

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA
ARKA KÖK GANGLİON HÜCRELERİNDE KALSİYUM
SİNYALİ VE OKSİDATİF STRES DEĞERLERİ ÜZERİNDE
NİMODİPİN'İN ETKİSİ**

Dr. Muhammed BORCAK

**TIPTA UZMANLIK TEZİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Özgür İSMAİLOĞLU**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
2881 TU-11 proje numarası ile desteklenmiştir**

ISPARTA-2012

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışmalarım ve bu tezi tamamlamamda desteğini gördüğüm, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Özgür İsmailoğlu'na, tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Biyofizik A.D'dan Prof. Dr. Mustafa Nazıroğlu'na, Biyofizik A.D'dan Yrd. Doç. Dr. Cihangir Uğuz'a ve Araştırma Görevlisi Bilal Çığ'a, istatistiklerin hazırlanmasında yardımları için Halk Sağlığı AD.'dan Doç.Dr. Hikmet Orhan'a teşekkür ederim.

Dr. Muhammed BORCAK

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
RESİMLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe.....	3
2.2. Omurilik Yaralanmasında Fizyopatoloji.....	5
2.2.1. Omurilik Yaralanmasında Primer Mekanizmalar	5
2.2.2. Omurilik Yaralanmasında Sekonder Mekanizmalar	5
2.2.3. Sekonder Hasar Mekanizmasının Patofizyolojisi	6
2.2.3.1. Sistemik Etkiler	6
2.2.3.2. Lokal Mikrovasküler Yaralanma	6
2.2.3.3. Elektrolit Bozuklukları.....	6
2.3. Oksidatif Stres	7
2.3.1. Serbest Radikaller	7
2.3.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri	9
2.3.2. Antioksidanlar	10
2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	10
2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	11
2.3.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	11
2.3.3. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres	12
2.4. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali	14
2.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi	14
2.4.2. Hücre içi Ca ⁺² Sinyalinin Oluşumu	14
2.4.3. Ca ⁺² Kanal Blokerleri.....	15
2.4.4. Omurilik Yaralanmalarının Medikal Tedavisi	17
3. MATERYAL METOD	19
3.1. Materyaller	19
3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	19
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	19

3.2. Metot	20
3.2.1. Deneysel Tedavi.....	20
3.2.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Planı	20
3.2.1.2. Arka Kök Ganglion Hücre İzolasyonu.....	24
3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü	24
3.2.2.1. İndirgenmiş Glutasyon (GSH) sinyali	24
3.2.3. Lipit Peroksidasyon Analizi.....	26
3.2.4. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi	27
3.2.5. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR	28
4.1. Arka Kök Ganglion hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca ²⁺] Salınımı Düzeyleri ve gruplar arasında karşılaştırmalı sonuçlar	28
5. TARTIŞMA	37
6. SONUÇ.....	44
ÖZET.....	46
ABSTRACT	47
KAYNAKLAR	48

SİMGELER ve KISALTMALAR

AA	: Araşidonik asit
ACh	: Asetilkolin
AKG	: Arka Kök Ganglion
ALA	: Alfa linoleik asit
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
Ca⁺²	: Kalsiyum iyonu
[Ca⁺²]_i	: Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
[Ca⁺²]	: Kalsiyum iyonu
CCl₃·	: Triklormetil
CCl₄	: Karbon tetraklorür
cGMP	: Siklik guanozinmonofosfat
COX	: Siklooksijenaz
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DRG	: Dorsal Root Ganglion
EC-SOD	: Ekstrasellüler Süperoksit dismutaz
EPS	: Ekstrapiramidal semptom
GPKR	: G Proteini Kenetli Reseptör
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş glutasyon)
GSSG	: Okside (yükseltgenmiş) glutasyon
ER	: Endoplazmik Retikulum
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HNA	: 4-hidroksinoneal
IP₃	: İnozitol trifosfat
KAT	: Katalaz
LA	: α -Lipoik Asit
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
LP	: Lipid peroksidasyon

LPS	: Lipopolisakkarit
NAD(P)H	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
O₂	: Moleküler oksijen
1O₂	: Singlet oksijen
O₂⁻	: Süperoksit anyonu
.OH	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
Ptdlns 4,5P₂	: Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PUFA	: Çoklu doymamış yağ asid
ROO[·]	: Peroksil
ROT	: Reaktif oksijen türleri
sGC	: Solubl guanilat siklaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
SS	: Standart sapma
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Deneysel omurilik travma modelleri.....	4
Tablo 2. ROT, simgeleri ve elektron yapıları.....	7
Tablo 3. Serbest radikallerin oluşumu.....	9
Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	26
Tablo 5. DRG hücrelerinde lipid peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde İntravenöz (İV) ve oral (G) nimodipinin laminektomi (Lam). (ortalama değer±standart sapma).	36

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması	8
Şekil 2. •OH radikalının biyolojik moleküllerle reaksiyonları	8
Şekil 3. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali (42).....	15
Şekil 4. İntravenöz (İV) ve oral (G) nimodipinin (N) laminektomi (Lam) yapılan sıçan AKG sinir hücreleri serbest Ca^{+2} salınışı üzerindeki etkileri	33
Şekil 5. Nimodipin (2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)- 1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure- 3-isopropylester-5-(2-methoxyethyl)ester) molekülü	33

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Omuriliğin açılması	22
Resim 2. Kliplleme işlemi	23
Resim 3. Klip sonrası omuriliğin durumu	23

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Medulla spinalis yaralanmaları, oluşturduğu sonuçlar bakımından, insanlığın henüz kontrol altına alamadığı büyük bir sorundur. Mortalitesi ve morbiditesi yönünden bireysel, sosyal ve ekonomik yaşama kötü etkileri olan bir durumdur. Spinal kord yaralanması paraparezi ile günlük işlerini yapabilen, hafif sakatlanmış bireyler yanında, tetraplejik, solunumu olmayan tamamen bakıma muhtaç bireyler doğurabilir. Tedavi ve bakım masrafları, işgücü ve gelir kayıpları açısından hastayı, ailesini ve ülke ekonomisini etkileyen ciddi bir sağlık problemidir.

Birçok ülkede medulla spinalis yaralanmaları 20-40/1.000.000 oranında görülür. Omurilik yaralanması sonrası hayatta kalanların yarısından fazlası normal yaşantısına geri dönememektedirler. ABD’de 183.000-230.000 kişi akut omurilik hasarı sonrası sakatlıkla yaşamaktadır. Her yıl bunlara 10.000 yeni olgu eklenmektedir (1). Ülkemizde ise yılda ortalama 1600-2000 ciddi Akut Omurilik Hasarı olgusu bildirilmektedir. Avrupa ve Kuzey ABD istatistiklerine göre en yüksek yaralanma oranları 16-30 yaşlarında olmaktadır. ABD’de % 40 motorlu taşıt kazası, % 25 şiddet, %20 düşme, % 5-10 spor kazasına bağlı akut omurilik hasarı meydana gelmektedir. Avrupada spor kazası oranı daha yüksek iken şiddet oranı daha azdır. Ayrıca spor yaralanmaları, düşmeler, iş kazaları ve yaralanma bölgesinden hastaneye transport, mortalite ve morbiditede önemli rol oynamaktadır. Travmatik spinal kord yaralanmalarının en yaygın nedenleri sıklık sırasına göre; motorlu araç kazaları (yaklaşık %50), düşmeler, ateşli silahlar veya kesici-delici aletlerle oluşmuş penetran yaralanmalar ve spor kazalarıdır. En sık servikal bölge ve dorsolomber birleşim bölgesindeki spinal kord etkilenir (2,3).

Akut omurilik hasarlanmasına bağlı oluşan iki mekanizma olduğu hipotezi ileri sürülmektedir. Bu travmatik sürecin direkt veya birincil hasarla birlikte indirekt veya ikincil hasarla ilgili olduğunu düşündürmüş ve çalışmaların ikinci nedene yönelmesine neden olmuştur. Bu ilerleyici kendi kendine yıkıcı mekanizmaların fizyopatolojisinde ödem oluşumu, damarsal değişiklikler, inflamatuvar gelişmeler, nöron plazma membranının lipid peroksidasyonu ve serbest radikal reaksiyonları ile destrüksiyon gibi birçok etken sorumlu tutulmuştur (4). İlk hasar, dakikalar içinde oluşan ve günler ya da haftalar süren bir moleküler ve hücrel değişimler kaskadını

tetikler. Hasarlı nöronların yaşamlarına devam etmeleri, aksonların uygun hedeflere uzanması ve sonuçta fonksiyonel sinapsların oluşması rejenerasyonda asıl basamaklardır. Halen ağır omurilik hasarından sonra klinik olarak düzelme olmamasına rağmen, yapılan çeşitli hayvan deneylerinden olumlu sonuçlar alınmaya başlanmış olması çalışmaların artarak devam etmesi yönünde cesaretlendirici olmaktadır.

Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın dölleme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, sillerin hareket frekansının koordinasyonu, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptozis sayılabilir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel iyon, sekonder haberci olarak bilinen, Ca^{+2} iyonudur. AKG (Arka Kök Ganglion) hücreleri de sinir impuls iletiminde görev alırlar ve sinir iletiminde önemli rol oynamaktadırlar. Sinir iletimi ve Ca^{+2} sinyali üzerine çalışmamız olduğu için AKG hücrelerini çalışmamızda kullandık.

Biz de deneyimizde travmatik spinal kord yaralanmasında kanal blokerlerinden Nimodipin'in Ca^{+2} sinyali ve oksidatif stres değerleri üzerinde etkisini araştırmaya çalıştık. Yaralanma veya iskemi sonrası hücre membranının hasara uğraması sonucunda kalsiyum kanallarının depolarize olması sonucunda kalsiyumun hücre içine akışı olur. Çalışmamızda kalsiyum kanal blokerlerinin kalsiyumun hücre içine girişini engelleyerek omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkili olabileceği tezi savunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Medulla spinalis travmaları yüzyıllardır bilinen, tarihi bakış açısına göre bütünüyle farklı olarak ele alınabilen fakat hangi açıdan bakılırsa bakılsın trajik bir olaylar dizisidir. Son yıllarda olan gelişmeler ile olayın omurga komponenti çözümlenmiş gibi görünse de medulla spinalis komponenti hala çözümlenmeyi bekleyen önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır.

Omurilik yaralanmalarıyla ilgili bilinen ilk yazılı eser, beş bin yıl öncesi yazılmış olup 1930'da Breasted tarafından tercüme edilmiş olan Edwin Smith Papirüsü'dür (3). İmhotep (MÖ 2686–2613) bu papirüsde sözü edilen ilk cerrahdır. İmhotep, omurga ile ilgili 48 kemiksel lezyonu anlatarak, ligaman hasarını, vertebral subluksasyon ve dislokasyonu tanımlamış; üst ve alt servikal vertebra yaralanmalarında kuadripleji ve parapleji olacağını belirtmiştir (5,6).

Allen'in ağırlık düşürme modelinden başka birçok deneysel spinal kord travma modeli tanımlanmıştır. (7) (Tablo 1)

1978 yılında Rivlin ve Tator klip kompresyon modelini geliştirmişlerdir (7). Laminektomi sonrası omuriliğin lateralinden konan anevrizma klipi belli bir süre omuriliği komprese eder. (8)

Tablo 1. Deneysel omurilik travma modelleri.

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

Deneysel Spinal Kord Yaralanma Modelleri (9)

A. Travmatik yaralanma

1. Akut kinetik kompresyon: Kaf, klip, balon kompresyon, vertebral dislokasyon, impaktör
2. Akut statik kompresyon: Ağırlık uygulama
3. Çarpma veya ağırlık düşürme
4. Akselerasyon-deselerasyon
5. Distraksiyon
6. Transseksiyon: Parsiyel veya komplet

B. Non travmatik yaralanma

1. İskemi: Aort oklüzyunu, selektif arteriyel veya venöz oklüzyon
2. Tümör kompresyonu: Ekstradural
3. Kimyasal veya fotokimyasal

2.2. Omurilik Yaralanmasında Fizyopatoloji

Son yıllarda omurilik yaralanmasının fizyopatolojisini açıklamak amacıyla yapılan deneysel çalışmaların artması sonucu bu konudaki bilgilerde belirgin bir artış olmuştur. (10).

2.2.1. Omurilik Yaralanmasında Primer Mekanizmalar

Pekçok travma spinal kord yaralanmasına neden olabilir. Travma, omuriliğin kendisini veya etrafındaki vertebral kolonu etkileyebilir. (11)

2.2.2. Omurilik Yaralanmasında Sekonder Mekanizmalar

Kısa süreli spinal kord travmasına maruz kalan hayvanlarda ilerleyici klinikle birlikte ilerleyici doku hasarı olduğunu Allen 1911’de bildirmiştir. (12).

1978’de Nemecek, ışık mikroskopunda yaralanmış dokudaki intravasküler trombusları göstermiş ve bu ciddi nekrozu “otodestruksiyon” olarak tanımlamıştır (13).

Spinal kord yaralanmalarında sekonder hasar mekanizmaları birbiriyle ilişkili ve tetikleyen dört ana teoride toplanmıştır:

1. Serbest Oksijen Radikalleri Teorisi: İskemik dokuda fazla miktarda biriken radikaller ve onların ürünleri doku hasarının ilerlemesine neden olurlar.

2.Kalsiyum Teorisi: Serbest kalsiyum iyonlarının nörotransmitter kanallardan fazla miktarda geçişi sonucu doku yıkım enzimleri olan fosfolipaz, proteaz ve fosfatazın aktive olmaları doku harabiyetine neden olur.

