

**T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**AKUT OMURİLİK HASARI SONRASI KAFEİK ASİT FENETİL
ESTERİN İNFLAMATUVAR SİTOKİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İsmail GÜLŞEN

**NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Tamer KARAASLAN**

2011- ISPARTA

T.C
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**AKUT OMURİLİK HASARI SONRASI KAFEİK ASİT FENETİL
ESTERİN İNFLAMATUVAR SİTOKİNLER ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. İsmail GÜLŞEN

**NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Tamer KARAASLAN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
2089-TU Proje numarası ile desteklenmiştir.**

2011- ISPARTA

ÖNSÖZ

Omurilik hasarı hakkında pek çok deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda çok farklı farmakositik ajan kullanılmakla beraber metinprednizolonun dışında hasta üzerinde uygulanan farmakositik ajan yoktur. Bizde kimyasal ajan olan kafeik asit fenetil esteri kullandık. Omurilik hasarı sonrası kafeik asit fenetil esterinin omurilik dokusu üzerine histolojik ve biyokimyasal analizler ile etkilerini araştırdık.

Eğitimim boyunca çok büyük emekleri olan bölüm başkanım Prof. Dr. Aşkın Görgülü'ye , sevgili hocam Doç Dr. Serdar Baki Albayrak'a , çok değer verdiğim ve üzerimde çok emeği olan Yrd. Doç.Dr. Tamer Karaaslan'a ve kıymetli hocalarım Yrd.Doç.Dr.Özgür İsmailoğlu, Yrd.Doç.Dr.Nilgün Şenol'a canı gönülden sevgilerimi sunar ve teşekkürü bir borç bilirim. Assitanlığım boyunca bir aile gibi olup beraber çalıştığımız Dr.Muhammed Borcak, Dr.Vehbi Yürüker, Dr.Ü.Sina Özdemir, Dr.İlker Alaca ya teşekkür ederim. Biyokimyasal çalışmaları yapan Biyokimya A.D.'dan Doç. Dr. Recep Sütçü ve Dr. Havva Koçak'a, dokuların histopatolojik olarak hazırlayıp değerlendiren Histoloji ve Embriyoloji ABD dan Prof. Dr. Alparslan Gökçimen, Uzm. Dr. Aydın Candan'a, biyokimyasal sonuçları istatistiksel analizi ile değerlendiren Uzm. Dr. Ahmet Koçak'a sonsuz teşekkür ederim.

Bir an olsun bile desteklerini esirgemeyen ve bana büyük sabır gösteren eşim Tuba Gülşen'e , sevgili oğlum Yusuf Gülşen' atfediyorum.

Dr. İsmail GÜLŞEN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. Omurilik Yaralanmasının Mekanizmaları	4
2.2.1. Birincil Hasar Mekanizmaları	4
2.2.2. İkincil Hasar Mekanizmaları.....	5
2.2.2.1. Sistemik Etkiler	7
2.2.2.2. Lokal Mikrovasküler Yaralanma	7
2.2.2.3. Elektrolit Bozuklukları.....	8
2.2.2.4. Biyokimyasal Değişiklikler	9
2.2.2.4.1. Araşidonik Asit ve Metabolizması	11
2.2.2.4.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu	11
2.2.2.4.3. Lipid Peroksidasyon.....	12
2.2.2.5. Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı.....	13
2.2.2.6. Apoptoz	13
2.2.2.7. İnflamasyon.....	13
2.3. Sitokinler.....	15
2.3.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 beta)	16
2.3.2. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF-alfa).....	17
2.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)	20
2.4.1. CAPE nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri	21
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. Deney Hayvanları ve Deney Planı	22
3.2. Doku Homojenizatının Hazırlanması	25
3.3. TNF alfa ve IL-1 Beta Tayini	25
3.4. Histopatolojik Analiz	26
3.5. İstatistiksel Analiz.....	27

4. BULGULAR.....	28
4.1. İstatiksel Bulgular.....	28
4.2. Histopatolojik Bulgular	32
5. TARTIŞMA-SONUÇ.....	35
ÖZET.....	38
SUMMARY	39
KAYNAKLAR	40

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Deneysel omurilik travma modelleri.....	4
Tablo 2. İkincil yaralanma mekanizmaları.....	6
Tablo 3. Araştırma gruplarının biyokimyasal değerleri	29
Tablo 4. Araştırma gruplarının tanımlayıcı istatistik değerleri	30
Tablo 5. Birinci saatte, gruplar arası karşılaştırmalı p değerleri.	31
Tablo 6. Altıncı saatte, gruplar arası karşılaştırmalı p değerleri.	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.....	19
Şekil 2. CAPE'in kimyasal formülü	21

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Omurilik 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 faciadır. Omurilik 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. Bu bireyler omurilik yaralanması öncesi aktif, bir başkasına bağımlı değil iken, aniden başlarına gelen bu değişiklik sonucu yaşam mücadelesi vermelerinin yanı sıra, psikolojik sorunlarıyla da savaşmak zorunda kalmaktadırlar. Bunun yanında hastaların yakınlarından da rehabilitasyon aşamasında büyük fedakarlıklar yapmaları beklenmektedir.

