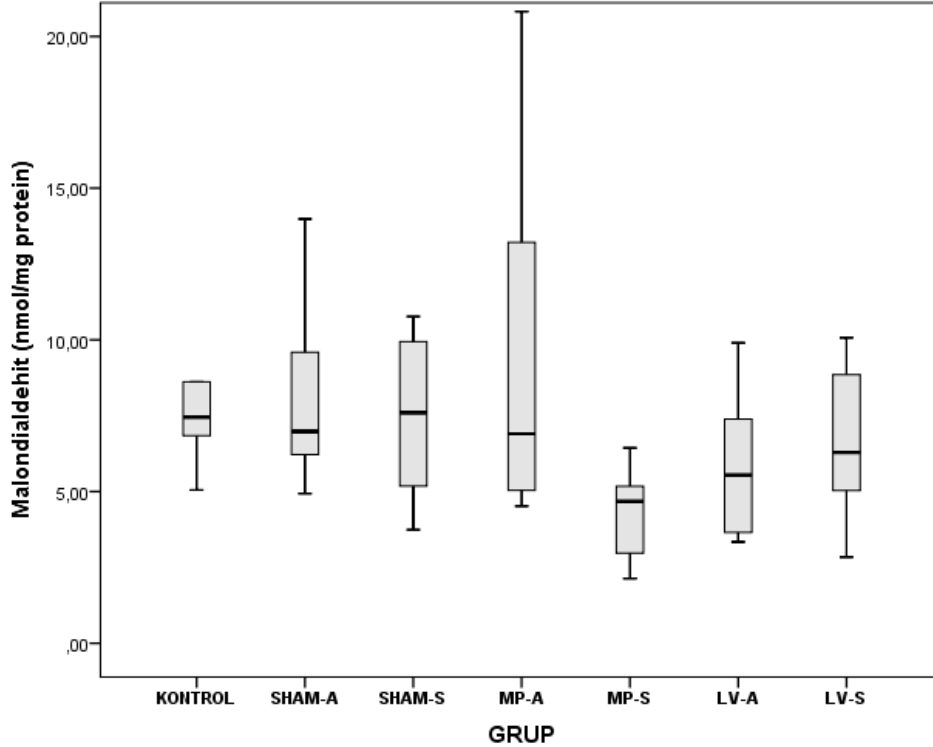
Subakut döneme ait grupların ikili karşılaştırmaları sonunda SOD değerlerinin KONTROL/ SHAM-S grupları ($Z=-2.711$, $p=0.007$) ve IGF-1 β değerlerinin KONTROL-LV-S ($Z=-2.711$, $p=0.007$) grupları arasında istatistiksel yönden farklı olduğu tespit edildi (Tablo 16, Grafik 8, Grafik9, Grafik10, Grafik11, Grafik12, Grafik13).

Tablo 15: Spinal kord yaralanmasının subakut dönemine ait biyokimyasal bulguların sonuçlarının gruplar arasında farklı olduğu tespit edildi. *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* testi ve *Kruskal-Wallis* testi. $p<0.05$ (MDA: Malondialdehit, IGF-1 β : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1beta, IFN- γ : Interferon-gamma, SOD: Süperoksit dismutaz NO: Total nitrit/ nitrat, TNF- α : Tumor nekrozis faktör-alfa, F: F puanı. X^2 : ki-kare. df: serbestlik dereceleri)

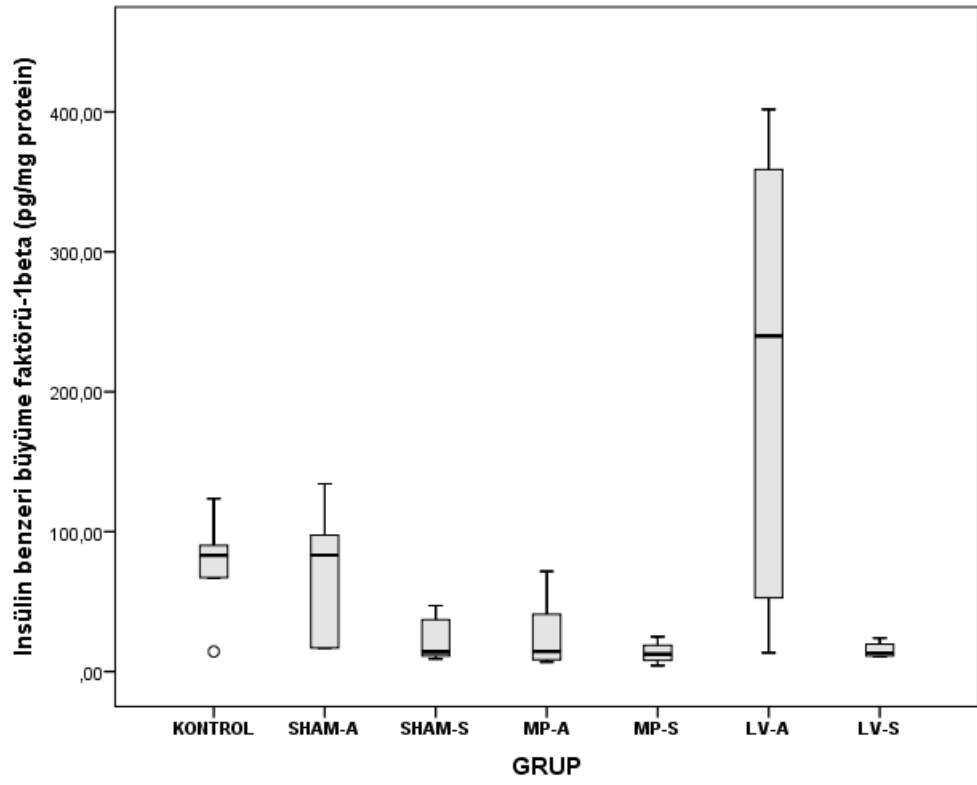
Subakut dönem			
Değişken	X^2/ F^*	df	p
MDA	2.989*	3	0.050
IGF-1 β	9.081	3	0.028
IFN- γ	.129*	3	0.942
SOD	9.853	3	0.020
NO	6.811	3	0.078
TNF- α	2.313*	3	0.100