3. Opiat Reseptör Teorisi: Naloxone gibi opiat reseptör blokörleri nörolojik iyileşmeyi hızlandırır.

4. Enflamasyon Teorisi: Lipid enflamasyon mediatörleri ve diğer sitokinler lezyon sahasında birikirler ve takiben makrofaj ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonuna neden olurlar. (14)

2.2.3. Sekonder Hasar Mekanizmasının Patofizyolojisi

2.2.3.1. Sistemik Etkiler

Medulla spinalis yaralanmasının şiddeti ve seviyesi, spinal kord kanlanmasını etkileyen lokal travmanın yanında, oluşan nörojenik şokun ağırlığıyla da yakın ilişkilidir. Nörojenik şok; sempatik tonus azalması, vagusun anormal kardiyak etkisi ve bradikardi gelişmesi sebebi ile ortaya çıkar.

2.2.3.2. Lokal Mikrovasküler Yaralanma

İnsan omuilik yaralanmalarında ve deneysel modellerde, spinal kord hasarının en önemli sebeplerinden birisi posttravmatik iskemidir. Posttravmatik spinal kord iskemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir. (15)

2.2.3.3. Elektrolit Bozuklukları

Medulla spinalis yaralanmasının ardından hücre içi ve dışı kompartmanlar arasında ciddi elektrolit değişiklikleri olmaktadır. (16).

- 1) Hasar görmüş olan hücre membranından,
- 2) Voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından,
- 3) Glutamat ile aktive olan kalsiyum kanallarından.
- 4) $\text{Na} - \text{Ca}^{+2}$ exchange (değiş-tokuş)

Kalsiyumun hücre içine girmesi nörotoksisiteyi tetikler. Kalsiyum iyonları hücre içinde fosfolipazları, proteazları ve fosfatazları aktifleştirerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur (16).

Beyaz cevher yaralanması sonucu oluşan anoksi, ATP ve membran depolarizasyonunun kaybına sebep olarak Na^+ kanallarından hücre içine Na^+ akışını sağlar. (17).

2.3. Oksidatif Stres

2.3.1. Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan serbest radikaller, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen oldukça aktif atom veya moleküllerdir.

İnsan vücudunda serbest radikaller 3 yolla meydana gelir:

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birinin kalarak homolitik bölünmesi (Kovalent bağların homolitik kırılması)

2. Normal bir molekülden bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi

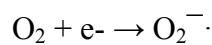
3. Normal bir moleküle bir elektronun eklenmesi yoluyla:

Ayrıca $1O_2$ ve H_2O_2 molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (18-19) (Tablo 2).

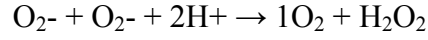
Tablo 2. ROT, simgeleri ve elektron yapıları

ROT	Simgesi	Elektron Yapısı
Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot-}$	$\left[\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \right]^{-}$
Hidroksil radikali Singlet oksijen radikali	$\cdot OH$ $1O_2$	$\cdot \ddot{O} :: \ddot{O} \cdot$
Hidrojen peroksit	H_2O_2	$H : \ddot{O} :: \ddot{O} : H$

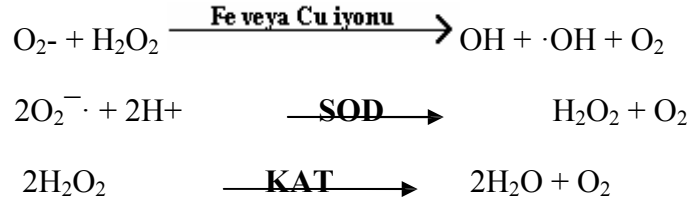
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), O_2 'in indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı, mitokondriyal elektron transport zinciridir.



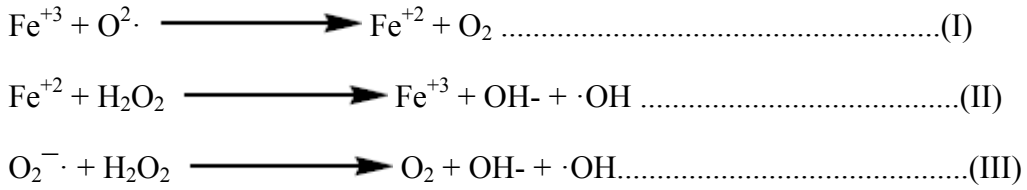
O_2^- , $\cdot OH$ radikalinden daha zayıf reaktif özelliği olan bir molekül olmakla birlikte biyolojik dokulara zarar verebilir.



O_2^- , H_2O_2 radikali ile reaksiyona girerek daha etkili $\cdot OH$ radikaline de dönüşebilir. Bu reaksiyon için metal iyonlarına [demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+2})] gereksinim vardır.

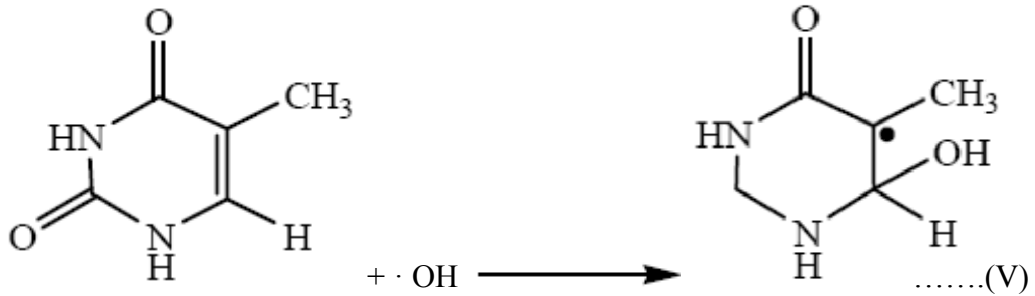
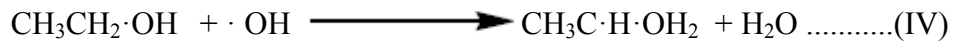


Gen mutasyonlarına neden olarak malign transformasyonlara veya hücre ölümlerine yol açar. Fe^{+2} , Cu^{+2} gibi metal iyonları tarafından katalizlenen bu indirgenme reaksiyonu Haber-Weiss tepkimesi (şekil 1) olarak bilinmektedir.



Şekil 1. Haber-Weiss reaksiyonu ve mekanizması

IV ve V numaralı reaksiyonlar, III numaralı reaksiyonun ara basamaklarıdır (şekil 2) (20,21).



Şekil 2. $\cdot OH$ radikalinin biyolojik moleküllerle reaksiyonları

Tablo 3. Serbest radikallerin oluşumu

SERBEST RADİKAL	OLUŞUMU
Süperoksit ($O_2^{\cdot-}$)	O_2 'in, enzimatik veya nonenzimatik yolla bir elektron redüksiyonu
Hidroksil radikali ($\cdot OH$)	Suyun radyolizi, H_2O_2 'in Metalkatalizli parçalanması, NO ve $O_2^{\cdot-}$ etkileşmesi
Alkoksil ($RO\cdot$) ve peroksil ($ROO\cdot$) Radikalleri	Hidroperoksitlerin metal-katalizli parçalanması
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	$O_2^{\cdot-}$ 'in dismutasyonu, şekerlerin oksidasyonu
Demir-oksijen kompleksi	Hemoglobin, Miyoglobin, vb.
Singlet oksijen (1O_2)	Fotosensitizasyon ile oksidasyon, $ROO\cdot$ radikalleri arasındaki biyomoleküler etkileşimler, hipoklorit ve H_2O_2 reaksiyonu
Lipid ve protein hidroperoksitler	Lipid ve proteinlerin oksidasyonu
Nitrojen dioksit (NO_2)	$ROO\cdot$ radikali ve NO reaksiyonu, hava kirliliği ve sigara
Nitrik oksit (NO)	NO sentaz, nitrozotiyol , hava kirliliği
Tiyil radikalleri	Tiyollerden hidrojen atomu transferi
Protein radikalleri	Proteinlerden hidrojen atomu Transferi

2.3.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipid, protein, karbonhidrat ve

DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (22,23,24):

1) Membran Lipidleri Üzerinde Etkileri: Serbest radikaller, hücre komponentleri ile etkileşim içine girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır.

2) Proteinler Üzerinde Etkileri: Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipidlere göre daha az hassastırlar (25,26).

3) Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri: Karbonhidratlar üzerine de ROT'nin etkileri vardır. Glukoz, mannoz ve deoksi şekerler otooksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 radikallerini meydana getirirler. (27).

4) DNA Üzerinde Etkileri: DNA üzerinde serbest radikaller, nükleik asit-baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkilerin bir veya birden fazlasının meydana gelmesi, kromozomal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır.

$\cdot OH$ radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açar; pürin ve pirimidin bazlarında mutasyonlara neden olur. (28)

2.3.2. Antioksidanlar

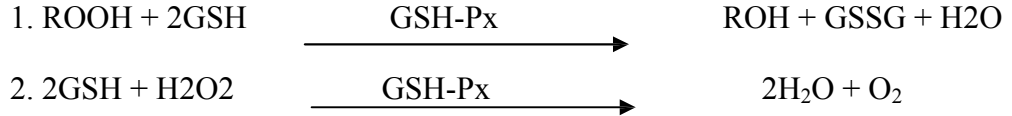
Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi, doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (28).

2.3.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Başlıca antioksidan enzimler: Süperoksit Dismutaz (SOD) , Katalaz (KAT) ve Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dır (28).

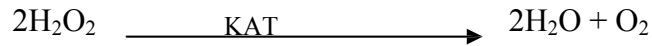
Süperoksit Dismutaz (SOD): O_2^- radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki O_2^- düzeylerini kontrol etmede rol oynar. (29)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): GSH-Px, glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (28).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldırabilme özelliği gösterir (30).

Katalaz (KAT): İçeriğinde Fe^{+3} bulduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında, bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'in, peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (31,32).



Hemen hemen tüm memeli hücrelerinde, KAT, ağırlıklı olarak eritrosit, karaciğer ve böbrekte bulunur. Eritrositler, KAT aktivitesinin %98'inden fazlasını sağlamaktadır (31).

2.3.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1. Glutasyon (GSH): GSH, sistein içeren bir tripeptit yapısında olup in vivo sentezlenebilen ve ince bağırsaktan emilebilen endojen ve ekzojen bir antioksidandır. Peroksidazlar için substrat görevi görebilen GSH, antioksidan etkili C ve E vitaminleri üzerinde de orta düzeyde koruyucu etkiye sahiptir (33).

2. C Vitamini (Askorbik Asit): GSH miktarı, C vitamini eksikliğinde azalır.
3. E Vitamini
4. A Vitamini
5. Karotenoidler

2.3.2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar; ROT ve nitrojen türlerinin temizlenmesi, oksidatif stresle hasarlanmış dokuların tamiri, diğer antioksidanların onarımı/yenilenmesi ve metal

şelasyonu gibi farklı etki şekillerinden birini veya birkaçını ortaya koyarlar. İdeal bir antioksidan, bu etki şekillerinden çoğunu yerine getirebilir. (34).

Antioksidanlar dört farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Süpürücü etki (Temizleme Etkisi) (Scavenging)
2. Bastırıcı etki (Baskılama Etkisi) (Quencher)
3. Onarıcı etki (Onarma Etkisi) (Repair)
4. Zincir kırıcı etki (Zincir Koparma Etkisi) (Chain breaking) (34,35).

2.3.3. Fizyolojik Süreçlerde Oksidatif Stres

O₂, hücrenin günlük aktiviteleri için gerekli enerjiyi sağlar. Besin kaynakları, hücrenin enerji santrali olan mitokondrideki respiratuvar elektron transport zincirindeki enzimatik reaksiyon süreciyle oksidize edilirler .(36)

Redoks (redüksiyon – oksidasyon reaksiyonu); atomların oksidasyon durumlarının değiştiği tüm kimyasal reaksiyonların genel adıdır. Redoks kelimesi, redüksiyon ve oksidasyon terimlerinden köken alır:

Oksidasyon elektronların/hidrojenin kaybını veya oksijen kazancını; molekül, atom veya iyondaki oksidasyon durumunun artışıını ifade eder (37)

A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri

1. NO'in düzenli üretimi
2. Fagositik NAD(P)H oksidaz ile ROT üretimi: Oksidatif patlama
3. Nonfagositik hücrelerde NAD(P)H oksidazlar ile ROT üretimi
4. Lenfositlerde 5-lipoksijenaz tarafından ROT üretimi
5. Siklooksijenazla ROT üretimi

B. Vasküler tonusun düzenlenmesi

C. O₂ konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi: Ventilasyon kontrolü

D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu

E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu

F. Programlı hücre ölümünde ROT'nin rolü:

1. Apoptozisin indüksiyonu ve gerçekleştirilmesi
2. NO-bağlı apoptozis
3. Tümör nekroz faktör- α (TNF- α)'nın indüklediği hücre ölümü

A. Serbest radikallerin düzenli üretimleri:

Biyolojik dokularda NO, indüklenebilir, nöronal ve endotelial olmak üzere üç izoformu bulunan spesifik nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleri tarafından üretilir. (38).

Vasküler düz kas hücresi, fibroblast, kardiyak miyosit ve endotelial hücre gibi çeşitli tipteki nonfagositik hücreler, hücre içi sinyal iletim yollarını düzenlemek için NAD(P)H oksidaz aracılığıyla ROT üretirler. (39).