Birçok ülkede omurilik 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).Türkiye’de 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. Omurilik yaralanmalı hastaların yaklaşık %50’sinde tam omurilik hasarı, %40’ında ise morbidite görülebilmektedir. Tam hasarın %54’ü tetrapleji, %46’sı parapleji şeklindedir (2).

Akut omurilik hasarının tedavisine yönelik araştırma çabaları, çağdaş yaklaşıma değerli katkılarda bulunmaktadır ancak kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve bir tedavi protokolü geliştirilebilmiş değildir.

Akut omurilik hasarına maruz kalan hastalar lezyonun seviyesine baēlı olarak çeşitli derecelerde motor ve duysal bozukluēa sahiptirler. Tam yaralanma; zedelenen spinal kord seviyesinin altında tam motor ve duysal fonksiyon kaybı ile karakterize iken, kısmi yaralanmada lezyon altında motor veya duysal fonksiyonların kaybı daha az oluşur. Akut omurilik hasarı yaklaşık yarısında lezyon seviyesi altında hiçbir motor ve duysal fonksiyonun bulunmadığı tam yaralanmadır(3).

Akut omurilik hasarlanmasına baēlı 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 kendikendine yıkıcı mekanizmaların fizyopatolojisinde ödem oluşumu, damarsal deēişiklikler, 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 deēişimler 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 düzelmeye olmamasına rağmen, yapılan çeşitli hayvan deneylerinden olumlu sonuçlar alınmaya başlanmış olması çalışmaların artarak devam etmesi yönünde cesaretlendirici olmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Omurilik yaralanması ile ilgili ilk yazılara M.Ö 3000-2500 yılları arasında Mısırlı cerrahlarca yazılan Edwin Smith Papirüs’de rastlanmaktadır(5). Hipokratta yaklaşık M.Ö 400 yıllarında paraplejiyi tarif etmiş ve sonraki yıllarda Aulus Cornelius Celcius tarafından bildirilen bir traksiyon cihazı geliştirilmiştir. Fransız cerrah Pare 16.yüzyılda omurga dislokasyonları redükte etmek için odundan bir düzenek kurmuştur. Omurilik yaralanması ile ilgili ilk fizyopatolojik çalışma 1890’da Schamus tarafından tavşan omuriliğinde travma sonucu gelişen patolojik değişiklikleri inceleyerek yapılmıştır(6). Galen ve Hipokrat’ın omurilik hasarı üzerine çalışmaları mevcuttur. Hipokratik merdiven ve düzlem olarak tanımlanan dislokasyon düzeltmelerinde kullanılan iki alet tasarlamıştır. Bu ilkel metodlar günümüzün spinal cerrahisinde kullanılan karmaşık tekniklerin öncüleridir (7).

İkincil yaralanma şekli ilk defa 1911’de Allen tarafından ortaya atılmıştır. Tator ve Fehlings’in yaptıkları çalışmalar ile ikincil yaralanma sonucu oluşan damarsal, elektrolit dengesi, biyokimyasal ve enerji metabolizmasına ait değişiklikler ortaya konarak, ikincil yaralanmanın önemine dair önemli bilgiler elde edilmiştir (8).

Tator ve Rivlin tarafından 1978 yılında geliştirilen klip kompresyon modelinde omurilik çeşitli zaman aralıklarında anevrizma klipleri ve klibe edilmekte ve bu sayede değişik miktarlarda hasar oluşturulabilmektedir. Ekstradural balon kompresyon modeli, Tarlov tarafından tanımlanarak geliştirilmiştir (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	Omuriliğe anevrizma klibi
Watson	1986	Omuriliğe lazer ile insizyon
Benzel	1990	Omurgayı klemp ile sıkıştırma
Stokes	1990	Elektromekanik kontüzyon

2.2. Omurilik Yaralanmasının Mekanizmaları

Omurilik yaralanmasında doku harabiyeti iki mekanizma ile meydana gelmektedir.

1. Birincil Hasar Mekanizmaları
2. İkincil Hasar Mekanizmaları

2.2.1. Birincil Hasar Mekanizmaları

Omuriliğe darbe olduğu ilk anda nöron ve aksonlarda oluşan mekanik hasar; birincil hasar olarak adlandırılmaktadır. Birincil hasar omuriliğin kendisine veya çevresindeki vertebral kolona ait çeşitli travma oluşma şekillerini takiben gelişir.