Tablo 16: Spinal kord yaralanmasının akut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *Bonferroni correction* testi. $p < 0.0083$ (Z: Z puanı)

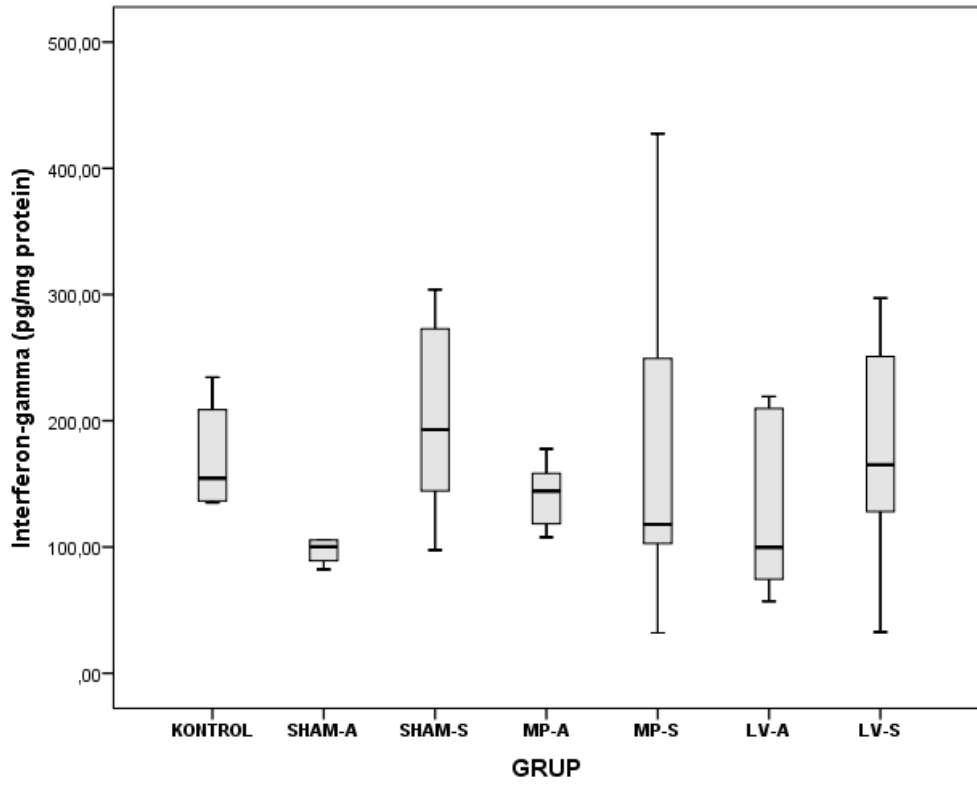
Akut dönem				
GRUP (I/ J)	Değişken	Z	p	
KONTROL/ SHAM-A	IGF-1 β	-0.160	0.873	
	TNF- α	-2.082	0.037	
KONTROL/ LV-A	IGF-1 β	-1.121	0.262	
	TNF- α	-0.641	0.522	
KONTROL/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025	
	TNF- α	-2.722	0.006	
SHAM-A/ LV-A	IGF-1 β	-1.281	0.200	
	TNF- α	-.961	0.337	
SHAM-A/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025	
	TNF- α	-0.961	0.337	
LV-A/ MP-A	IGF-1 β	-2.242	0.025	
	TNF- α	-2.082	0.037	



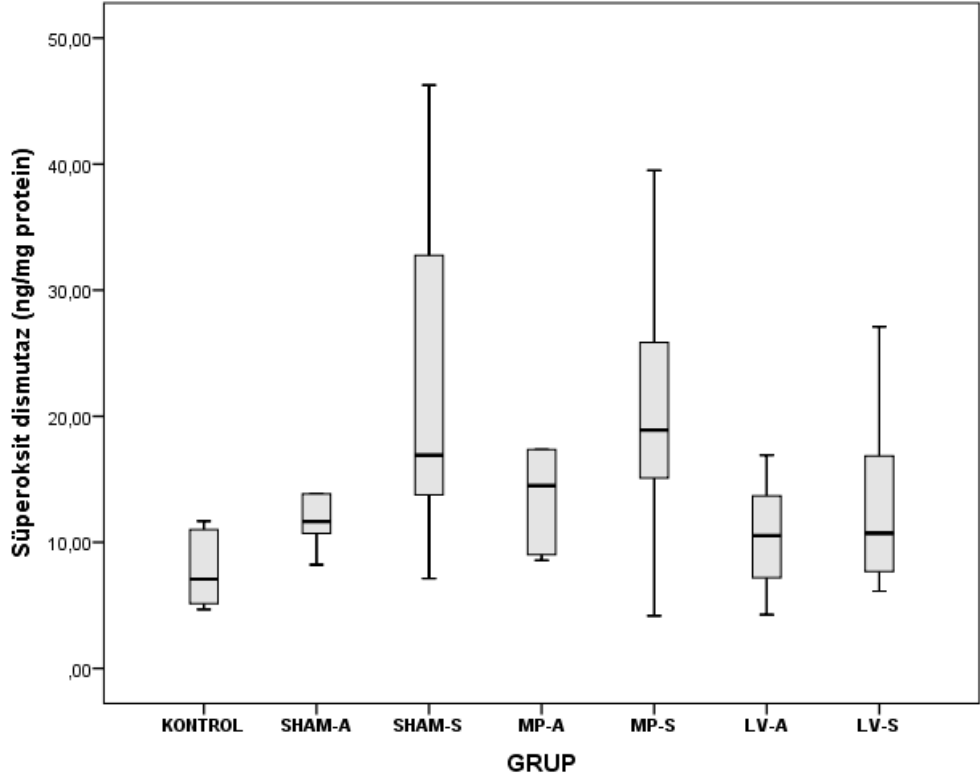
Grafik 8: Tüm deney gruplarına ait malondialdehid düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehid)