B. Vasküler tonusun düzenlenmesi:

Siklik guanozinmonofosfat (cGMP), protein kinaz yolu ve iyon kanalları gibi Vasküler tonusun sağlanmasındaki fizyolojik hedeflerin regülasyonunda esas rol oynar. cGMP oluşmasını sağlayan reaksiyonu katalizleyen, solubl guanilat siklaz (sGC)'dir. H_2O_2 ve NO radikalleri sGC aktivasyonunda etkilidir. (39).

C. O_2 konsantrasyonundaki değişiklikleri algılayan ROT üretimi:

Yüksek organizmalarda O_2 homeostazı, eritrosit sayısı ile respiratuvar ventilasyon arasındaki dengeyle regüle edilir. (40).

D. Hücre adezyonunda redoks regülasyonu:.

Lökositlerin endotelial hücrelere adezyonun ise ROT tarafından, özellikle hücre içi kaynaklı $\cdot OH$ radikalince indüklendiği gösterilmiştir (41).

E. İmmün cevabın redoks regülasyonu/amplifikasyonu:

İmmün cevap, redoks regülasyonu altındadır; T lenfosit aktivasyonu, ROT'nin etkisine veya hücre içi GSH, redoks durumundaki bir değişikliğe bağlı olarak belirgin bir biçimde artar.

2.4. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.4.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin işlevleri hücrel iyon değişimleri ile tetiklenmektedir (42). Ca^{+2} , hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın döllenme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, sillerin hareket frekansının koordinasyonu, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptozis sayılabilir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel iyon, sekonder haberci olarak bilinen, Ca^{+2} iyonudur (42).

Hücre içi Ca^{+2} sinyali, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunun ($[Ca^{+2}]_i$) geçici bir şekilde artışından oluşur.

2.4.2. Hücre içi Ca^{+2} Sinyalinin Oluşumu

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında Ca^{+2} iyonunun gerekliliği indirekt araştırma yöntemleri ile belirlenmesine karşın, moleküler işlevler mikrospektrofluorometrik, elektrofizyolojik ve moleküler araştırma tekniklerin geliştirilmesi ile kısmen de olsa aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda geliştirilen patch-clamp ve mikrospektrofluorometrik araştırma teknikleri ile beraber floresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki iyonik akımları ve hücre içi serbest iyon seviyelerinin ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (42).

Hücrenin işlevini etkileyen hücre içi serbest Ca^{+2} iyon artışı iki yolla oluşmaktadır:(43)

1- Hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi,

2- Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun salınması,

1- Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişini sağlayan kanal tipleri şunlardır:

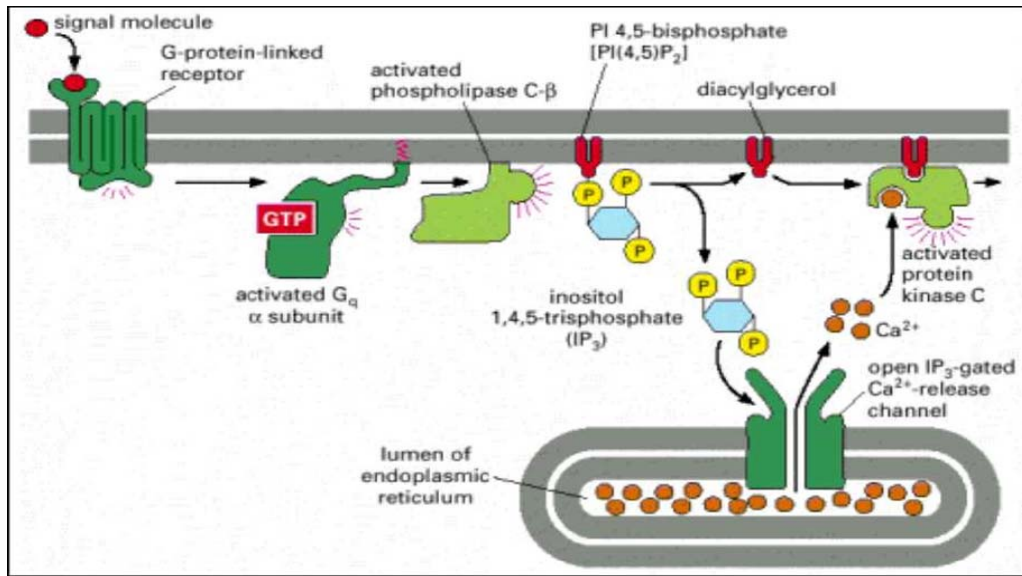
1- Voltaj Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon, kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (44).

2- Ligand Bağımlı Ca^{+2} kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinik Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir (45).

3- Kalsiyumun sızarak hücreye girdiği kanallar: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

4- $\text{Na} - \text{Ca}^{+2}$ exchange (değiş-tokuş)

Ca^{+2} salınımını sağlamaktadır. Hücre içi serbest Ca^{+2} artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir. Bu işlgeler şekil 3 de gösterilmektedir.



Şekil 3. GPKR (G Proteinli Kenetli Reseptör) etkili Ca^{+2} sinyali (42)

2.4.3. Ca^{+2} Kanal Blokerleri

1- Selektif vasküler Ca^{+2} kanal blokerleri Dihidropiridin türevleri; Manidipin HCL, Nilvadipin, Nifedipin, Nimodipin, Amlodipin, Felodipin, Nitrendipin, Lacidipin, İsradipin, Barnidipin HCL, Benidipin, Hidroklorid

2- Selektif kardiyak Ca^{+2} kanal blokerleri Fenilalkilamin türevleri; Verapamil HCL Benzotiazepin türevleri; Diltiazem HCL

3- Non-selektif Ca⁺² kanal blokerleri

Damar düz kas hücrelerinin membranındaki voltaja-bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek eksitasyon sırasında bu kanallardan hücre içine Ca⁺² girişini inhibe ederek vazodilatör etki yaparlar. Vazoselektif olmayanlar, ayrıca myokard ve diğer kalp hücrelerinin membranındaki voltaja-bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarını da bloke ederek, kalbi deprese ederler ve kalp debisini azaltırlar. Kalsiyum kanal blokörleri, kimyasal yapılarına göre 3 gruba ayrılırlar:

1. 1,4-dihidropridin (DHP) türevleri
2. Fenilalkilamin türevleri (Verapamil)
3. Benzotiazepin türevleri (Diltiazem)

Bu üç grubun kalsiyum kanal proteini üzerindeki bağlanma yerleri farklıdır.

Antihipertansif olarak kullanılmaları ilave olarak antianginal olarak ve vazoselektif olmayanlar antiaritmik olarak da kullanılırlar. Hafif ve orta dereceli esansiyel HT'da monoterapi olarak kullanılabilirler. Vazodilatör etkileri, arteriyollerde venüllerdekine göre çok daha belirgindir. Arteriyel kan basıncını düşürmelerine rağmen, diğer bazı gruplardaki ilaçların aksine, serebral ve böbrek kan akım hızında ve glomerüler filtrasyon hızında azalma yapmazlar.

HT tedavisinde, DHP türevleri, vazoselektif oldukları için daha fazla tercih edilirler. Kendi içlerinde en önemli farklılıkları etki süreleriyle ilişkilidir.

Ortak yan etkileri; baş ağrısı, baş dönmesi, yüz kızarması, yüzde ve bacaklarda yanma hissi, ayak bileği ödemi, çarpıntı ve bazen taşikardi, hipotansiyon, kesiklik ve konstipasyondur.

Verapamil, DHP türevlerinden farklı olarak, belirgin kardiyak (negatif inotrop, negatif kronotrop ve dromotrop) etkinlik gösterir. Beta-blokörlerle beraber kullanılmamalıdır. Galopamil, yapıcı ve farmakolojik etki profili bakımından verapamile benzer.

Diltiazem, verapamile göre daha zayıf kardiyak etkinlik gösterir. Beta-blokörlerle beraber kullanılırken dikkatli olunmalıdır.

Nimodipin, anevrizmaya bağlı subaraknoid kanamalı hastalarda damar düz kas hücrelerine kalsiyum girişini engelleyerek, vazospazmı önlediği böylece azalan serebral kan akımı ve iskemiye karşı olan toleransı arttırdığı düşünülmektedir.(46)

2.4.4. Omurilik Yaralanmalarının Medikal Tedavisi

Kalsiyum kanal blokerleri: Yaralanma veya iskemi sonrası hücre membranının hasara uğraması sonucunda kalsiyum kanallarının depolarize olması sonucunda kalsiyumun hücre içine akışı olur. Kalsiyum kanal blokerlerinin kalsiyumun hücre içine girişini engelleyerek omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkili olabileceği düşünülmüştür. Nimodipin bu amaçla kullanılmıştır. Ancak doku hasarını azaltmada veya nörolojik fonksiyonların düzelmesinde belirgin etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Yaralanmadan sonra en geç 1 saat içinde verilmesi gerekmektedir. Bu süreden sonra olumlu etkisi olmadığı belirtilmiştir (47,48, 49)

Omurilik hasarında potansiyel olarak etkiki olabilecek medikal ajanlar:

1-Metilprednizolon: Omurilik yaralanması sonrası oluşan lipid peroksidasyonunu engelleyerek yaralanma sonrası oluşabilecek ikincil doku hasarını önler.

2-Gangliozidler (GM-I): Asidik glikolipidler olup hücre membran dış lipid tabakasındaki ana maddedir. Eksojen gangliosidler lipid tabakasına yerleşip endojen gangliosid gibi davranırlar

3-Laparozoidler: 21- aminosteroiddir. Steroid olmasına rağmen steroidlerin yan etkilerini taşımaz. Antioksidan etkisi metilprednisolon'dan fazladır. Lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Membranı stabilize eder, omurilik kan akımını artırır.

4-Opiat antagonistler(Naloksan): Opiat reseptörlerini bloke ederek ikincil hasara karşı etki gösterir

5-Eksitatör aminoasitler: Eksitatör aminoasitler hücre içine kalsiyum iyonunun girişini başlatırlar. Kalsiyumun hücre içine girişi hücre ölümüne kadar giden bir reaksiyon zincirini başlatır.

6-Kalsiyum kanal blokerleri: Yaralanma veya iskemi sonrası hücre membranının hasara uğraması sonucunda kalsiyum kanallarının depolarize olması

sonucunda kalsiyumun hücre içine akışı olur. Kalsiyum kanal blokerlerinin kalsiyumun hücre içine girişini engelleyerek omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkili olabileceği düşünülmüştür

7-Potasyum kanal blokerleri: Omurilik yaralanması sonrası miyelin kaybı olmaktadır. Demiyelinizasyon uzun dönemde motor ve duyuşal bozukluklara yol açan önemli bir faktördür. Miyelin kaybı aksonların internodal bölgelerinde potasyum kanallarının açılmasına, nöron içine potasyum akışına neden olur

8-Serbest radikal tutucular: Omurilik yaralanması sonucu çeşitli mekanizmalarla serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller instabil moleküllerdir. Hücre içinde ve hücre membranında lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne yol açarlar

9-Antiinflamatuvar ajanlar: Membranı parçalanmış hasara uğramış nöronlarda özellikle araşidonik asid gibi serbest yağ asitleri serbestleşir. Eicosanoidler ve sitokinler araşidonik asiti siklooksijenaz ve lipooksijenaz aracılığıyla prostoglandin ve lökotrienlere dönüştürürler. Bunlarda hücre şişmesine ve kan akım değışikliklerine neden olur

10-Nörotransmitter reseptör agonistleri: Spinal aksonlar, GABA, norepinefrin ve serotonin gibi nörotransmitter reseptörlere sahiptir

11-Nörotropik faktörler Nöronlarınaşam süresini uzattıkları ve nekrotik alanları azalttıkları bildirilmiştir.

12-Fetal doku transplantasyonu: Fetal medulla spinalis dokusu transplantasyonu da aksotomize nöronlara uygun ortam yaratabilir

13-Nötralizan antikolar: Nötralizan antikor IN-1 MSS miyelinlerinde üretilen inhibitör proteinlerden en büyük olan NI-250 adlı proteinin etkilerini bloke ettiği bildirilmiştir

14-Melatonin: Antioksidan ajan olarak nöroprotektif etki gösterir.

15-Hiperbarik Oksijen: Vazokonstruksiyonu azaltarak vazojenik ödemi azalttığı ve kanamanın yayılımını durdurduğu bildirilmiştir.(50)

3. MATERYAL METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı ve Biyofizik Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyaller

Ratlarda arka kök ganglion hücrelerinde Ca^{+2} sinyali üzerine Kollagenaz ile çalışıldı.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Soğutmalı santrifüj: Eppendorf MR5415 (Almanya)
2. Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)
3. Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)
4. Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)
5. Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)
6. Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)
7. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)
8. Cam-Teflon homojenizatör: Çalışkan Cam A.Ş.(Türkiye)
9. pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)
10. Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)
11. Floresan spektrofotometre (Carry Eclipsy Marka, Varian Firması, Avustralya)
12. CO2 inkubator (Shel Lab-Biolab Lab, Fransa).
13. Laminar flow kabini (Bilser BLF2000, İstanbul).