Omurilik içindeki kanama, mekanik hasar sonrası erken dönemde ortaya çıkarken, kan akımının kesintiye uğraması daha geç meydana gelir. Kan akımının kesilmesi hipoksi ve iskemi ile birlikte lokal enfarkt oluşmasını sağlar. Bu özellikle

yüksek metabolik gereksinimi olan gri cevherin hasarlanmasına yol açar. Hasarlanan alandan geçen nöronlar fiziksel olarak kesintiye uğrar ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Gelişen ödem ve makrofajlar da sinir iletilisinin bozulmasına katkıda bulunur. Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşümsüz hasarının ilk saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat içerisinde geri dönüşsüz hasarlandığı düşünülmektedir (9).

2.2.2. İkincil Hasar Mekanizmaları

Akut yaralamadan sonra omurilikte kanama, ödem, aksonal ve nöronal nekroz kist formasyonu ve enfarktın takip ettiği demiyelinizasyon gibi patolojik değişiklikler oluşur. Spinal şok, damarsal değişiklikler, hücre içi Ca^{+2} artışı, serbest radikal teorisi, endojen opioidler, enflamasyon ve apoptoz teorileri üzerinde en fazla durulanlan ikincil hasar mekanizmalarıdır (10).

İkincil yaralanma şekli ilk defa 1911’de Allen tarafından ortaya atılmıştır. Allen köpeklerde myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin çıkarılmasının nörolojik fonksiyonlarda düzelmeye sağladığını deneysel olarak göstermiştir. Allen spinal korda kord hasarlandıktan sonra var olan hemorajik nekrotik materyalde zararlı bir ajanın varlığından teorisinde bahsetmiş ve bunu biyokimyasal faktör olarak adlandırmıştır. Bu posttravmatik oto destrüksiyonun ilk deneysel kanıtıdır. Allen ilk olarak köpeklerde patolojik değişikliklerin evrimini açıklamıştır (10).

Akut omurilik hasarı sonrası ilk 15 dakika süresince gri maddede peteşiyal kanamalar, beyaz maddede ödem oluşur. İlk 2 saatte gri maddedeki kanamalar artar. 4 saatte çok sayıda şişmiş silindir eksenleri bulunur. Zamanla patolojik değişikliklerin kötüleştiği, öyle ki yaralanmadan 6 gün sonra ileri derecede nekroz oluştuğu gösterilmiştir. Bu gelişmeyi Nemecek “otodestruksiyon” olarak adlandırmıştır (10). Dohrmann ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada elektron mikroskobu ile yaralanmadan sonra 5 dakika içinde gri maddenin musküler venüllerinin eritrositlerle şiştiğini fakat aksonların değişmemiş görüldüğünü göstermişlerdir. Travma sonrası 15 ve 30 dakika arası eritrositlerin postkapiller perivasküler boşluğa ve musküler venlere ekstrasvazasyonu ile birlikte küçük

kanamalar olduğu ve aksonal değişikliklerin görünür hale geldiği gösterilmiştir. Dört saat sonra bozulmuş myelin kılıflar, aksonal dejenerasyon ve iskemik endotelial hasar saptanmıştır. Yaralanmadan sonra ilk birkaç gün içinde progresif aksonal değişiklikler ve nekrotik bölgelerin geliştii, yaralanma bölgesinde ödem gelişimi ve komşu segmentlere yayıldığı gösterilmiştir. Majör travmadan 24-48 saat sonra özellikle daha önce kanla kaplı olan santral bölge olmak üzere yaralanma alanı nekrotiktir. Birkaç gün sonra hemorajik bölge kavitasyon gösterir. Komşu alanlarda sıklıkla keskin sınırları olan yamasal nekrozlar (patchy nekrozis) görülür. Bu progresif değişiklikler, kavitasyon oluşumu, enfarktların patolojik özellikleridir ve posttravmatik enfarkt denilmektedir (10).