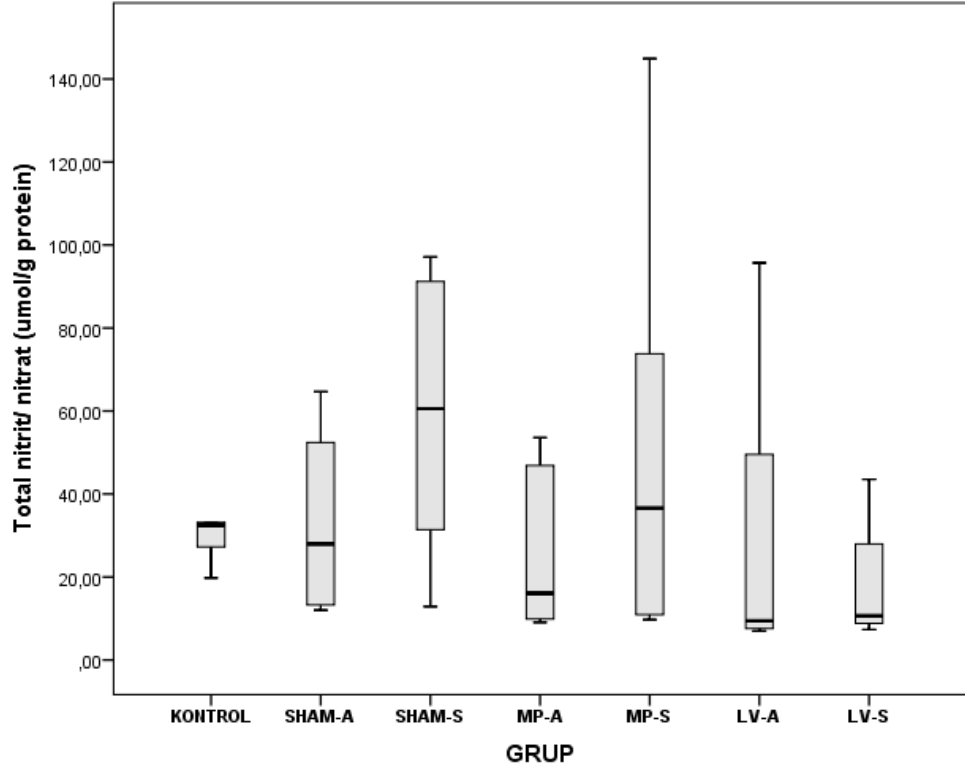
Grafik 9: Tüm deney gruplarına ait insülin benzeri büyüme faktörü-1beta düzeyi değerleri grafiği



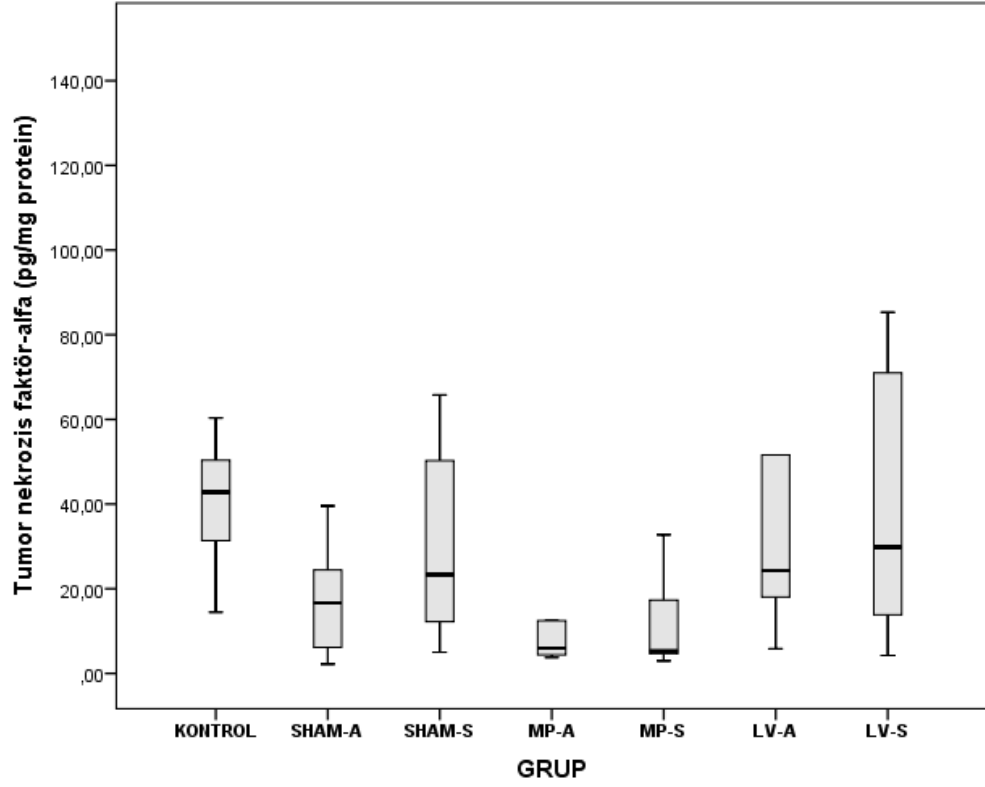
Grafik 10: Tüm deney gruplarına ait interferon-gamma düzeyi değerleri grafiği