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tris, Merck (Almanya)
2. Glisin, Merck (Almanya)

3. Sodyum Klorür, Merck (Almanya)
4. Tween 20, Merck (Almanya)
5. Bovin Serum Albumin, Merck (Almanya)
6. EDTA, Merck (Almanya)
7. EGTA, Merck (Almanya)
8. Leupeptin, Sigma (Almanya)
9. Triton X-100, Sigma (Almanya)
10. Metanol, Merck (Almanya)
11. Hidroklorik Asit, Merck (Almanya).
12. Histopaque REF-11191-6x100ML (Amerika)
13. Bradford Kimyasalı Bio-Rad 500-0006 (Almanya)
14. Collagenase type II- A7906, 1 gram (Almanya)
15. Collegenase-Type4 Wothington 4188/47M9961 100 mg (Almanya)
16. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj, 35 ml (Sorvall, Ankara)
17. Ultrasantrifüj tüpü, MS-80 santrifüj için, 2 ml (Sorvall Ankara)
18. PC12 hücreleri, DSMZ-Germany. Kültür (37 0C) seklinde
19. Nerve growth factor, Sigma, N0513, 1 mg (Amerika)

3.2. Metot

3.2.1. Deneysel Tedavi

3.2.1.1. Deney Hayvanları ve Deney Planı

Çalışmamızın cerrahi işlem bölümü SDÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma laboratuvarında, Calsiyum sinyal incelemeleri SDÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmada ağırlıkları 170-346 gram olan 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı.

Çalışma 5 ana grup olarak planlandı.

Grup 1: (n=8) kontrol

Grup 2: (n=10) sham kontrol (sadece laminektomi) 3.gün AKG (Arka kök Ganglion) hücreleri alımı

Grup 3: (n=10) laminektomi+travma 3.gün AKG hücreleri alımı

Grup 4: (n=10) laminektomi+travma + iv Nimodipin 3.gün AKG hücreleri alımı

Grup 5: (n=10) laminektomi+travma + iv Nimodipin +oral Nimodipin 3.gün AKG hücreleri alımı

Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm gruptaki hayvanlara genel anestezi amacıyla İnhaler olarak Eter uygulandı.

Cerrahi işlem

Tüm hayvanlar genel anestezi altında sırt bölgesi traş edilerek %10'luk Polyvidon iyot (Batticon, Adeka, Samsun) ile lokal antisepsi sağlandı. Prone pozisyonda T7-L1 seviyesinde cilt, cilt altı dokular geçildi. Paravertebral kas fasyası geçilerek kaslar laterale künt diseksiyon ile sıyrıldı. (Resim 1) Torakal bölgedeki kostalar sayılarak enson kostanın çıktığı yer Th 12 olarak kabul edildi. Torakal 8-12 laminaları görülerek total laminektomi uygulandı. Hayvanların dura materleri sağlam olarak ortaya konuldu. Standart travma amacıyla anevrizma klibi (Sugita no: 07-934-11, kapanma basıncı: 1.37-1.72 N) ile dura ve spinal kord çepeçevre olacak şekilde, horizontal ekstradural olarak 1 dakika süreyle klibe edildi (Resim 2) ve omurilik hasarı oluşturuldu. (Resim 3) Hemostazı takiben tabakalar anatomiye uygun olarak 3/0 prolon ile kapatıldı

1.grup: Kontrol grubu olarak kullanıldı.

2.grup: Sham kontrol grubu olarak kullanıldı. Laminektomi sonrası 3 gün sonra AKG (Arka kök ganglion) hücreleri alındı.

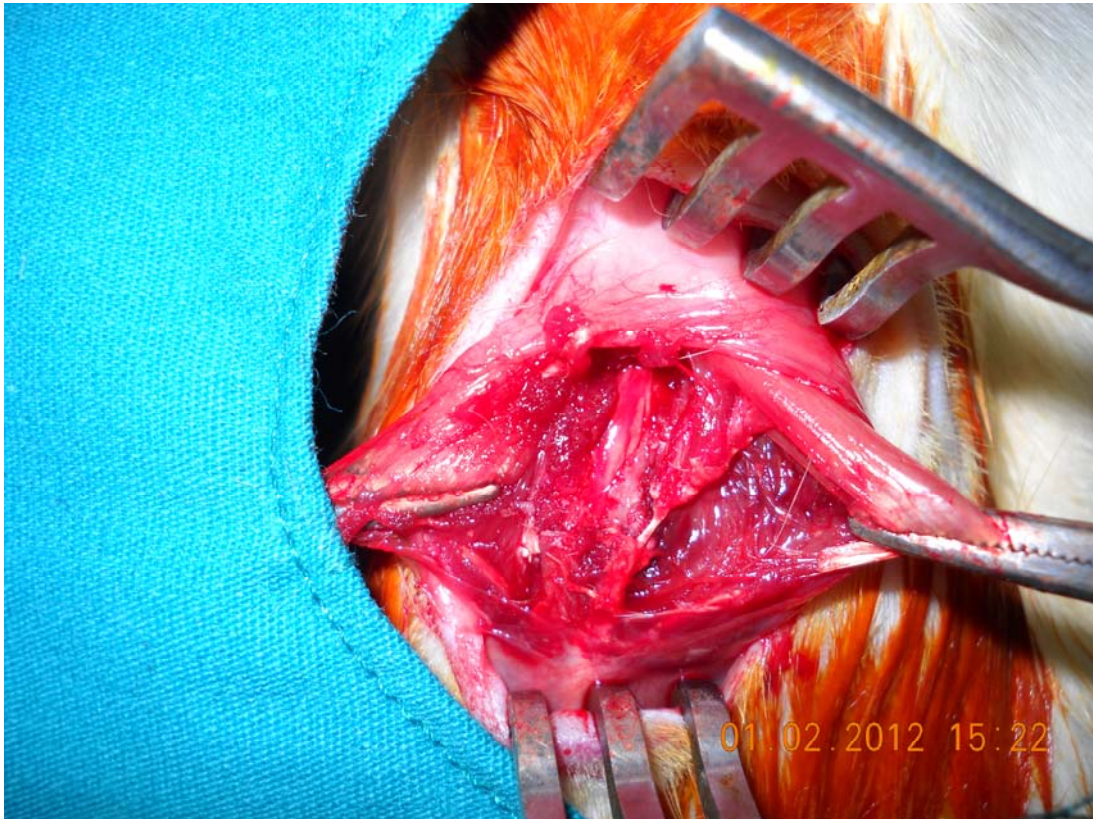
3.grup: Laminektomi sonrası travma oluşturularak 3 gün sonra AKG hücreleri alındı.

4.grup: Laminektomi sonrası 1 dakika süre ile anevrizma klipi ile travma oluşturularak travmadan 10 dakika sonra başlamak üzere günde bir defa Nimodipin 0.5mg/kg iv infüzyon şeklinde verilerek 3 gün sonra AKG hücreleri alındı.

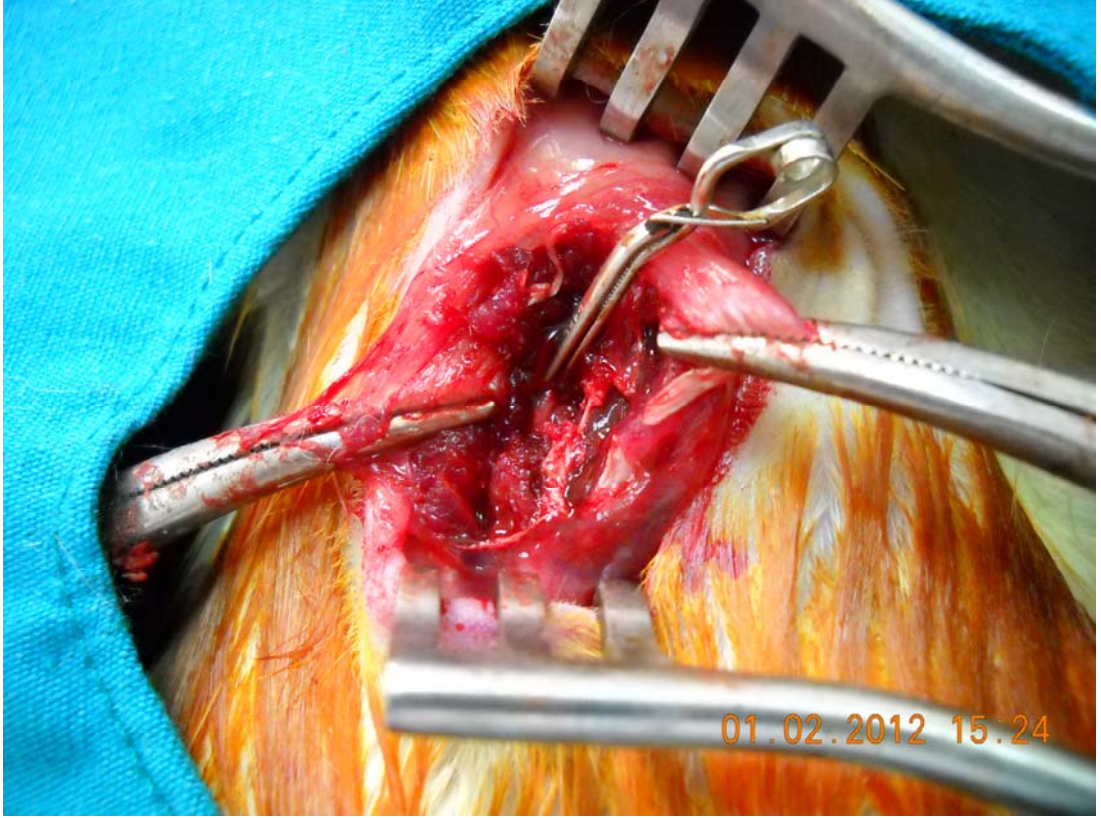
5.grup: Laminektomi sonrası 1 dakika süre ile anevrizma klipi ile travma oluşturularak travmadan 10 dakika sonra başlamak üzere Nimodipin iv verilerek ve oral 15 mg/kg dozunda gavajla Nimodipin verildi. 3 gün Nimodipin (iv) verildi. Daha sonra oral Nimodipin'e başlandı. 3 gün de hem oral hem iv Nimodipin tedavisi verildi. 6.gün sonra AKG hücreleri alındı

Deneyimizde Nimodipin iv infüzyon şeklinde 0.5 mg/kg dozunda oral da gavajla 15 mg/kg dozunda verildi.(51) Spinal travma 1 dakika süre ile anevrizma klipi ile uygulandı.

Deneyimiz sonucunda Ca^{+2} kanal blokleri olarak kullanılan Nimodipin spinal kord arka kök ganglion hücrelerinde kan akımını artırarak ratlarda travma sonrası oluşacak değişiklikler ve moleküler olarak da oksidatif stres üzerine olan etkileri değerlendirildi.



Resim 1. Omuriliğin açılması



Resim 2. Kliplleme işlemleri



Resim 3. Klip sonrası omuriliğin durumu

3.2.1.2. Arka Kök Ganglion Hücre İzolasyonu

Arka kök ganglion hücreleri 2-3 haftalık ratların inhalasyon anestezisi işleminden sonra dekapitasyon işlemini takiben hiç vakit kaybedilmeden sırt omurları bir bütün halinde çıkarıldı. Sırt omurları kas dokusundan olabildiğince ayrıldı ve ventral olarak özel olarak silikon maddesi ile kaplanmış yerine hareket etmeyecek şekilde yerleştirildi. Hücrelerin canlılığını kaybetmemesi için bir miktar DMEM medyumunu (%89 Dulbecco's Modified Eagle Medium, %10 FBS, %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotik kombinasyonu) konuldu. Bu işlemten sonra omurlar median hatlarının üzerinden olacak şekilde eşit iki parçaya ayrılmaya çalışıldı. Spinal kort ve üzerindeki zar stereo mikroskop altında özenle yerleştirildiği alandan dış kısma alındı, bu sırada spinal kort ile sinir gruplarının bağlantısı koparılmamaya özen gösterildi. Her iki vertebra arasına özenle yerleştirilmiş olan hücre yumakları uçları ince uçlu pensler vasıtasıyla yerlerinden alınarak içerisinde antibiyotikli medyum bulunan steril pedri kaplarına konuldu. Tüm hücre yumakları alındıktan sonra içerisinde antibiyotikli medyum bulunan pedri kutusu stereo mikroskop altına alınarak hücre yumaklarının gangliyon uzantılarından ayrıldı ve bir saat süresince inkübatörde (37 °C ve %5 CO₂) kollejenazlı solüsyon (% 0,25) içerisinde bekletildi. Bir saat sonrasında mekanik parçalama işlemine geçildi ve sırası ile ilk önce 1 ml hacimli (farklı genişliklerdeki uçlarla) pipet uçları ile daha sonra 200 mikrolitre hacimli pipet uçları ile ve en sonunda da steril insülin iğnelerinden geçirilerek mekanik parçalama işlemi tamamlandı. Bu işlemler tamamlandıktan sonra hücreler medyumlarından ayrılmak üzere santrifuj işlemine tabi tutuldu ve sonrasında Na⁺ / HEPES tamponu ile homojen hale getirilerek floresan boyar maddesi Fura-2 AM maddesi ilave edilerek bir saat süresince 37 °C de çalkalamalı su banyosuna konuldu.

3.2.2. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü

3.2.2.1. İndirgenmiş Glutatyon (GSH) sinyali

GSH düzeyleri Sedlak and Lindsay'in (52) bildirdikleri yönteme göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar; %10 trikloroasetik asit (TCA) solüsyonu Tris tamponu (0,4M pH:8,9): 48,46 gram tris-

hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH: 8,9 olacak şekilde 1 litrede çözülmesi ile hazırlanır.

Deneyin yapılışı: 0,1 ml hücre homojenatı 0,4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi, 0,1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0,9 ml distile su, 2,0 ml Tris tamponu ve 0,1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Kullanılan kimyasallar:

- 1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH:7,6
- 2- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 3- DTNB solüsyonu

Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk (53) tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi.