Tablo 2. İkincil yaralanma mekanizmaları (20)

Sistemik etkiler (Nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi

Kalp basıncı kısa süreli hipertansiyon, daha sonra uzun süreli hipotansiyon

Periferik dirençte azalma

Kalp debisinde azalma

Omurilik mikrodolaşımında lokal vasküler hasar

Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma

Hemoraji: özellikle gri cevherde

Mikrodolaşımında kayıp: mekanik, tromboz, vazospazm

Biyokimyasal değişiklikler

Serbest radikal üretimi Lipid peroksidasyon Eksitotoksisite: glutamat
Nörotransmitter birikimi Endojen opioidler

Katekolaminler: noradrenalin, dopamin

Araşidonik asit salınımı

Eikozanoid üretimi

Prostaglandinler

Sitokinler

Elektrolit kaymaları

Intraselüler kalsiyumda artış Ekstraselüler potasyumda artış

Sodyum geçirgenliğinin yükselmesi

Enflamatuar cevap

Serbest radikal üretimi Akson yıkımı

Myelin artıklarının uzaklaştırılması

Sitokinlerin salınımı

Gliyal hücre aktivasyonu Oligodentrositlerde sitotoksik etkiler Wallerian dejenerasyon

Ödem

Apoptozis

Enerji metabolizmasında kayıp

Azalmış ATP üretimi

2.2.1.1. Sistemik Etkiler

Omurilik hasarının şiddeti ve seviyesi, omurilik kanlanmasını etkileyen lokal hasarın yanında, oluşan nörojenik şokun ağırlığıyla da yakın ilişkilidir. Nörojenik şok; sempatik tonus azalması, vagusun anormal kardiyak etkisi ile ortaya çıkar. Servikal düzeydeki omurilik hasarı ciddi hipotansiyon ve bradikardi yapabilir. Periferik rezistans ve kardiyak output azalırken tüm hemodinamik dengeler bozulur (11).

2.2.2.2. Lokal Mikrovasküler Yaralanma

İnsan omurilik yaralanmalarında ve deneysel modellerde, omurilik hasarının en önemli sebeplerinden birisi posttravmatik iskemidir. Posttravmatik omurilik iskemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir. Oluşan patolojilerin hepsi, azalmış doku perfüzyonu ve enerji azalmasından kaynaklanmaktadır. Omurilik

yaralanmalarında en sık görülen bulgu özellikle gri cevher ve omuriliğin santralindeki hemorajidir (12). Mekanik darbenin ilk etkisi ile kapiller, venüller ve bazı arteriollerde yırtılmalar olur. Deneysel çalışmalarda anterior spinal arter ve anterior sulkal arterin akımının mekanik travma sonrasında da devam ettiği görülmüştür. Ancak omuriliğin santral kısmının kanlanması büyük kısmını sağlayan anterior sulkal arterlerde vazospazm oluştuğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (12). Yine angiografik çalışmalarda, büyük arteriol ve arterlerin de etkilenmediği gösterilmiştir. Mikrosirkülasyon bozukluğu sadece yaralanma bölgesinde kalmamakta, rostral ve kaudal olarak da ilerlemektedir. Mikrosirkülasyonun bozulmasına, direkt mekanik etkiye bağlı vazospazmın yanında glutamat, prostaglandinler, katekolaminler gibi travmaya ikincil salgılanan biyokimyasal ajanlarla oluşan vazospazm da sebep olmaktadır (13). Yine kan ve kan ürünlerinin de direkt etki ile vazospazmı artırdığı bilinmektedir. Bu olay, kan yıkım ürünleri ile karşılaşan damar duvarındaki değişiklikler ile hemoglobinin yıkılarak methemoglobin oluşma sürecinde ortaya çıkan süperoksit radikallerine bağlanmıştır. İntravasküler tromboz ile vazospazm ve sonucunda oluşan iskemiden tromboksan-A2 sorumlu bulunmuştur. Araştırmacılar, omurilik hasarı sonrası omurilik kan akımı otoregülasyon mekanizmalarının bozulduğunu bildirmişlerdir. Normalde omurilik kan akımı, sistemik kan basıncı değişikliklerinden etkilenmez. Otoregülasyonun bozulması omurilik iskemisini artırır. Omurilik hasarı sonrası, otoregülasyon bozukluğu sebebi ile hiperemiler ve sekonder hemorajiler oluşabilir. Oluşan bu reperfüzyon, serbest radikal ve diğer toksik maddelerin oluşumunu artırarak, doku hasarını arttırabilmektedir (14).

2.2.2.3. Elektrolit Bozuklukları

Omurilik hasarının ardından hücre içi ve dışı kompartmanlar arasında ciddi elektrolit değişiklikleri olmaktadır. Kalsiyumun hücre içi artışı özellikle iskemi ve travmada daha fazla olmak üzere, tüm nöral yaralanmalarda başrol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum girişi merkezi sinir sisteminde “toksik hücre ölümünün son ortak yolu” olarak isimlendirilmektedir. Kalsiyum iyon konsantrasyonu ekstrasellüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Omurilik hasarında, bu büyük

gradient farkı ile hücre içine kalsiyum iyon girişi olur. Kalsiyumun travma sonrası hücre içine girişi 3 yolla olmaktadır:

- 1) Hasar görmüş olan hücre membranından,
- 2) Voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından,
- 3) Glutamat ile aktive olan kalsiyum kanallarından.