Grafik 11: Tüm deney gruplarına ait süperoksit dismutaz düzeyi değerleri grafiği



Grafik 12: Tüm deney gruplarına ait total nitrit/ nitrat düzeyi değerleri grafiği



Grafik 13: Tüm deney gruplarına ait tümör nekrozis faktör-alfa düzeyi değerleri grafiği

4.3. Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması

Akut ve subakut dönemlere ait grupların histopatolojik evreleme verilerinin istatistiksel karşılaştırılması tablosu aşağıda sunuldu (Tablo 17):

SHAM-A/ SHAM-S grupları arasında kanama şiddeti ($Z=-2.827$, $p=0.005$), vakuolizasyon ($Z=-2.458$, $p=0.014$) ve nekrotik nöron sayısı ($Z=-2.918$, $p=0.004$) sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı fark saptandı. Ayrıca MP-A/ MP-S grupları arasında kanama şiddeti ($Z=-2.599$, $p=0.009$) değerleri bakımından istatistiksel anlamlı fark saptandı. LV-A/ LV-S grupları arasında da kanama şiddeti ($Z=-2.632$, $p=0.008$) ve nekrotik nöron sayısı ($Z=-2.735$, $p=0.006$) sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı fark saptandı. (Tablo 17).

Tablo 17: Spinal kord yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait histopatolojik bulguların sonuçlarının her bir grup için karşılaştırma tablosu. *Mann-Whitney U* testi, $p < 0.05$

GRUP (I/ J)	Değişken	Z	p
SHAM-A/ SHAM-S	Kanama şiddeti	-2.827	0.005
	Vakuolizasyon	-2.458	0.014
	Nekrotik nöron sayımı	-2.918	0.004
MP-A/ MP-S	Kanama şiddeti	-2.599	0.009
LV-A/ LV-S	Kanama şiddeti	-2.632	0.008
	Nekrotik nöron sayımı	-2.735	0.006

Akut ve subakut dönemlere ait grupların biyokimyasal analiz verilerinin istatistiksel karşılaştırılması tablosu aşağıda sunuldu (Tablo 18)

SHAM-A/ SHAM-S grupları arasında IGF-1 β ($t = -2.324$, $p = 0.020$) ve IFN- γ ($t = -2.314$, $p = 0.039$) sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı fark saptandı. Ayrıca LV-A/ LV-S grupları arasında da IGF-1 β ($t = -2.582$, $p = 0.010$) sonuçları bakımından istatistiksel anlamlı fark saptandı. (Tablo 18).

Tablo 18: Spinal kord yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait biyokimyasal inceleme sonuçlarının her bir grup için karşılaştırma tablosu. *Mann-Whitney U* testi ve *bağımsız değişkenler t* testi, $p < 0.05$

GRUP (I/ J)	Değişken	Z/ t (*)	p
SHAM-A/ SHAM-S	IGF-1 β	-2,324	0,020
	IFN- γ	-2.314*	0.039
LV-A/ LV-S	IGF-1 β	-2.582	0.010

5. TARTIŞMA

1984 yılında 330 hasta üzerinde yapılan NASCIS-1 (National Acute Spinal Cord Injury Study), NASCIS-2 ve 1997 yılında sonuçları yayınlanan NASCIS-3 çok merkezli çift kör çalışmalarına göre yüksek doz metilprednisolonun omurilik yaralanması üzerine iyileştirici etkileri olduğu ortaya konmuştur.

Literatürde levetirasetamın antiepileptik etkisinin yanı sıra nöroprotektif etkisinin de olduğu gösterilmiş ancak bu etkiyi hangi mekanizmalar üzerinden ortaya koyduğu tam olarak açıklanamamıştır (50, 57, 58). Yapılan bazı çalışmalarda levetirasetamın “N” tipi kalsiyum kanallarını kapatarak hem antiepileptik etki hem de nöroprotektif etki oluşturduğu rapor edilmiştir (59, 60). Bunun yanı sıra yapılan başka çalışmalarda SV2A proteinine bağlanan levetirasetamın GABA-A antagonistlerinin aktivitesini düzenleyerek nöroprotektif etki gösterdiği düşünülmüştür (61, 62). Bir başka çalışmada ise status epileptikusta levetirasetamın glutasyon düzeyini arttırdığını ve böylece mitokondriyal işlevler üzerinde olumlu etki oluşturduğunu ve bunun nöron koruyucu etkiye yol açtığını ileri sürmüşlerdir (63). Madeja ve ark ise levetirasetamın hücre içine potasyum akışını azaltıp hücre membranını stabilize ederek geri dönüşümsüz hücre hasarını engellediğini bildirmiştir (64, 65). İnflamasyon süresince astrositler arasındaki Ca^{+2} bağımlı sinyalizasyon bozulmakta ve bu sırada IL-1 β artışına bağlı hücreler arası gap bağlantıları bozulmaktadır. Bu ise ortamda glutamata birikimine neden olmaktadır. Levetirasetamın bu IL-1 β salınımını azalttığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Levetirasetam bu özelliğinin yanı sıra inflamasyon gelişen nöral dokularda astrositler arasında yer alana hücreler arası gap bağlantılarını da düzeltebilmektedir. Ayrıca astrositlerin membran dinlenme potansiyellerini de normalize edebilmekte ve hücre içi iskelet yapısının ve aktin bağlantılarının yeniden düzenlenmesinde yardımcı olabilmektedir (66). Diğer yandan yapılan çalışmalarda TGF-1 β T hepler lenfositler üzerinde etkili olduğu ve bu hücreleri