Kullanılan Solusyonlar:

- 1- Tris (1) HCl tampon solusyonu (50 mM) pH:7,6
- 2- GSH solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- %10 TCA solüsyonu
- 5- Tris (2) tampon 0,4 M pH: 8,9
- 6- DTNB solüsyonu

Tablo 4. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Hücre homojenatı	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi.	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi.	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu.)	0.1 ml	0.1 ml
Oda ısısında tam 10 dakika beklendi		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı		
Üzerine Tris tampon eklendi.	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi.	0.1 ml	0.1 ml

Oda ısısında 5 dakika beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu

3.2.3. Lipit Peroksidasyon Analizi

DRG hücrelerinde lipit peroksidasyon düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve arkadaşlarının (54) bildirdikleri yöntemle göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile son derece hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı.

Deneyin yapılışı: Tüm DRG hücre grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100 C'lik kaynar suda, su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dk santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3

tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler mikromol/gram protein olarak belirlendi. Sonuçlar nanomol/ gram protein olarak verildi.

3.2.4. İntrasellüler Kalsiyumun Ölçülmesi

Hücre içi kalsiyum miktarının ölçümü için AKG hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca 4 μ M fura-2 AM floresan boyası ile boyandı (55). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2x10⁶ olacak şekilde Na⁺-HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; CaCl₂, 1,2; MgCl₂, 1,1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7,4)] solüsyonu içerisinde floresan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında floresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık yedi dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca⁺² iyon düzeyi [Ca⁺²]i değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi (56) ve Grynkiewicz ve arkadaşlarının metoduna göre hesaplandı (57).

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerinde SPSS 17.0 programında tanımlayıcı istatistik (median, min-max, standart deviasyon) değerleri, Mann Whitney U Testi yapıldı. Tüm gruplar arasında spinal travma sonrası Ca⁺² sinyali düzeyleri Kruskal Wallis testiyle analiz edildi. Bu gruplar arası farkı incelemek için ikili karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı (grup sayıları n<30 olduğundan dolayı non parametrik test uygulandı).Bu karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak alındı. Grafikler Microsoft Excel programında oluşturuldu.

Ca⁺² Sinyali için Ortalama değerler

Report							
data1							
Grupdata1	Mean	N	Std. Deviation	Minimum	Maximum	Std. Error of Mean	Range
1	1,647051E4	9	2,9349509E3	13270,5068	22873,0860	978,3169534	9602,5792
2	2,139374E4	9	5,3403560E3	13654,5165	31102,3558	1,7801187E3	17447,8393
3	5,760870E4	9	2,1785466E4	21796,8811	84854,2837	7,2618219E3	63057,4026
4	3,859702E4	9	1,1543179E4	24322,7863	59742,1064	3,8477263E3	35419,3201
5	3,188664E4	9	9,1407536E3	21676,8718	52304,8926	3,0469179E3	30628,0208
Total	3,319132E4	45	1,8611707E4	13270,5068	84854,2837	2,7744694E3	71583,7769

4. BULGULAR

4.1. Arka Kök Ganglion hücrelerinde Sitozole Kalsiyum İyonu [Ca⁺²] Salınımı Düzeyleri ve gruplar arasında karşılaştırmalı sonuçlar

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	1	9	7,00	63,00
	2	9	12,00	108,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	18,000
Wilcoxon W	63,000
Z	-1,997
p değeri	,046
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,050 ^a

Kontrol grubu (1.grup) ile 2.grup sadece laminektomi yapıp 3 gün sonra AKG hücreleri alınan grupta p değeri: 0.046 geldi. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca⁺² sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	1	9	5,11	46,00
	3	9	13,89	125,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	46,000
Z	-3,495
p değeri	,0001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,000 ^a

Kontrol grubu ile 3.grup (laminektomi ve spinal travma uygulanıp) 3 gün sonra AKG hücreleri alınan grupta p değeri 0.0001 saptandı 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca⁺² sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	1	9	5,00	45,00
	4	9	14,00	126,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	45,000
Z	-3,578
p değeri	,0001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,0001 ^a

Kontrol grubu ile 4.grup (laminektomi, spinal travma ve İV Nimodipin uygulanıp) 3 gün sonra DRG hücreleri alınan grupta p değeri 0.0001 saptandı. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca⁺² sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	1	9	5,22	47,00
	5	9	13,78	124,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	2,000
Wilcoxon W	47,000
Z	-3,417
p değeri	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001

Kontrol grubu ile 5.grup (laminektomi, spinal travma ve 3 gün İV Nimodipin ve 3 gün oral Nimodipin uygulanıp) DRG hücreleri alınan grupta p değeri 0.001 geldi. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca⁺² sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	2	9	5,56	50,00
	3	9	13,44	121,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data 1
Mann-Whitney U	5,000
Wilcoxon W	50,000
Z	-3,158
p değeri	,002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^a

Sham Kontrol (2.grup) grubu ile 3.grup arasında p değeri 0.02 geldi. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca^{+2} sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	2	9	5,44	49,00
	4	9	13,56	122,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data 1
Mann-Whitney U	4,0
Wilcoxon W	49,000
Z	-3,241
p değeri	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001 ^a

Sham Kontrol grubu (2.grup) ile 4.grup arasında p değeri 0.01 geldi. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca^{+2} sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	2	9	5,78	52,00
	5	9	13,22	119,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	7,000
Wilcoxon W	52,000
Z	-2,989
p değeri	,003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: Grupdata1	

Sham Kontrol grubu (2.grup) ile 5.grup arasında p değeri 0.003 geldi. 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Hücre içinde Ca^{+2} sinyali artışı görüldü.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	3	9	11,67	105,00
	4	9	7,33	66,00
	Total	18		

Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	21,000
Wilcoxon W	66,000
Z	-1,726
p değeri	,084
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,094 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: Grupdata1	

3.grup (Laminektomi ve spinal travma uygulanan ratlarla) 4.grup arasında p değeri 0.084 saptanması üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	3	9	12,33	111,00
	5	9	7,67	60,00
	Total	18		

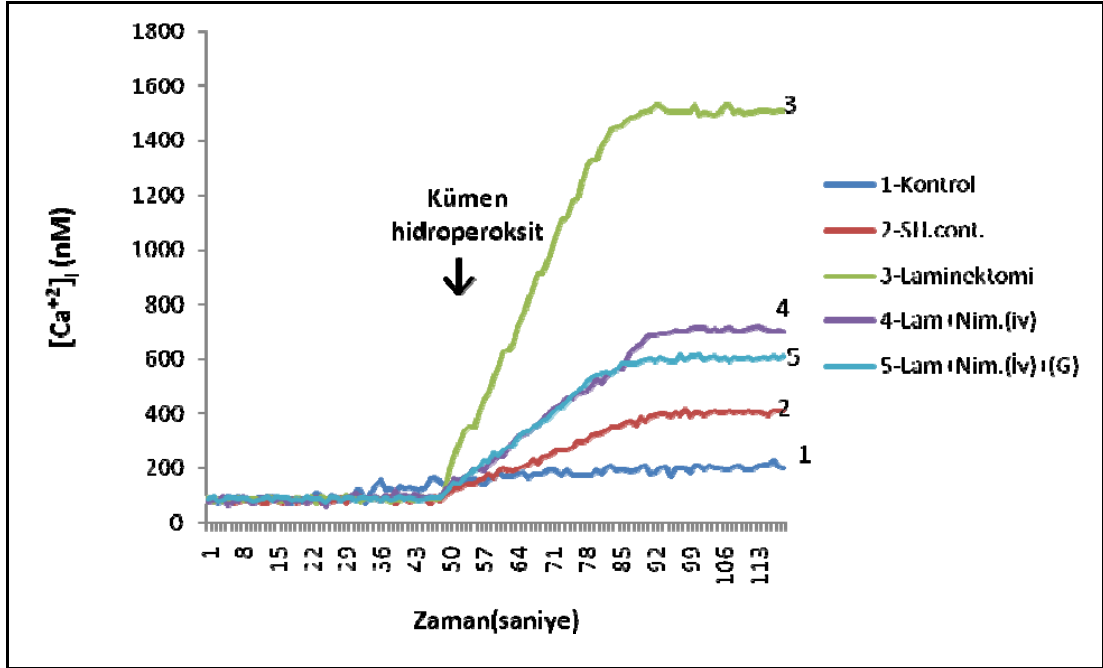
Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	15,000
Wilcoxon W	60,000
Z	-2,268
p değeri	,023
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,024 ^a

3.grup ile 5.grup arasında p değeri 0.023 saptanması üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Burada 5.grupta hem iv hem de oral olarak uyguladığımız Nimodipin'in etkili olduğu görülmüştür. Ca⁺² sinyali azalmıştır.

Ranks				
	Grupdata1	N	Mean Rank	Sum of Ranks
data1	4	9	11,33	102,00
	5	9	7,67	69,00
	Total	18		

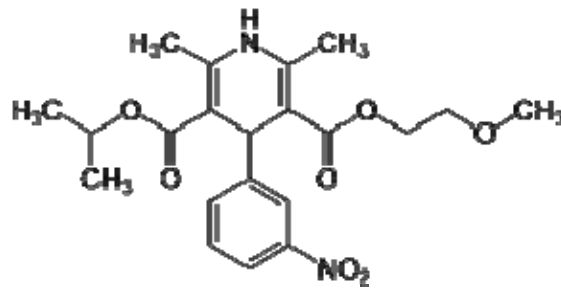
Test Statistics ^b	
	data1
Mann-Whitney U	24,000
Wilcoxon W	69,000
Z	-1,465
p değeri	,143
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,161 ^a
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: Grupdata1	

4.grup ile 5. grup arasında p=0.161 gelmesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.



Şekil 4. İntravenöz (İV) ve oral (G) nimodipinin (N) laminektomi (Lam) yapılan sıçan AKG sinir hücreleri serbest Ca²⁺ salınışı üzerindeki etkileri. (ortalama±SD)

Bu şekilde, yaptığımız deneyde 5 gruptaki hücre için Ca²⁺ salınımı görülmektedir. Kümen Hidroperoksit hücre membranında Ca²⁺ kanallarını açıcı olarak görev almaktadır. En fazla Ca²⁺ salınımı 3. Grupta görülmektedir. Bu grupta laminektomi ve 1 dakika süre ile travma uygulamıştık. 4. ve 5.gruplarda Ca²⁺ salınımı düşmüştür. Bu da uyguladığımız Nimodipin ilacının Ca²⁺ alınımasını azalttığını göstermiştir.



Şekil 5. Nimodipin (2,6-Dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-1,4-dihydropyridin-3,5-dicarbonsäure-3-isopropylester-5-(2-methoxyethyl)ester) molekülü

Nonparametrik Koreleasyonlar

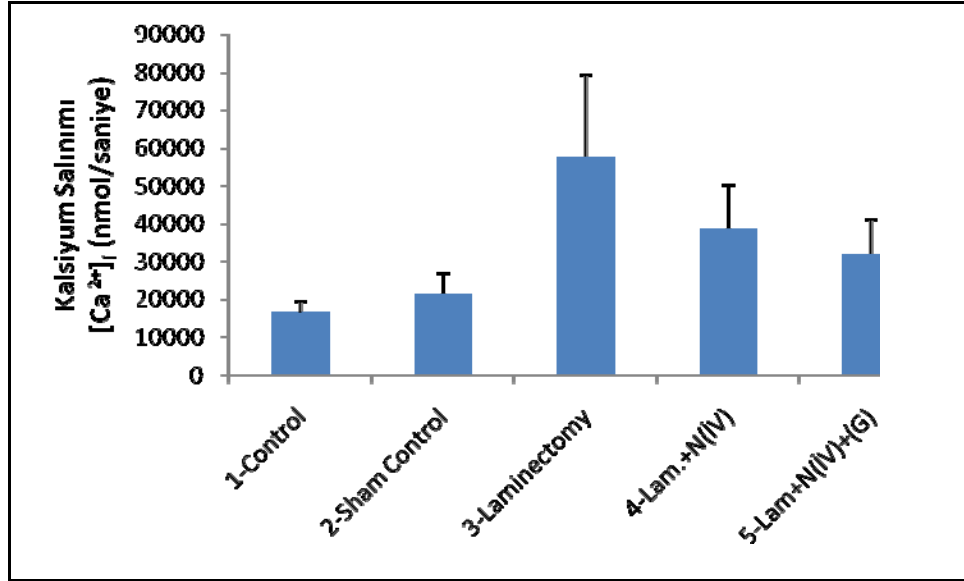
[DataSet1]

Correlations		ControlD1	Sham ControlD1	LaminectomyD1	Lam.+Nim.(IV)D1	Lam.+Nim.(IV)+(Gav.)D1
Kendall's tau_b	ControlD1	Correlation Coefficient	1,000	,423	,197	,243
		Sig. (2-tailed)	.	,080	,463	,381
		N	9	9	9	9
Sham ControlD1		Correlation Coefficient	-,487	-,555*	-,185	-,200
		Sig. (2-tailed)	,080	.	,509	,491
		N	9	9	9	9
LaminectomyD1		Correlation Coefficient	,423	1,000	,343	,555*
		Sig. (2-tailed)	,116	.	,206	,048
		N	9	9	9	9
Lam.+Nim.(IV)D1		Correlation Coefficient	,197	,343	1,000	,555*
		Sig. (2-tailed)	,463	,206	.	,048
		N	9	9	9	9
Lam.+Nim.(IV)+(Gav.)D1		Correlation Coefficient	,243	,555*	,555*	1,000
		Sig. (2-tailed)	,381	,048	,048	.
		N	9	9	9	9

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Non-parametrik koreleasyonda 3. ve 4.gruplarda p değeri 0.05 altında olduğu için istatistiksel olarak anlamlı olarak değerlendirildi.