Kalsiyumun hücre içine girmesi nörotoksisiteyi tetikler. Kalsiyum iyonları hücre içinde fosfolipazları, proteazları ve fosfatazları aktiveleştirerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur (15).

Hücre içine giren kalsiyum, proteinkinaz C enzimini aktive ederek nöroflaman ve mikrotübül parçalanmasına yol açar. Fosfolipaz C enzimini aktive ederek hücre membranını oluşturan yağ asitlerini yıkar. Ayrıca yaralı mikrosirkülasyonda düz kas kasılmasına sebep olarak vazospazma ve dolayısıyla iskemiye neden olmaktadır. Benzer biçimde, araşidonik asit metabolizmasını başlatmakta ve siklooksijenaz yolunun diğer ürünleri olan serbest radikal üretimine katkıda bulunmaktadır. Serbest radikallerin etkisiyle de araşidonik asit metabolizması, hücre yıkımını ve iskemiye arttıran prostanoid üretiminin artışıyla sonuçlanmaktadır (16).

Beyaz cevher yaralanması sonucu oluşan anoksi, ATP ve membran depolarizasyonunun kaybına sebep olarak Na^+ kanallarından hücre içine Na^+ akışını sağlar. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonundaki bu artış, membran depolarizasyonu ile birlikte olunca, Na^+ - Ca^{+2} değiştiricinin ters çalışmasına sebep olur. Bu da hücre içine zararlı miktarda Ca^{+2} girişini sağlar (17).

2.2.2.4. Biyokimyasal Değişiklikler

Omurilik hasarlanması ile oluşan iskemi, eksitator aminoasitlerden (EAA) olan glutamat ve aspartatın artarak “eksitotoksisite” mekanizmasının aktive olmasına neden olur. Her iki aminoasit de omurilik ve beyinde düzensiz dağılım gösterirler. Glutamat omurilik özellikle arka köklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur.

Glutamatın duyuşal iletimin sağlanmasında, ayrıca motor aktivite ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol aldığı düşünölmektedir. Aspartatın da omurilikde eksitator ara nöronlarda iletici olması, motor ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol alması olasıdır (18).

İşkemi, adenoşin 5- fosfat azalmasına neden olarak, hücre homeostazını sağlayan Na-K ATPaz pompası benzeri enerji bağımlı mekanizmaların çalışmalarını engeller. Ekstraselöler ve intraselöler alanlardaki iyonik kompozisyon değişiklikleri, membran polarizasyonunu değiştirerek, sinaptik keselerden EAA'ların salınmasına neden olur. EAA salınımı, nöron ve glial hücrelerin enerji bağımlı olan geri-alım mekanizmasının da çalışmaması nedeniyle dengelenemez (18).

Yapılan alışmalar EAA'in neden olduğu geç doku hasarında glutamat reseptörlerinin önemini vurgulamışlardır (19). Son yıllarda glutamat reseptörleri "iyonotropik" ve "metabotropik" olarak iki ana grupta toplanmaktadır(20).

İyonotropik reseptörler farmakolojik özelliklerine göre, N-metil-d-aspartat (NMDA), □-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazola-propionik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri olarak gruplara ayrılırlar. Metabotropik reseptörler ise guanoşin-5-trifosfat-bağlayıcı proteinlerini ya da siklik nukleotid benzeri intraselöler sekonder mesajcılar bağlantısıyla transmembran proteinlerini etkileyen reseptörler olarak ayrılmaktadırlar. Kafa travmasında en güçlü eksitotoksik etki NMDA reseptörleri vasıtasıyla olurken, travmatik omurilik hasarlanmasında AMPA ve non- NMDA reseptörleri üzerinden olmaktadır (37). AMPA reseptörlerinin aktive olması ağırlıklı olarak sodyumun ve eşlik eden kalsiyumun hücre içine girişine neden olur. AMPA reseptörlerinin aktivasyonu elektrofizyolojik olarak, NMDA reseptörlerinde aktivasyonunu sağlar. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi kalsiyum birikimi ile sonuçlanır. Glutamat eş zamanlı olarak metabotropik reseptörleri de etkileyerek, inozitol fosfolipidlerin metabolize olmasına sebep olur. Ayrıca hücre içi kalsiyum depolarının serbest kalmasına ve hücre duvarı, mitokondri ya da endoplazmik retikulum da bulunan kalsiyum pompalarının inaktivasyonuna da sebep olarak daha sonra glutamat düzeyleri normale dönse bile, hücre içi kalsiyum miktarı irreversibl olarak yükselir. Böylece hücre içi kalsiyum artışı, kalsiyum bağımlı-

proteaz ve lipazların aktive olması ve hücre iskeletinin yıkımına ve hücre membranının bozulmasına neden olur (16,21).