inflamasyonlu doku alanına çağırıldığı bilinmektedir. Levetirasetamin bu sitokin üzerinde etkili olduğu ve inflamasyonun geç döneminde bu sitokini uyararak hücrel yeniden yapılanmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (67). Ayrıca TNF- α , matriks metalloproteinazlar ve oksidatif stres üzerinde de levetirasetamin potansiyel etkilerinin olduğu ve bu sitokin ve proteinleri azalttığı rapor edilmiştir (68).

5.1.1. Akut döneme ait bulgular

Histopatolojik inceleme sonuçlarına bakıldığında tüm gruplar arasında kanama şiddeti, vakolizasyon ve nekrotik nöron sayımları bakımından farklılık olduğu görüldü. İkili karşılaştırma sonuçları incelendiğinde hem metilprednizolonun hem de levetirasetamin kanam şiddetini, vakuolizasyonu ve nekrotik nöron sayım sonuçlarını azalttıkları saptandı. Her ne kadar bu sonuçlar sağlıklı doku düzeylerine yaklaşmamış olsa da hiçbir farmakolojik ajan verilmeyen travma grubuna göre belirgin şekilde sonuçlar daha iyi düzeyde idi. Bu bulgularla hem levetirasetamin hem de metilprednizolonun ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında histopatolojik bakımdan iyileştirici etkilerinin olduğu düşünüldü. Ancak biyokimyasal inceleme sonuçlarına bakıldığında gruplar arasında sadece IGF-1 β ve TNF- α düzeyleri bakımından farklılık olduğu ancak grupların ikili karşılaştırmaları sonunda bu farklılığın ortadan kalktığı görüldü. Bu bulgularla gerek metilprednizolonun gerekse levetirasetamin biyokimyasal açıdan inflamatuvar süreçleri azaltma veya durdurma bakımından etkili olamadığı varsayıldı.

Sonuç olarak her iki farmakolojik ajanında ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında histopatolojik olarak dokularda iyileştirici etkinliğinin olduğu ancak bu etkinliği biyokimyasal olarak ortaya koyamadığı gözlemlendi. Bu bulgularla levetirasetamin isimli farmakolojik ajanın hangi inflamatuvar süreçler üzerinden bu iyileştirici etkiyi ortaya çıkardığına yönelik ileri düzey deneysel çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşüncesine ulaşıldı.

5.2. Subakut döneme ait bulgular:

Bu döneme ait histopatolojik inceleme verilerine bakıldığında yine tüm gruplar arasında kanama şiddeti, vakuolizasyon ve nekrotik nöron sayım sonuçları arasında belirgin farklılık olduğu saptandı. İkili karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında ise kanama şiddeti bakımından kontrol grubu hariç diğer gruplar arasında farklılık olmadığı görüldü. Diğer yandan vakuolizasyon ve nekrotik nöron sayım düzeyleri bakımından da yine kontrol grubu verileri hariç diğer gruplar arasında farklılık olmadığı saptandı. bu bulgularla ne metilprednizolonun ne de levetiratesam isimli farmakolojik ajanın ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde iyileştirici etkinliğinin olmadığı düşünüldü. bu döneme ait aksonal fragmantasyon, dejenerasyon ve aksonal şişme düzeyleri incelendiğinde gruplar arasında belirgin farklılık olduğu saptandı. Grupların ikili karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında ise hem metilprednizolonun hem de levetirasetam isimli farmakolojik ajanın aksonal fragmantasyon, dejenerasyon ve aksonal şişme üzerinde azaltıcı etkisinin olduğu gözlemlendi ve her iki deneysel ajanında ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde aksonal hasar üzerine belirgin iyileştirici etkinliğinin olduğu düşünüldü. Ancak biyokimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında tüm gruplar arasında IGF-1 β ve SOD düzeyleri arasında farklılık olduğu gözlemlendi ancak grupların ikili karşılaştırma sonuçlarına bakıldığında bu farklılığın ortadan kalktığı görüldü.

Tüm bulgular ışığında her iki deneysel farmakolojik ajanında ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde gerek histopatolojik gerek biyokimyasal yönden iyileştirici etkinliğinin olmadığı ancak aksonal yapılar üzerinde belirgin düzeyde bir iyileştirme etkinliğinin olduğu sonucuna ulaşıldı.