	Control	Sham Control	Laminectomy		Lam.+Nim.(iV)	Lam.+Nim.(iV)+(Gav.)
	13270,50681	25148,02549	23794,83025		24322,78631	21676,87175
	16097,29935	31102,35577	21796,88106		26370,586	26196,16708
	18237,03099	13654,51651	72288,95281		27150,97236	22392,47858
	22873,08599	13866,74041	84854,28367		39980,50837	52304,89259
	15315,60821	23197,07918	75300,23849		43677,3727	36862,78477
	14709,22757	21393,74347	67616,98577		48934,79992	31886,63895
	17700,94636	21393,74347	57608,69534		59742,10643	31886,63895
	13560,40304	21393,74347	57608,69534		38597,01887	31886,63895
	16470,51354	21393,74347	57608,69534		38597,01887	31886,63895
ortalama	16470,51354	21393,74347	57608,69534		38597,01887	31886,63895
strdspma	2934,95086	5340,355969	21785,46572		11543,17894	9140,753568
	1-Control	2-Sham Control	3-Laminectomy	4-Lam.+N(iV)	5-Lam+N(iV)+(G)	
ortalama	16470,51354	21393,74347	57608,69534	38597,01887	31886,63895	
strdspma	2934,95086	5340,355969	21785,46572	11543,17894	9140,753568	



Şekil 6. Kontrol, Sham kontrol, Laminektomi, Laminektomi + iv Nimodipin, Laminektomi + Nimodipin iv-oral verilen gruplardaki AKG sinir hücrelerinde serbest Ca²⁺ salınımı (nmol/saniye).

Tablo 5. DRG hücrelerinde lipit peroksidasyon (LP), indirgenmiş glutatyon (GSH) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) düzeyleri üzerinde İntravenöz (İV) ve oral (G) nimodipinin laminektomi (Lam). (ortalama değer±standart sapma).

Değerler	LP (µMol/gr protein)	GSH (µMol /gr protein)	GSH-Px (IU/gr protein)
Kontrol	2.90 ± 0.45	1.69 ± 0.08	2.33 ± 0.29
Sham Kontrol	2.90 ± 0.32	2.02 ± 0.09	2.18 ± 0.36
Laminektomi	3.02 ± 0.40	1.78 ± 0.10	2.47 ± 0.16
Nİmodipin (iv)	3.33 ± 0.43	1.77 ± 0.08	2.53 ± 0.41
Nimodipin (iv+oral)	3.01 ± 0.63	1.88 ± 0.10	2.48 ± 0.44

LP, GSH ve GSH-Px değerleri bakımından gruplar arası farklılık gözlenilmedi. Uyguladığımız Nimodipin ilacının oksidatif stres değerleri üzerinde etkisi tespit edilemedi.

5. TARTIŞMA

Omurilik hasarı fiziksel, duygusal ve ekonomik boyutu ile toplumun geniş bir kesimini etkilemektedir. Komplet ya da inkomplet olsun sonuçları açısından büyük bir sosyal problem olup hayatta kalanların yarısından fazlası normal yaşantısına geri dönememektedirler. (58) Birçok araştırmacı nörolojik fonksiyonları düzeltmek için akut omurilik hasarı patofizyoloji mekanizmaları üzerinde değişik metodlar bulmaya çalışmışlardır. Tedavi için harcanan yoğun çabalar, çağdaş yaklaşıma olumlu katkılarda bulunmaktadır ancak kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve aynı zamanda evrensel bir tedavi protokolü geliştirilememiştir (59)

AKG hücreleri de sinir impuls iletiminde görev alırlar ve sinir iletiminde önemli rol oynamaktadırlar. Çalışmamızda sinir iletimi ve Ca^{+2} sinyali üzerine olduğu için AKG hücreleri kullanılmıştır. AKG hücreleri vücutta ağrının oluşum mekanizmasından sorumlu hücrelerdir. AKG hücrelerinin zarlarında oluşabilecek oksidatif hasara bağlı değişiklikler bu hücrelerin harabiyetine ve sinir hücreleri arasındaki iletim bozukluklarına neden olabilmektedir. (60)

Omurilik hasarı patofizyolojisinde hala primer mekanik yaralanmaların ve bunu izleyen sekonder yaralanmaların altında yatan nedenler; iskemi, anormal intrasellüler iyon şiftleri (Na , Ca^{+2}), hücre membranlarının serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonu, ödem, lökosit infiltrasyonu ve eksitotoksik hücre ölümüdür.

İnflamasyon, spinal kord yaralanması sonrasında çok hızlı bir şekilde başlamaktadır. Yaralanmayla başlayan ve devam eden kanama, ödem, nöroeksitotoksinlerin akümüasyonu ve biyokimyasal değişiklikler; inflamasyonun merkezi sinir sistemi üzerindeki esas etkilerini belirlemede zorluklar yaratmaktadır. İnflamasyon canlı dokunun her türlü zedelenmeye karşı gösterdiği ortak bir reaksiyondur. İnflamasyon yaralanma alanındaki vasküler, nörolojik, hümorale ve hücresel yanıtları içermekle birlikte organizmanın zedeleyici etkeni çevreleyerek yok etme ve zararlı süreçleri sınırlandırmasını sağlayan ve takiben doku onarımına yol açan bir süreçtir (57).

Travma sonrası bu alana infiltre olan nötrofiller, makrofajlar ve aktive mikroglyalar sellüler debrisini temizlerler ancak bu sırada sitotoksik veya nörotrofik

molekülleri de hasarlı spinal korda salarlar. Mikroglialar SSS’de immün hücreler gibi önemli rol oynarlar. Mikroglialar SSS boyunca dağılır ve gliaların % 10-15’ini oluştururlar. Normal durumda istirahat halindedir ama SSS travması, apoptozis, iskemi, inflamasyon ve enfeksiyon ile uyarılınca aktif duruma geçer. Bu stimuluslarla bir kez aktive olunca biyoaktif maddeler, sitokinler ve nörotransmitterler salınır.

Çalışmamızda Rivlin ve Tator tarafından 1978 yılında geliştirilen klip kompresyon modelini kullandık. Laminektomi sonrası omuriliğin lateralinden konan anevrizma klipi belli bir süre omuriliği komprese etmektedir. Kompresyon çevresel olduğu için insanda olan travma tipine daha uygundur. Bunun yanında yalnız küçük hayvanlara uygulanabilir. Mekanik yaralanma yanında iskemiye de yol açar. Ağırılık düşürme ve balon kompresyon modeline göre daha güvenilir bir yöntemdir.

Akut omurilik hasarının optimal tedavisi için gelişmeler devam etmektedir. Günümüzdeki farmakolojik tedavi, yaralanmadan sonraki 8 saat içinde iv prednizolon verilmesini içermektedir. Randomize yapılan klinik çalışmaların sonucunda metilprednizolonun belirtileri gerçektir ama klinik gelişmedeki rolü sınırlıdır. Omurilik kan akımını ve perfüzyonunu arttırarak nörolojik kayıpları azalttığı bildirilmiştir. NASCIS II protokoluna göre; ilk 8 saat içinde 30 mg/kg/ 15 dakika, devamında 5.4 mg/kg/23 saat infüzyon halinde uygulanan metilprednisolonun morbidite ve mortaliteyi azalttığı bildirilmiştir (61,62).

Son zamanlarda serbest radikaller, eksitatör aminoasitler, inflamatuvar cevap mediatörleri, lokal nörotransmitter toksisitesi gibi posttravmatik patokimyasal olayları inhibe etmeye odaklanılmıştır.

GM-1 Asidik glikolipidler olup hücre membran dış lipid tabakasındaki ana maddedir. Eksojen gangliosidler lipid tabakasına yerleşip endojen gangliosid gibi davranırlar. Travmadan 48 saat sonra başlanmış ve ortalama 26 gün uygulanmıştır. Bir yıl sonunda hastalar Frankel ve ASIA motor skoruna göre değerlendirildiklerinde GM-1 anlamlı düzeyde yararlı olarak bulunmuştur (63,64,65).

Larazoidler (Trilazad Mesylat) 21- aminosteroiddir. Steroid olmasına rağmen steroidlerin yan etkilerini taşımaz. Antioksidan etkisi metilprednisolon’dan fazladır. Membranı stabilize eder, omurilik kan akımını arttırır. Trilazad mesylat’ın

(U74006F) serbest radikal tutucu mekanizmayla da etkili olduğu bildirilmektedir. NASCIS III çalışması trilazad ile metilprednisolonun etkilerini karşılaştırmaya yönelik yapılmaktadır (64,65,66,67).

Yüksek dozda Naloksanın deneysel kontüzyon modelinde omurilikte kan akımını artırarak klinik düzelme gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca naloksanın paretik hastalarda daha etkili olduğu gösterilmiştir (68,69) .

Eksitator aminoasitler hücre içine kalsiyum iyonunun girişini başlatırlar. Kalsiyumun hücre içine girişi hücre ölümüne kadar giden bir reaksiyon zincirini başlatır. Çeşitli reseptörler NMDA, α -amino 3- hydroxy -5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) ve kainate (KA), bunlar GYKI 52466 AMPA reseptör antago nisti olup deneysel çalışmalarda akut omurilik yaralanmalarından sonra önemli terapötik nöroprotektif etkili olduğu bildirilmiştir (70,71)

4-aminopyridin, internodal bölgelerdeki potasyum kanallarının blokeridir. 4-AP, aksiyon potasyelinin süresini uzatarak demiyelinize alanlarda sinir iletisini artırır. Potasyum kanal blokerlerinin kronik dönemde nöronal fonksiyonun yeniden sağlanmasında olumlu etkilerinin olduğuna inanılmaktadır (72,73).

E vitamini serbest radikalleri redükte eder, hücre membranına girerek poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu engeller. Selenyum, hidrojen peroksidi redükleyen glutatyon peroksidazın kofaktörüdür. Hücre içindeki hidrojen peroksidi ve diğer bazı peroksidleri temizler. Trilazad mesylat, antioksidan etkisiyle serbest radikal tutucu olarak etki göstermektedir (66,66) .

İndomethazin, glukokortikoid, siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitörleri gibi antienflamatuvar ajanlar hasarlı omurilikte eicosanoidlerin serbestleşmesini azaltırlar. İnterferon potent bir proinflamatuvar ajandır. Omurilik üzerine faydalı etkileri olduğu yazılmıştır. Ancak bu hastalarda antiinflamatuvar ilaçların dozu nöroprotektif etkisi için toksik olduğu bildirilmiştir (72)

5-HT reseptör agonisti quipazine, çeşitli adrenerjik agonistler ve GABA antagonistleri gibi çeşitli sentetik reseptör agonistlerinin spinal aksonlar üzerinde kuvvetli eksitator etkileri vardır. Bunların deneysel omurilik hasarı modellerinde nöroprotektif olduğu bildirilmiştir (72).

Nörotropik faktörlerden NT3 (Neurotrophin 3) , omurilik yaralanmalarından günler veya haftalar sonra hasarlanmış aksonlarda görülen atrofi ve retrograd hücre ölümlerinin önlenmesi amacıyla verilmiştir (72,74).

Astrosit ve schwann hücreleri gibi destekleyici dokuların kültürde üretildikten sonra hasarlı omurilik uçlarında rejenerasyonu başlattıkları gösterilmiştir. Çeşitli araştırmalarda transplante edilmiş oligodendroglial hücrelerin de omurilikte miyelinizasyonu başlattıkları bildirilmiştir (74, 51, 75)

Omurilik yaralanmalarında bu antikor infüzyonunun bazı aksonlarda rejenerasyona ve dallanmaya yol açtığı tespit edilmiştir. Oligodendrositlerden elde edilen myelin-associated glikoproteinde (MAG) nötralizan antikor olarak etkili bulunmuştur (75)

Melatonin membran lipidleri üzerinde anti oksidan etkisinden dolayı deneysel çalışmalarda lipid peroksidasyonunu azaltarak omuriliği ikincil doku hasarından koruduğu bildirilmiştir (50)

Hiperbarik oksijen tedavisi Omurilik yaralanmasının erken döneminde (ilk 6 saat) uygulandığında iskemiye önleyerek akson ve miyelin hasarını azaltarak nöronal rejenerasyonu sağladığı ve nörolojik iyileşme üzerine etkili olduğu yayınlanmıştır (76,77).

Sistemik hipotermi etki mekanizması konusunda çeşitli görüşler vardır. Oksijen serbest radikallerini azalttığı, eksitatör amino asid nörotransmitter glutamatın serbestleşmesini baskıladığı, hücre içi kalsiyum birikmesini azalttığı, enflamatuar cevapları engellediği, polimorfonükleer lökosit birikmesini önemli oranda azalttığı bildirilmiştir (77).