2.2.2.4.1. Araşidonik Asit ve Metabolizması

Travmanın direkt etkisi ile ya da kalsiyumun anormal hareketi, membran fosfolipidlerinden, fosfolipaz aktivitesi ile arşidonik asit salınımını artırmakta; o da siklooksijenaz tarafından hızla metabolize edilerek, prostanoidler ve prostasiklin haline dönüştürülmektedir.

Prostaglandin A₂ güçlü bir vazokonstriktör maddedir. Tromboksan benzeri prostanoidler, trombositlerin endotele yapışmasını artırırken, intravasküler trombosit agregasyonuna, mikrovasküler tromboembolilere ve vazokonstriksiyona neden olur. Prostasiklin ise tam tersi etki göstermektedir. Ancak yapımı siklooksijenaz yolunun ürünlerinden olan serbest radikaller tarafından selektif olarak engellenmektedir. Bu yüzden ortamda vazospazm ve iskemi daha da ilerleyebilmektedir.

2.2.2.4.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Serbest radikal, dış yörüngesinde tek sayıda, yani serbest elektron bulunan atom ya da molekül anlamına gelmektedir. Bu tek elektron, çiftlenme eğiliminde olduğu için ileri derecede reaktiftir ve canlı hücrede bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. İnsan vücudunda pekçok serbest radikalın varlığı gösterilmekle birlikte, en yaygın olanı oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Günümüzde, serbest oksijen radikalleri (SOR) yerine daha kapsamlı olarak, reaktif oksijen türevleri tanımı kullanılmaktadır. (22)

Serbest radikaller protein yapılarla, nükleik asitler ve DNA'yla, hücrenin enerji kaynağı olan karbonhidratlarla reaksiyona girerek, orijinal yapıyı bozarlar. Poliansatüre membran lipidlerinin serbest radikallerle peroksidasyonu iskemik nöronal hasarın gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Sonuç, fonksiyonu kaybolmuş ve antijenitesi değişmiş hücre membranı ve hücre yapısındaki yıkımdır.

2.2.2.4.3. Lipid Peroksidasyon

Plazma membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler, gliserid ve steroller, okside olabilen aminoasit içeren transmembran proteinleri, glukoz, mannitol ve deoksi-şekerler serbest radikal hasarına çok duyarlıdır. Reaksiyonlar içinde en önemlisi hidroksil radikalının membran lipidleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatmasıdır. Lipid peroksidasyon, poliansatüre lipidlerin oksidatif yıkımıdır (23). Bu yıkım, genişleyen bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Plazma membranı ve hücre içi organellerde lipid peroksidasyon hemen tüm serbest radikal kaynakları tarafından stimüle edilebilir ve ortamdaki demir ve bakır gibi transizyonel metallerin varlığında potansiyalize edilebilir. Bu reaksiyon tüm yeni oluşmuş kimyasal serbest radikaller tükeninceye kadar devam eder. Hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin kaybı, lipid peroksit oluşumu, lipid preparasyonlar tarafından oksijen tüketimi peroksidasyonu gösterir. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra oluşan kısa zincirli yağ asitleri, membran permeabilitesini ve viskozitesini önemli ölçüde etkiler (23).

Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin nöronal hücre, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur (24).

Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler (Fe^{2+} , Cu^{+}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur (24). Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır.

2.2.2.5. Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı

İskemik dokuda, serbest radikaller de dahil olmak üzere göç eden nötrofiller, bazı mekanizmalarla reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar.

Salgıladıkları proteazlar (elastaz, jeletenaz vb) ile endotel parçalanmasına neden olurlar. Ve yine salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da (arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır. Bir araşidonik asid metaboliti olan lökotrien B4 (LTB4) salgılayarak, süperoksid anyon radikali üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece bir geri beslenme mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır (25).

2.2.2.6. Apoptoz

Apoptotik hücre ölümü indüklenebilir hücreler tarafından spesifik indükleyici bir uyararla aktif olarak düzenlenen fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümüdür. Omurilik Hasarını takiben apoptotik hücre ölümü bilgisi nöronal hücre ölümünü sınırlamak ve nörolojik fonksiyonu iyileştirmek için yeni ek stratejiler sağlayabilir. Bir çok antiapoptotik ajan gösterilmiştir ki bunlar omurilik yaralanma bölgesinde nöral doku ölümünü sınırlar. Bcl 2 onkogeninin akut omurilik hasarlanması sonrasında histolojik sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir. (26).