5.3. Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması

Çalışmanın sonunda her bir gruba ait akut ve subakut dönem histopatolojik inceleme sonuçları analiz edildiğinde omurilik yaralanması oluşturulup hiçbir deneysel

ajan verilmeyen grupta akut döneme ait kanama şiddeti, vakuolizasyon ve nekrotik nöron sayım sonuçlarının subakut döneme göre belirgin yüksek olduğu saptandı. Diğer yandan metilprednizolon verilen gruba ait akut dönemdeki kanama şiddeti düzeyinin subakut döneme göre belirgin yüksek olduğu görüldü ve bu bulgu ile metilprednizolon isimli deneysel ajanın ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde kanama şiddetini azaltabileceği düşünüldü. Levetirasetam verilen grupların sonuçlarına bakıldığında ise akut döneme ait kanama şiddeti ve nekrotik nöron sayım sonuçlarının subakut döneme nazaran daha yüksek olduğu gözlemlendi ve bu bulgularla bu ajanın ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında kanama şiddetini ve nekrotik nöron sayım sonuçlarını azaltma yönünde etkinliğinin olabileceği sonucuna ulaşıldı. Biyokimyasal analiz sonuçlarına bakıldığında ise omurilik yaralanması oluşturulup hiçbir deneysel ajan verilmeyen sham grubunda akut döneme ait IGF-1 β ve IFN- γ düzeylerinin subakut dönem ait verilere göre belirgin yüksek olduğu gözlemlendi. Diğer yandan levetirasetam verilen gruba ait IGF-1 β düzeylerinin akut dönemde belirgin yüksek olduğu ve yaralanmanın subakut döneminde bu düzeylerin belirgin şekilde azaldığı saptandı.

Tüm bu bulgular ışığında her iki farmakolojik ajanında omurilik yaralanmasının subakut döneminde omurilikte oluşan yaralanmaya ikincil kanama şiddetini belirgin azaltıcı etkisinin olduğu, diğer yandan levetirasetam isimli ajanın ayrıca nekrotik nöron sayım sonuçlarını da uzun dönemde azaltabildiği düşünüldü. Ancak her iki ajanında lipid peroksidasyon üzerinde etkinliğinin olmadığı, ayrıca superoksit dismutaz ve nitrik oksit üzerinde bir değiştirici etkinliğinin olmadığı ve ayrıca akut faz reaktanlarından TNF- α üzerinde de etki göstermedikleri ve dolayısı ile inflamatuvar süreçler üzerinde bir etki oluşturamadıkları gözlemlendi. Her ne kadar levetirasetam isimli ajan IGF-1 β düzeylerini azaltıp belki bu yol üzerinden nekrotik nöron sayım sonuçlarını azaltıyor gibi görünse de bu bulguya yönelik daha ileri düzey çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

IFN- γ düzeylerinin daha çok omurilik yaralanmasının kronik sürecinde Th2 hücreleri tarafında yükseltildiği ve doku yeniden organizasyonunda etkili olduğu bilinmektedir. Nitekim bu çalışmada da IFN- γ düzeyleri bakımından akut ve subakut dönem sonuçları bakımından farklılığın gösterilememesinin çalışmanın belirlenen süresinden kaynaklandığı düşünüldü.

5.4.Çalışmanın kısıtlılıkları

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları olduğu saptandı. *Birincisi*, bu çalışma ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut ve subakut dönemlerini içermekte olup kronik sürece ait verileri içermedi. *İkincisi*, bazı teknik finansal problemler nedeni ile deneyde kullanılan farmakolojik ajanların iyileştirici etkinliğini göstermeye yönelik ayrıntılı histopatolojik (immünohistokimya, elektron mikroskopi, floresans mikroskopi gibi) ve biyokimyasal (Western blood, polimerize zincir reaksiyonu (PCR)-gen ekspresyon analizi gibi) analiz yöntemleri kullanılamadı. *Üçüncüsü*, belirlenen deney süresinin kısa olması nedeni ile deney gruplarındaki deneklere fonksiyonel geri kazanıma ait testler uygulanamadı. *Dördüncüsü*, deneklerin vücut hacim ve boyutlarının küçük olması nedeni ile omurilik yaralanmasının radyolojik görüntülerini elde etmeye yönelik testler (manyetik rezonans görüntüleme gibi) uygulanamadı.

6. SONUÇLAR

1. Her iki farmakolojik ajanın da ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut döneminde dokularda histopatolojik olarak iyileştirici etkinliğinin olduğu ancak bu etkinliği biyokimyasal olarak ortaya koyamadığı gözlemlendi.
2. Her iki deneysel farmakolojik ajanın da ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde gerek histopatolojik ve gerekse biyokimyasal yönden iyileştirici etkinliğinin olmadığı saptandı.

3. Her iki deneysel farmakolojik ajanın da ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde hasarlı aksonal yapılar üzerinde histopatolojik yönden belirgin düzeyde bir iyileştirme etkinliğinin olduğu görüldü.
4. Her bir gruba ait akut ve subakut dönem histopatolojik inceleme sonuçları analiz edildiğinde metilprednizolon verilen gruplarda subakut dönemdeki kanama şiddeti düzeyinin belirgin azaldığı görüldü ve bu bulgu ile metilprednizolon isimli deneysel ajanın ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde kanama şiddetini azaltabileceği düşünüldü.
5. Her bir gruba ait akut ve subakut dönem histopatolojik inceleme sonuçları analiz edildiğinde levetirasetam verilen gruplarda subakut dönemde ait kanama şiddeti ve nekrotik nöron sayım sonuçlarının belirgin azaldığı gözlemlendi ve bu bulgularla bu ajanın ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasında kanama şiddetini ve nekrotik nöron sayım sonuçlarını azaltma yönünde etkinliğinin olabileceği sonucuna ulaşıldı.
6. Diğer yandan levetirasetam verilen gruba ait IGF-1 β düzeylerinin subakut döneminde bu düzeylerin belirgin şekilde azaldığı saptandı.