Progesteronla yapılan bir çalışmada, spinal kord yaralanması sonrası progesteronun 6.saatte ortaya çıkan inflamatuvar sitokinlerinden olan TNF- α 'ı anlamlı olarak düşürdüğünü ortaya koymaktadır. (78)

Tamoksifen ile yapılan bir çalışmada spinal kord yaralanması sonrası sitokinlerin travma sonrası 6 saatte en yüksek seviyelere ulaşması sırasında sıçanlarda ikincil patolojik biyokimyasal olaylar bağlamında tamoksifen için bir nöroprotektif ve restoratif rolünü desteklemektedir. (79)

Quardouz ve ark, Nimodipin ile KB-R7943'in (Na- Ca^{+2} exchange inhibitörü) spinal kord yaralanmasında etkisini araştırmışlardır. Nimodipin'in L tipi Ca^{+2} kanallarını bloke ederek ikisinin beraber uygulanmasının Ca^{+2} 'un hücre içinde azaltarak dorsal kolonda yararlı bir nöroprotektif etki yaptığını düşünmüştür. (80)

Winkler ve ark, spinal kord travması verilen Nimodipin ile travma sonrası gelişen eksitator potansiyelleri incelemişler. Bu potansiyeller sağ tibial, sağ sural sinirin uyarılması ve kuyruk kısmına yerleştirilen elektrodlarla kayıt altına alınmıştır. Nimodipin verilen grupta aksonal hasar ve potansiyel kaybı çok daha az olarak bulunmuştur. (81)

Deng ve ark, tarafından omurilik travması uygulanan ratlarda sinir büyüme faktörü (NGF) ve Nimodipin karşılaştırılmıştır. Travma sonrası ratlarda 3,6,12,24,72 saatlerde SOD (Superoksit Dismutaz) değerleri ölçüldü. 6 ve 8 saatte SOD değerleri yüksekti. Serbest iyonik kalsiyum konsantrasyonu intraselüler çalışmadaki gruplarda ($P < 0.05$) en düşük olmuştur. Spinal kord greft laboratuvarında yapılan bu çalışma da omurilik hasarını onarmak için etkili bir yöntem olmasına rağmen, NGF ve Nimodipin ikincil hasarı durdurmak ve ana sağkalım oranını artırabileceğini düşünmüşlerdir. (82)

Inamura ve ark, omurilik travması uygulanan ratlara intratekal Nimodipin vermişler. Spinal kord kan akımı ve uyarılmış potansiyelleri ölçmüşlerdir. Fakat intratekal olarak Nimodipin vermenin plasebo grubuna karşı spinal kord kan akımını artırıcı etkisi saptanmamıştır. (83)

Ross ve ark, ratlarda omurilik travma modelinde Nimodipin ve Metilprednisolon'un spinal kord kan akımı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi 1 dakika süre ile spinal kord kliplemişler. Nimodipin ve Metilprednisolon'un plaseboya karşı önemli bir üstünlük sağlamadığı görülmüştür. (84) Yine Ross 'un yaptığı başka bir çalışmada omurilik travma modelinde MEP (Motor Uyarılmış Potansiyeller) ve SSEP (SomatoSensoryal Uyarılmış Potansiyeller) tespit edilmiştir. Nimodipin çeşitli dozlarda iv olarak verilmiştir. MEP ve SSEP tüm sıçanlarda yaralanma sonrası herhangi bir grupta uyarılmış potansiyellerde hiçbir iyileşme bulunamamıştır.. MEP ve SSEP'de belirgin fark saptanmamıştır. (85)

Holtz ve ark, omurilik travması yapılan ratlarda Nimodipin ve AntiNötrofil Serum (ANS) denemiş olup gelişen paralizilerde iki ilacın da etkili olmadığını bildirmişlerdir. (86)

Nimodipin nöroprotektif etkinliği olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiş bir vazodilatör bir ajandır. Fakat bu etkisini hangi mekanizma üzerinden gösterdiğine yönelik araştırmalar ve tartışmalar halen devam etmektedir.

Bilindiği gibi nöron hücrelerinin [örneğin primer duyu nöronları ve arka kök gangliyon (AKG) hücreleri] patofizyolojileri, başta ağrı oluşumu mekanizmaları olmak üzere birçok patofizyolojik konuda büyük öneme sahiptir. Hücre içerisinde Ca^{+2} iyonunun aşırı artışı hücreleri ya çalışamaz hale getirmekte veya ölüme kadar götürmektedir. Bu yollardaki meydana gelen patofizyolojik olaylarda Ca^{+2} sinyali ve oksidatif stresin öneminin iyi bilinmesine rağmen AKG hücrelerinde Nimodipin'in koruyucu rolü ve patofizyolojik mekanizmaları halen bilinmemektedir.

Nöropatik ağrı ve diyabetik polinöropati olarak adlandırılan ve periferik sinir sistemindeki en yaygın bozukluk olarak bilinen bu rahatsızlıklar, artmış bir şekilde bulunan hücre zarı Ca^{+2} kanal anormallikleri ve fonksiyonları ile ilişkilendirilmişlerdir (87). Hücre zarında bulunan kanallardaki fonksiyon bozukluklarında hücre içerisindeki Ca^{+2} seviyelerinin hızlı değişimi ve sonucunda da hücrenin uyarılabilirlik sıklığının değişimini doğurmaktadır. Primer eferent nöronların uçlarında ve sinir hücrelerinin gövdelerinde bulunan T tipi Ca^{+2} kanallarının aktivitelerinin farklı kimyasal ajanlarla azaltılmasının birçok sinir hücresi hasarında oluşan nöropatik ağrının azaltılmasında etkin olduğu bildirilmiştir (88). Hücre içerisine giren Ca^{+2} , içerisinde glutamat gibi nörotransmitter maddeler bulunan depoların içerisindeki bu moleküllerin sinapslara boşaltılmasına neden olur. Ağrının şiddetinin azaltılmasında Ca^{+2} 'un hücre içerisine giriş yollarını bloke etmekte günümüzde ciddi olarak hedeflenen bir yaklaşım olmuştur. Schroeder ve arkadaşları opiatların presinaptik uçlardaki Ca^{+2} 'un hücre içerisine girişini G proteini aracılığı bloke ederek ağrı algısının azaldığını bildirmişlerdir. Ca^{+2} dengesinde anormallikler hücre içerisindeki Ca^{+2} miktarının artmasına neden olmakta ve bu anormal artış da uyarılabilir hücrelerde anormal ağrının hissedilmesine neden olmaktadır (89). Çalışmamın hedeflerinden bir tanesi de $[Ca^{+2}]_i$ seviyeleri ile oksidatif stres deneyleri

sonucu elde edilen bulguları değerlendirmek ve ağrının oluşum mekanizmasında temel rol alan AKG hücrelerinde bu verileri apoptotik deneylerle kontrol etmekti. Oksidatif stresle inkübe edilen ve daha sonrasında tekrar oksidatif stres ile uyarılan AKG hücrelerinde hücre içi depolardan sitozole salınan Ca^{+2} miktarı ve bunun sonucunda oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyonu düzeyleri artmıştır.

Oksidatif stres hücredeki çekirdekte ADP-riboz (ADPR) üretimini 3 yolla artırmaktadır. ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlere ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesi IP3 tarafından hücre içi organellerden Ca^{+2} serbest bırakılmasını sağlar. Voltaja duyarlı Ca^{+2} ve transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif feed back ile Ca^{+2} girişi sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG) tarafından ADPR'ye hidroliz edilir. Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyarabilir. Sitozolda Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole H_2O_2 lerin gelişi daha fazla ROT üretilir. (90) ADPR ve ROS geri bildirim mekanizması ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır (91). Artan oksidatif strese bağlı olarak bir kısım katyon kanallarının açılması bağlı olarak sitozole Ca^{+2} akışının artışına neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda Nimodipin'in hücre içi Ca^{+2} değerleri üzerinde azaltıcı etkisi tespit edildi. Fakat oksidatif stres değerleri üzerinde anlamlı değerler saptanmadı.

6. SONUÇ

Çalışmamızda Ca^{+2} kanal blokeri olan Nimodipin'in spinal kord yaralanması sonrası AKG hücrelerinde Ca^{+2} sinyali ve oksidatif stres üzerine olan etkileri araştırılmıştır. İkincil hasarın önlenmesinde daha önce Ca^{+2} kanal blokörü denenmiş olup spinal kord kan akımını artırarak iyileşmeyi olumlu yönde etkilediğine dair çalışmalar yapılmıştır. Nimodipin voltaja-bağımlı L-tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek etki etmektedir.

Ağrının oluşum mekanizmasında dorsal kök sinir hücrelerinin sitozolüne patofizyolojik düzeyde kalsiyum iyonu (Ca^{+2}) akışının ve sonrasında oksidatif stres aktivasyonu geri bildirim yolu ile sitozole daha fazla kalsiyum akışının rol oynadığı iyi bilinmektedir. (92)

Reaktif oksijen türleri (ROT) olan superoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi hemoglobin poliansatüre yağ asitleri ile otooksidasyon ile sürekli üretilir. Lipid peroksidasyonu hücre yaralanmasına intrasellüler zar ve hücre yıkılmasına sebep olabilir ve sonradan hücre ölümüne sebep olur. Hücrelerde çeşitli antioksidan mekanizmaları ROT'un zararlı etkilerine sebep olur, ancak hipoksiyle antioksidan mekanizmaların verimliliğinin kaybı ve mitokondrial elektron sisteminde serbest radikal oluşumunda artış olur. Glutasyon peroksidazın (GSH-Px) suyla katalizi hidrojen peroksitin azalmasıyla sonuçlanır. GSH-Px aynı zamanda organik hidroperoksidaz ortadan kaldırabilir (93,94).

Hücreler glutamat reseptörleri aracılığı ile uyarıldıklarında Mg^{+2} düzeyi azalması ve hücre içi Ca^{+2} miktarı artışı gözlenir. Hücre içi Ca^{+2} miktarı artışı da NOS (Nitric oxide synthases) ve ROT üretimini artırır, ROT ve NOS üretimi de uyarılabilir aminoasit ve P substansı üretimi artması ile aşırı duyarlılık ve ağrı oluşur (95,96). Sitozolde Ca^{+2} artışı, mitokondride depolarizasyona ve porların açılmasına sebep olur. Mitokondride oluşan bu patofizyolojik değişiklikler daha fazla ROT ve katyon kanalı açıcı maddelerin (örneğin ADP-riboz) sentezlenmesine neden olur. Bu maddeler ve ROT, voltaja duyarlı Ca^{+2} kapıları ve Transient Receptor Potential Melastatin (TRPM2) kanalları gibi bir kısım katyon kanallarını açarak sitozole kalsiyum akışı artar ve mitokondri daha fazla depolarize olur. Mitokondrinin depolarizasyonu katyon kanallarının daha da fazla açılmasına neden olmakta ve bu

geri bildirim mekanizması ile hücre fonksiyonlarını kaybetmeye başlamakta ve sonuç olarak da apoptoza sürüklenmektedir (97).

Bu sonuçlarımıza göre Nimodipin verilmesinin spinal travmalı hastaların tedavisinde olumlu etkilerinin sitozole $[Ca^{+2}]_i$ salınımında düzenleyici rolüyle ilgili olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda oksidatif stres değerleri üzerinde anlamlı değerler bulunamamıştır. Bu konunun aydınlatılması için spinal kord yaralanması etyopatogeneziye yönelik hücre kültüründe oksidatif stres, antioksidan sistem ve $[Ca^{+2}]_i$ salınımının birlikte araştırıldığı daha çok sayıda çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

ÖZET

Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Arka Kök Ganglion Hücrelerinde (AKG) Ca^{+2} Sinyali ve Oksidatif Stres Değerleri Üzerinde Nimodipin'in Etkisi

Amaç

Çalışmamızda, Ca^{+2} kanal blokleri olan olan Nimodipin'in spinal kord yaralanması sonrası AKG (Arka kök ganglion) hücrelerinde Ca^{+2} sinyali ve oksidatif stres üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Materyal ve Metod

Deneyimizde kilogramları 170-346 gram olan 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. 5 gruba ayrılarak olup kontrol grubu hariç tüm gruplara Eter anestezi altında laminektomi (Th8- Th 12) yapıldı. 1.grup: Kontrol grubu olarak kullanıldı. 2.grup: Sham kontrol grubu olarak kullanıldı. Laminektomi sonrası 3 gün sonra AKG (Arka kök ganglion) hücreleri alındı. 3.grup: Laminektomi sonrası travma oluşturularak 3 gün sonra AKG alındı. 4.grup: Laminektomi sonrası travma oluşturularak travmadan sonra başlamak üzere Nimodipin iv verilerek sonra AKG alındı. 5.grup: Laminektomi sonrası travma oluşturularak travmadan sonra başlamak üzere Nimodipin iv verildi ve gavajla Nimodipin verildi sonra AKG hücreleri alındı.

Bulgular

Ca sinyali açısından değerlendirdiğimizde kontrol grubu ile diğer gruplar arasında p değeri 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. Sham kontrol grubu ile diğer gruplar arasında p değeri 0.05'ten küçük olduğu için istatistiksel anlamlılık saptandı. 3.grup (Laminektomi ve spinal travma uygulanan ratlarla) 4.grup arasında p değeri 0.094 saptanması üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı. 3.grup ile 5.grup arasında p değeri 0.024 saptanması üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. 4.grup ile 5. grup arasında p=0.161 gelmesi üzerine istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Oksidatif stres değerlerinde de Lipid peroksidasyon, GSH, GSH-Px değerleri bakımından p değeri 0.05'den büyük olduğu için gruplar arası anlamlı farklılık gözlenilmedi.

Sonuç

Sonuç olarak çalışmamız, travmatik omurilik hasarı sonrası AKG hücrelerinde Nimodipin'in Ca^{+2} sinyalini azalttığı gözlemlendi. Ancak oksidatif stres değerleri üzerinde anlamlı değerler bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: Nimodipin, Kalsiyum, AKG (Arka kök ganglion), oksidatif stres

ABSTRACT

Effect of Nimodipine on Calcium Signal and Oxidative Stress Values in Dorsal Root Ganglion Cells (DRG) in Experimental Spinal Cord Injuries

Purpose

In our study, the effects of nimodipine which is a Ca^{+2} channel blocker over Ca^{+2} signal and oxidative stress in DRG (Dorsal root ganglion) cells after spinal cord injury are examined.