Apoptotik hücre ölümü omurilik hasarlanmasını takiben üç haftaya kadar saptanmaktadır. Apoptoz kesin olarak regüle bir işlem olduğundan bu bulgular apoptotik yolları manüple ederek omurilik yaralanmasında tedavi fırsatı sağlamaktadır.

2.2.2.7. İnflamasyon

İnflamasyon, omurilik hasarı sonrasında çok hızlı bir şekilde başlamaktadır. Yaralanmayla başlayan ve devam eden kanama, ödem, nöroeksitotoksinlerin akümülyasyonu 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 hücresele yanıtları içermekle birlikte organizmanın zedeleyici etkeni çevreleyerek yok etme ve zararlı süreçleri sınırlandırmasını sağlayan ve takiben doku onarımına yol açan bir süreçtir.

Akut inflamasyonun ortaya çıkmasındaki en büyük etken yaralanma bölgesindeki vasküler yanıttır. Yaralanmadan hemen sonra kısa süren bir vazokonstriksiyon ve ardından arterioller vazodilatasyon oluşur. Bu da kapiller yatağa daha fazla kan gelerek konjesyona ve takiben vasküler permeabilitede artışa sebep olur. Lezyon bölgesine inflamatuvar hücre infiltrasyonu, polimorfonükleer granulositlerin (PMNL) lezyon bölgesini birkaç saat içinde infiltre etmesiyle başlar ve travmanın birinci gününde en yüksek seviyeye ulaşır. Yapılan ışık ve elektron mikroskopi çalışmalarında 4. saatten önce kan damarları dışında çok az sayıda PMNL bulunurken, 4. saatte bunların damar içinde sayıca çok arttıkları ve damar duvarından çıkarak dokuya girmeye başladıkları görülmektedir. Sekiz saatlik preparatlarda, gri cevherde PMNL kümeleşmeleri görülmekte ve beyaz cevherde PMNL'ler nöronların içindeki inklüzyonlar olarak belirmektedir. Yirmidört saatlik preparatlarda, dejenere nöronların PMNL tarafından sarıldığı ve PMNL'ler arasında sellüler kalıntıların bulunduğu gösterilmiştir. PMNL'ler üçüncü günde kaybolurlar. Bu süre içinde granüler içeriklerini ortama salarak litik enzimlerinin etkisiyle vasküler, nöronal ve glial hasarı daha da artırabilmektedirler. PMNL infiltrasyonu miktarı ile oluşan hemoraji miktarı korelasyon göstermektedir. Histamin, plazma proteazları, bradikinin, prostaglandinler, lökotrienler, platelet aktive edici faktör (PAF), serbest oksijen radikalleri, serotonin gibi inflamasyon mediatörleri yaralanmış omurilikte lezyon bölgesinde birikirler. İnflamatuvar hücreler için kemoatraktan olan bu maddeler doku hasarının hızla ilerlemesine neden olurlar. Ortamdan kaybolan PMNL'lerin yerini mikroglial hücrelerden ve dolaşımdan kaynaklanan makrofajlar almaktadır. Makrofajlar myelin, hemorajik ve nekrotik doku kalıntılarını fagosite etmektedir. Aynı zamanda makrofajlar, anjiogenezi başlatan interlökin-1 (IL-1) benzeri sitokinleri de salgılamaktadırlar (27,28).

Sitokinler ve diğler endojen mediatörlerin sentezini ve karmaşık bir etkileşimini içeren olaylar zinciri doğal iyileşme sürecini sağlamaya yöneliktir. İnflamatuvar yanıtın aşırı olması organizma aleyhine olup, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu ve multipl organ disfonksiyonu sendromu ile sonuçlanabilir. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, travma hastalarında infeksiyonlara bağılı olarak da gelişebilir ve sepsis olarak tanımlanır.

Doku zedelenmesi yada infeksiyonların tetiklediğı sistemik inflamatuvar yanıt sendromunda rol alan başlıca sitokinler; TNF-alfa (tümör nekroz faktör), IL-1, IL-8, interferon gama ve PAF'tır. Ayrıca prostoglandin ve lökotrienler gibi araşidonik asit metabolitleri sentezlenir. Koagulyasyon ve kinin sistemi aktive olur. IL-6 akut inflamatuvar yanıtta modülatör rolü oynar. Travma hastalarında değışik düzeylerdeki hiperinflamatuvar olayları kompensatuvar bir hipoinflamasyon dönemi ve immünosüpresyon dönemi izler. Bu dönemde nötrofil kemotaksisi, fagositoz ve hücre içi öldürme işlevlerinde yetersizlik, monosit/makrofaj işlevlerinde azalma, T lenfositlerinde işlev anomalileri, B lenfositlerinde ve başta IgM olmak üzere immünglobulin sentezinde azalma, opsonik aktivitede yetersizlik ve gecikmiş tipte aşırı duyarlılık testlerinde negatifleşme saptanmıştır.