Her ne kadar literatürde levetirasetamın serebral nöronal dokularda IL-1 β , TGF-1 β , TNF- α , matriks metalloproteinazlar ve oksidatif stres üzerinde düzenleyici etkilerinin olduğu gösterilmiş olsa da bu çalışmada bu bulgular desteklenemedi. Bu durumun çalışmanın omurilik yaralanması üzerinden yapılmasından, bu parametrelerin omurilik dokusunda ölçülmeye çalışmasından ve deney süresinin kısa olmasından kaynaklandığı düşünüldü. Diğer taraftan bu deneysel çalışmanın sonunda her iki farmakolojik ajanın da ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut döneminde dokularda histopatolojik

olarak iyileştirici etkinliğinin olduğu ancak bu etkinliği subakut dönemde devam ettiremediği ve gerek akut ve gerekse subakut dönemde her iki farmakolojik ajanında biyokimyasal veriler üzerinde değiştirici etkinliğinin olmadığı bulundu.

Tüm bu bulgular ışığında levetirasetam isimli farmakolojik ajanın omurilik yaralanmasının akut döneminde dokularda histopatolojik olarak iyileştirici etkilerinin hangi inflamatuvar süreçler üzerinden ortaya koyduğuna yönelik ileri düzey deneysel çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu düşüncesine ulaşıldı.



KAYNAKÇA

1. Tator CH, Edmonds VE: Acute spinal cord injury; analysis of epidemiological factors. *Can J Surg.* 1979; 22: 575-578.
2. Tator CH, FRCS, Fehlings MG: Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms: *J Neurosurg*, 1991; 75: 15-26.
3. Schlag G, Redc H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 1996; 20: 406-10.
4. Paterson RL, Webster NR. Sepsis and the SIRS. *JR Coll Surg Edin* 2000; 45: 178-82.
5. Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, Shepard MJ, Wagner FW, Silten RM, Hellenbrand KG, Ransohoff J, Hunt WE, Perot PL Jr, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 1984; 251: 45-52.
6. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322:1405-11.16.
7. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or trilizad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. *JAMA* 1997; 277: 1597-1604.
8. Horner P.J, Gage F.H: Regenerating the damaged central nervous system. *Nature*, 2000; 407: 963-970.

9. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26(24 Suppl): S2-12.
10. Karamehmetoğlu SS, Nas K, Karacan I, Sarac AJ: Traumatic spinal cord injuries in southeast Turkey: an epidemiological study. *Spinal Cord*, 1997; 35(8): 531-533.
11. Raineteau O, Schwab ME: Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Rev. Neuroscience* 2001; 2: 263-273.
12. Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sumbuloğlu G: Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord*, 2000; 38(11): 697-701.
13. 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-Ca exchanger. *J. Neuroscience*, 1996; 16 (2): 545-552.
14. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, et al: Development of post-traumatic cysts in the spinal cord of rats subjected to severe spinal cord contusion. *Surg Neurol*, 1990; 41: 241-249.
15. Marketos SG, Panagiotis S: Hippocrates: The father of spine surgery, 1998.
16. Zileli M, Gülmen V: Deneysel omurilik yaralanması, Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Ed. Zileli M, Özer AF, 2. Baskı, İzmir. Saray Medikal yayıncılık, 2002, s: 951-956.
17. Netter FH: Embriyoloji, The Netter Collection of Medical illustration Nervous System, Volume 1: Part I: Anatomy and Physiology, Ed: Brass A, Elsevier Saunders, 2007, pp:130-147.
18. Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body an yahoo education. Philadelphia: Lea & Febiger, 1918, Newyork Bartleby. com. 2000

19. Aydoğan S. A. Fahir Özer: Omuriliğin vasküler anatomisi ve kan akımı, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed. M.Zileli, A. Fahir Özer, 2. baskı, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002, s: 87-90
20. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. Surg Neurol 10:39-43,1978.62
21. Khan M,Griebel R.Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. Can J. Neurol Sci. 1983 Aug;10(3):161-5.63
22. Fehlings MG, Sekhon LH, Tator CH: The role and timing of decompression in acute spinal cord injury. Spine, 2001, 26: 101-110.
23. Tator CH: Fehlings MG: Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg, 1991, 75: 15-26.
24. Kaptanoğlu E, Charles H, Tator CH: Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejileri. Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed. Zileli M, Özer AF, 2.baskı, Meta basım, Bornova, İzmir, 2002, s: 813-832.
25. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J: Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. Clin. Neuropharmacology, 2001, 24 (5): 254-264.
26. İplikçioğlu C: Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Omurilik Omurga Cerrahisi, Ed. Zileli M, Özer AF, 2.Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2002, s: 459-465.
27. Van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. Antioxid Redox Signal. 2009; 11: 2899-2937.
28. Donnelly DJ, PopovichPG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. Exp Neurol. 2008; 209: 378-388.

29. Özsoy M. K. Deneysel spinal kord yaralanması sonrası deferoksaminin SOD ve histopatolojik değişiklikler üzerine etkisi, 2009, s:6
30. Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004; 90: 1194-1204.
31. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, Nagano T, Iwamoto Y, Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Jul 15; 37: 1363-9.
32. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999; 44: 1027-1040.
33. Çavdar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi. Zileli M, Özer AF. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. İzmir, Meta Basım 2.baskı 2002; 15-17.
34. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacology* 2001, 24 (5): 265-279.
35. Holder MJ, Knox K, Gordon J. Factors modifying survival pathways of germinal center B cells: Glucocorticoids and transforming growth factor-beta, but not cyclosporin A or anti-CD19, block surface immunoglobulin-mediated rescue from apoptosis. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2725-2728.
36. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 99–104.
37. Xu GY, Liu S, Hughes MG, McAdooa DJ. Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 2008; 153: 1034–1047.