Material and Method

In our experiment, 48 Wistar Albino type male rats are used which are between 170 and 346 grams in weight. They are divided in 5 groups and laminectomy (Th8-Th12) under ether anesthesia is applied to all the groups except the control group. First group is used as the control group. Second group is used as the Sham control group. The DRG cells are taken 3 days after the laminectomy. Third group: Trauma is developed after laminectomy and DRG is taken after 3 days. Fourth group: Trauma is developed after laminectomy and as of the trauma, Nimodipine is started to be applied intravenously and DRG is taken. Fifth group: Trauma is developed after laminectomy and as of the trauma, Nimodipine is started to be applied intravenously and Nimodipine is given by gavage and then the DRG cells are taken.

Findings

When we evaluated in terms of the Ca signal, a statistical significance is determined between the control group and the other groups the p value is less than 0,05. Statistical significance is determined between the Sham control group and the other groups the p value is less than 0,05. No statistical significance is determined between the third group (rats to which laminectomy and spinal trauma are applied) and the fourth group the p value is found as 0,094. Statistical significance is determined between the third group and the fifth group because the p value is found as 0,024. No statistical significance is determined between the fourth group and the fifth group because the p value is found as 0,161.

About the oxidative stress values, no significant difference is observed between the groups because the p value is more than 0,05 in terms of the lipid peroxidation, GSH, GSH-Px values.

Conclusion

As a result, it is observed that Nimodipine has decreased Ca^{+2} signal in DRG cells after a traumatic spinal cord injury. However no significant values are found upon the oxidative stress values.

Key words: Nimodipine, Calcium, DRG (Dorsal root ganglion), oxidative stress

KAYNAKLAR

1. Li M, Ona VO, Chen M, et al: Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 99: 333-342, 2000
2. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319-370, 1996.
3. Demediuk P, Saunders RD, Clendenon NR, Means ED, Anderson DK, Horrocks LA. Changes in lipid metabolism in traumatized spinal cord. *Prog Brain Res* 63. 211-226, 1985.
4. Dr. E. Kaptanoğlu: TND Temel Nöroşirürji Cilt 2, s:1144-1145
5. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319-370, 1996.
6. Heffner JE, Repine JE: Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Rev Respir Dis*, 140: 531-554, 1989
7. İplikçioglu C: Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Omurilik Omurga Cerrahisi, Ed. Zileli M, Özer AF, 2.Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2002, s: 459-465.
8. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with special emphasis on vascular mechanisms, *J Neurosurg* 75. 15-26, 1991.
9. Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 37: 291-302, 1991.
10. Uzan M. Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatoloji. Hancı M, Aydingöz Ö, (ed). Medulla spinalis yaralanmaları. İstanbul: Logos tıp yayıncılığı, 152-161, 2000.
11. Tator CH, Duncan E.G, Edmonds VE. Neurological recovery, mortality and length of stay after acute spinal cord injury associated with changes in management. *Paraplegia* 33. 254-262, 1995
12. Taoka Y, Okojima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56. 341-358, 1998.
13. Nemecek S. Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Adv Neurol* 20: 395-405, 1978.
14. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J: Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. *Clin. Neuropharmacology* 2001; 24(5):254 -264
15. Banik NL, Hogan EL. Molecular and anatomical correlates of spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2. 99-107, 1985
16. Braugher RW, Duncan LA. Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2: 269-283, 1985.
17. Kaptanoğlu E, Caner HH, Surucu SH, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J. Neurosurg (spine)* 91: 200-204, 1999.
18. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989;5(1):79-84.
19. Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol* 2008;46(5):273-309.

20. Liochev SI, Fridovich I. The Haber-Weiss cycle 70 years later: an alternative view. *Redox Rep* 2002;7(1):55-7.
21. Kehrer JP. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000;149(1):43-50.
22. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(2):145-58.
23. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119(6):598-620.
24. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
25. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, Xu J, Zacker WE et al. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev* 1999;31(1):117-39.
26. Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
27. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med* 1988;5(5-6):341-8.
28. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):1-14.
29. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-94.
30. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1): 1-40
31. Leutner S, Eckert A, Müller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
32. Peskin AV. Interaction of reactive oxygen species with DNA. A review. *Biochemistry (Mosc)* 1997;62(12): 1341-7.
33. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003;91:179-94
34. Krinsky NI. Mechanism of action of biological antioxidants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1992;200(2):248-54.
35. Klouche K, Morena M, Canaud B, Descomps B, Beraud JJ, Cristol JP. Mechanism of in vitro heme-induced LDL oxidation: effects of antioxidants. *Eur J Clin Invest* 2004;34(9):619-25.
36. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000;899:136-47.
37. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility *Contraception* 2002;65(4):305-11.
38. Guittet O, Roy B, Lepoivre M. Nitric oxide: a radical molecule in quest of free radicals in proteins. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(8-9):1054-67

39. Dworakowski R, Anilkumar N, Zhang M, Shah AM. Redox signalling involving NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 2006;34 (Pt5):960-4
40. Mason RP, Stolze K, Flitter WD. Free radical reactions with DNA and its nucleotides. *Basic Life Sci* 1990;52:119-25.
41. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004;266(1-2):37-56.
42. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985 25;260(6):3440-50.
43. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*.1987;56:395-433.Review
44. Catterall WA, Perez-Reyes E. International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev*. 2005;57(4): 411-25.
45. McKay BE, Placzek AN. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol*. 2007;74(8):1120-33.
46. İsmailoğlu Ö, Albayrak B The Therapeutic Effects of Nimodipine in Traumatic Subarachnoid Hemorrhage *J Nervous Sys Surgery* 2009; 2(4):200-204
47. Greene K. Pharmacological management of spinal cord injury: Current status of drugs designed to augment functional recovery of the injured human spinal cord. *J Spinal Dis* 1995; 5:355-366.
48. Kaptanoğlu E, Tator CH. Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejileri. In: Zileli M, Özer F (eds): Omurilik ve omurga cerrahisi, 2. baskı. İzmir: META Basım ve Matbaacılık Hizmetleri; 2002: 813-832.
49. 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.
50. Tatlı M, Güzel A, Ökten A, Çaylı S. Medical Management of Spinal Cord Injuries C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi 27 (4):165 – 172, 2005
51. Osaama H, Khan, Lisa C. McPhee, Lisa N. Moddemann and Marc R. Del Bigio Calcium Antagonism in Neonatal Rats With Kaolin-Induced Hydrocephalus *J Child Neurol* 2007 22: 1161
52. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968;25(1):192-205.
53. Bejarano I, Terrón MP, Paredes SD, Barriga C, Rodríguez AB, Pariente JA. Hydrogen peroxide increases the phagocytic function of human neutrophils by calcium mobilisation, *Mol Cell Biochem*. 2007 Feb;296(1-2):77-84
54. Uğuz AC, Naziroğlu M, Espino J, Bejarano I, González D, Rodríguez AB, et al. Selenium modulates oxidative stress-induced cell apoptosis in human myeloid HL-60 cells through regulation of calcium release and caspase-3 and -9 activities. *J Membr Biol*. 2009 Dec;232(1-3):15-23. Epub 2009 Nov 7.
55. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260:3440-3450.
56. Naziroğlu M. Role of Selenium on Calcium Signaling and Oxidative Stress-induced Molecular Pathways in Epilepsy. *Neurochem Res* 2009

57. Liqun Yang, Nigel R. Jones, et al, Severity-dependent expression of pro- inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat. *Journal of Clinical Neuroscience* (2005) 12 (3), 276-284.
58. Barami K, Diaz F: Cellular transplantation and spinal cord injury. *Neurosurgery*, 47:691-700, 2000
59. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacology*, 24 (5): 265-279, 2001. 7
60. Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures. *Acta Neuropathol.* 2010 Feb;119(2):249-59.
61. 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.
62. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP. GM-1 ganglioside in human spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9:517- 530.
63. Greene K. Pharmacological management of spinal cord injury: Current status of drugs designed to augment functional recovery of the injured human spinal cord. *J Spinal Dis* 1995; 5:355-366.
64. Kaptanoğlu E, Tator CH. Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejileri. In: Zileli M, Özer F (eds): Omurilik ve omurga cerrahisi, 2. baskı. İzmir: META Basım ve Matbaacılık Hizmetleri; 2002: 813-832.
65. Anderson DK, Braughler JM, Hall ED, et al. Effects of treatment with U=74006F (trilazad mesylate) on neurological outcome following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1988; 69: 562-567
66. Hall ED, Braughler JM, McCall JM. Antioxidant effect in brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9:165- 172.
67. Faden AI, Jacobs TP. Effect of TRH analogs on neurologic recovery after experimental spinal trauma *Neurology* 1985; 35:1331-1335
68. Puniak MA, Freeman GM, Agresta CA, et al. Comparison of a serotonin antagonist, opioid antagonist, and TRH analog for the acute treatment of experimental spinal trauma. *J Neurotrauma* 1991; 8:193-203.
69. Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci* 1997; 17:1055-1063
70. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999; 44:1027-1040.
71. Young W. Spinal cord injury pathophysiology and therapy. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT (eds). *Neurotrauma*. New York: McGraw-Hill; 1996:1079-1082.
72. Hayes KC, Potter PJ, Wolfe DL, et al. 4-Aminopyridinesensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1994; 11: 433-446.
73. Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, et al. Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 1994; 367:170-173.
74. Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research- a refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord* 2000; 38 :449-472.

75. Huang Lixin, Mehta MP, Nanda A, et al. The role of multipl hyperbaric oxygenation in expanding therapeutic windows after acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine 2)* 2003; 99:198-205.
76. Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, et al. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport*. 2004; 15(15):2369-2373.
77. Yu CG, Jimenez O, Marcillo AE, et al. Benefical effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion-induced spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine 1)* 2000; 93:8
78. Sahin B, Albayrak BS, İsmailoğlu Ö, Görgülü A, The effects of medroxy progesterone acetate on the pro-inflammatory cytokines, TNF-alpha and IL-1beta in the early phase of the spinal cord injury *Neurol Res*. 2011 Jan;33(1):63-7
79. İsmailoglu O, Oral B, Görgülü A, Sütçü R, Demir N Neuroprotective effects of tamoxifen on experimental spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci* 2010 Oct;17(10):1306-10. Epub 2010 Jul 13
80. Ouardouz M, Zamponi GW, Barr W, Kiedrowski L, Stys PK. Neuropharmacology. Protection of ischemic rat spinal cord white matter: Dual action of KB-R7943 on Na⁺/Ca²⁺ exchange and L-type Ca²⁺ channels. 2005 Mar;48(4):566-75.
81. Winkler T, Sharma HS, Stålberg E, Badgaiyan RD, Gordh T, Westman J. An L-type calcium channel blocker, nimodipine influences trauma induced spinal cord conduction and axonal injury in the rat *Acta Neurochir Suppl*. 2003;86:425-32.
82. Deng SL, Yuan T, Liao WH. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. Effect of fetal spinal cord graft with nerve growth factor and nimodipine in secondary injury of spinal cord of adult rat 2001 Mar;15(2):74-6.
83. Imamura H, Tator CH. Spinal Cord. Effect of intrathecal nimodipine on spinal cord blood flow and evoked potentials in the normal or injured cord 1998 Jul;36(7):497-506
84. Ross IB, Tator CH Spinal cord blood flow and evoked potential responses after treatment with nimodipine or methylprednisolone in spinal cord-injured rats. *Neurosurgery*. 1993 Sep;33(3):470-6; discussion 476-7.
85. Ross IB, Tator CH Further studies of nimodipine in experimental spinal cord injury in the rat. 1991 Winter;8(4):229-38.
86. Holtz A, Nyström B, Gerdin B Spinal cord injury in rats: inability of nimodipine or anti-neutrophil serum to improve spinal cord blood flow or neurologic status *Acta Neurol Scand*. 1989 Jun;79(6):460-7.
87. Fernyhough P, Calcutt NA. Abnormal calcium homeostasis in peripheral neuropathies. *Cell Calcium*. 2010 Feb;47(2):130-9. Epub 2009 Dec 24.
88. Flatters SJ, Bennett GJ. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain*. 2004 May;109(1-2):150-61.
89. AJ. Thomas, RP. Nockels, HQ. Pan, CI. Shaffrey, M. Chopp, Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats, *Spine* 24 (1999) 2134-2138
90. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA, Korshunova GA, Sumbatyan NV, Varfolomeev SD. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett*. 1993;329:21-24.
91. Stephen M. Stahl, Bilgen Taneli. *Temel Psikofarmakoloji Nörobilimsel Temeli ve Pratik Uygulamaları*, Astra Zeneca, Yelkovan yayıncılık, 2003;375

92. Dumont RJ, Verna S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury, Part II: Conterary Pharmacoterapy. *Clin. Neuropharmacology* 2001; 24(5): 265-279
93. Hajnóczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, Yi M (2006) Mitochondrial calcium signaling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40: 553-560.
94. Naziroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res.* 2007 Nov;32(11):1990-2001.
95. Hajnóczky G, Csordas G, Das S, Garcia-Perez C, Saotome M, Roy SS, Yi M(2006) Mitochondrial calcium signaling and cell death: Approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 40:553-560.
96. Jardín I, López JJ, Pariente JA, Salido GM, Rosado JA. Intracellular calcium release from human platelets: different for multiple stores. *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Feb;18(2):57-61. Review.
97. Hajnóczky G, Davies E, Madesh M. Calcium signaling and apoptosis (2003) *Biochem Bioph Res Co* 304: 445-454.