- 38.** Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- 39.** Honghai X, Peng, Mengting, Cong L, Zhengming S, Xiong G, Yuelin Z. CCN2 and CCN5 exerts opposing effect on fibroblast proliferation and transdifferentiation induced by TGF- β . *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2015; 42: 1207-1219.
- 40.** Tatlı M, Güzel A, Ökten Aİ, Çaylı S. Omurilik yaralanmalarının medikal tedavisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 27: 165-172.
- 41.** Koç RK, Akdemir H, Karaküçük Eİ, et al: Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxydation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 1999, 37: 29-32.
- 42.** Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomised, controlled trial of methylprednisolon or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322:1405-1411.
- 43.** Gülmen V, Zileli M. Omurilik yaralanmasında farmakolojik tedavi. In: Zileli M, Özer F (eds): *Omurilik ve omurga cerrahisi*, 2. baskı. İzmir: META Basım ve Matbaacılık Hizmetleri; 2002: 833-839.
- 44.** Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, et al. Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1 year follow up. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS III). *J Neurosurg* 1998; 89: 699-706.
- 45.** Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*. 2004;1(1):80-100.

46. Patsalos P.N. Pharmacokinetic profile of levetiracetam: toward ideal characteristics, *Pharmacol Ther* 2000; 85: 77-85.
47. Verrotti A, D'Adamo E, Parisi P, Chiarelli F, Curatolo P. Levetiracetam in childhood epilepsy. *Paediatr Drugs*. 2010; 12: 177-86.
48. Patsalos P.N. Clinical Pharmacokinetics of Levetiracetam. *Clin Pharmacokinet* 2004; 43: 707-724.
49. Deckers CL, Genton P, Sills GJ, Schmidt D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. *Epilepsy Res*. 2003; 53: 1-17.
50. Mazarati AM, Baldwin R, Klitgaard H, Matagne A. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus. *Epilepsy Res* 2004; 58: 167-74.
51. Hanon E, Klitgaard H. Neuroprotective properties of the novel antiepileptic drug levetiracetam in the rat middle cerebral artery occlusion model of focal cerebral ischemia. *Seizure*. 2001; 10: 287-93.
52. Oliveira AA, Almeida JP, Freitas RM, et al. Effects of levetiracetam in lipid peroxidation level, nitrite-nitrate formation and antioxidant enzymatic activity in mice brain after pilocarpine-induced seizures. *Cell Mol Neurobiol*. 2007; 27: 395-406.
53. Kim JS, Kondratyev A, Tomita Y, Gale K. Neurodevelopmental impact of antiepileptic drugs and seizures in the immature brain. *Epilepsia*. 2007;48 Suppl 5: 19-26.
54. Black P, Markowitz RS, Cooper V, Mechanic A, Kushner H, Damjanov I. Models of spinal cord injury: Part 1. Static load technique. *Neurosurgery* 1986; 19: 752-762.

55. Armstrong D, al-Awadi F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 433-436.
56. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2001; 5: 62–71.
57. Arroyo S, Crawford P. Safety profile of levetiracetam. *Epileptic Disord* 2003; 5:S57–63.
58. Calabresi P, Cupini ML, Centonze D, Pisani F, Bernardi G. Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy of brain ischemia. *Ann Neurol* 2003; 53: 693-702.
59. Niespodziany I, Klitgaard H, Margineau DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca²⁺ current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett* 2001; 306:5-8.
60. Angehagen M, Margineau DG, Ben-Menachem E, et al. Levetiracetam reduces caffeine-induced Ca transient and epileptiform potentials in hippocampal neurons. *Neuroreport* 2003; 14: 471-5.
61. Green AR, Hainsworth AH, Jackson DM. GABA potentiation: a logical pharmacological approach for the treatment of acute ischemic stroke. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1438-94.
62. Poulain P, Margineau DG. Levetiracetam opposes the action of GABA-A antagonists in hypothalamic neurones. *Neuropharmacology* 2002; 42: 346-52.
63. Gibbs JE, Cock HR. Administration of levetiracetam after prolonged status epilepticus does not protect from mitochondrial dysfunction in a rodent model. *Epilepsy Res.* 2007; 73: 208-12.
64. Belcastro V, Pierguidi L, Tambasco N. Levetiracetam in brain ischemia: clinical implications in neuroprotection and prevention of post-stroke epilepsy. *Brain Dev.* 2011; 33: 289-93.

- 65.** Madeja M, Margineau DG, Gorji A, et al. Reduction of voltageoperated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action. *Neuropharmacology* 2003; 45: 661-71.
- 66.** Block L, Björklund U, Westerlund A, Jörneberg P, Biber B, Hansson E. A new concept affecting restoration of inflammation-reactive astrocytes. *Neuroscience*. 2013; 250: 536-45.
- 67.** Stienen MN, Haghikia A, Dambach H, Thöne J, Wiemann M, Gold R, Chan A, Dermietzel R, Faustmann PM, Hinkerohe D, Prochnow N. Anti-inflammatory effects of the anticonvulsant drug levetiracetam on electrophysiological properties of astroglia are mediated via TGF β 1 regulation. *Br J Pharmacol*. 2011; 162(2): 491-507.
- 68.** Stettner M, Dehmel T, Mausberg AK, Köhne A, Rose CR, Kieseier BC. Levetiracetam exhibits protective properties on rat Schwann cells in vitro. *J Peripher Nerv Syst*. 2011; 16(3): 250-260