Antiinflamatuvar olan Metilprednizolon, PAF antagonistleri, siklooksijenaz ve lipojenazların etkilerini (inflamatuvar cevapları) kısmen azaltarak ya da tamamen inhibe ederek göstermektedirler (29).

2.3. Sitokinler

Sitokinler hücresele düzenleyici proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinlerin tanımlanması ve karakterize edilmesi çeşitli isimlendirme ve sınıflandırma sistemine göre yapılmıştır. Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır:

1. Büyüme faktörleri
2. Lenfokinler (interlökin-1 alfa ve beta, interlökin 2,3,4...)

3. Koloni stimüle eden faktörler
4. Transforme edici büyüme faktörleri
5. Tümör nekroz faktörleri (TNF-alfa ve beta)
6. İnterferonlar

IL-1 ve TNF gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık yanıtının ortaya çıkmasında rol oynarlar(29).

2.3.1. İnterlökin-1 Beta (IL-1 beta)

IL-1 monositler, lenfositler, endotel hücreleri ve mikroglialar gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınır. İnflamasyon, sepsis, diabet, otoimmün hastalıklar ve osteoporoz oluşumunda etkisi olduğu düşünülmektedir. IL-1 beyinde ilk tanımlanan sitokinlerden olup, başlangıçta endojen pirojen olarak tanımlanmıştır. Kilo kaybı, uykunun düzenlenmesi, endokrin sistem, immün sistem ve sinir sistemi fonksiyonlarını değiştirme, nöronal iletim, epilepsi, sinir hücre ölümü dahil IL-1'in endojen ve ekzojen bir çok etkisi gösterilmiştir. IL-1 klasik olarak IL-1 alfa ve beta olmak üzere 2 subtipde tanımlanır. Her ikisi de benzer etkiye sahiptir (30). Üçüncü tanımlanan protein IL-1 ra (IL-1 reseptör antagonisti) olup, IL-1'in bilinen tüm etkilerini kompetitif antagonize eder ama diğer etkileri tam bilinmemektedir (30). Tüm IL-1 molekülleri prekürsör olarak salınır. Bunlardan pro-IL-1 alfa ve pro-IL-1 ra biyolojik olarak aktif iken, pro-IL-1 beta inaktiftir. Ama caspase-1 enzimi tarafından aktif formuna dönüşür. IL-1'in hücre salınımı ve enzim tarafından bölünmesi çoğunlukla bilinmez. IL-1 alfa ve beta'nın etkilerini gösterebilmesi için tek bir reseptörüne (IL-1RI) bağlandığına inanılır.

IL-1 çeşitli etkileri ile SSS'deki nöronal hasara neden olabilir. Bunun en önemli olanı ateştir. IL-1 güçlü bir pirojendir. Hipotalamusta prostaglandin salınımı yolu ile ateşe neden olur. IL-1'in neden olduğu ateş siklooksijenaz inhibitörleri veya glukokortikoidler ile önlenir. Ama nöronal hasarın önlenmesinde hiçbiri anlamlı

değildir. Bununla birlikte IL-1, beynin bazı bölgelerindeki ısının üzerine lokal etki yaparak nöronal hasarı arttırabilir.

Akut nöral doku zedelenmesinde (iskemik, travmatik, eksitotoksik hasar) IL-1'in etkisi için birçok kanıt mevcuttur. Ama kronik bozukluklarda IL-1 ile ilişkili olduğunu gösteren indirekt kanıtlar dahi toplanamamıştır (31). Klinik çalışmalarda beyin zedelenmesi veya stroklu hastaların Beyin Omurilik Sıvısı'nda ve postmortem beyin dokusunda IL-1 seviyesinin yüksek olduğu rapor edilmiştir. Erken dönemde IL-1 salınımı ilk olarak mikroglia ve perivasküler makrofajlarca olur. Bununla birlikte astrosit, endotelial hücrelerde IL-1 salınım kapasitesine sahiptir. IL-1 normal kemirgen beyninde veya sağlıklı nöron hücre kültürlerinde nörotoksik değildir ama kemirgen beyin parankimi veya ventriküllerine düşük doz enjekte edilmesi ile nörotoksik etkiler başlar (32).

IL-1 beta'nın intraserebral verilmesi kan-beyin bariyerinde bozulmaya neden olup serebral ödem ve sekonder hücre ölümü ile sonuçlanır (33).

IL-1 beta nöronal nekroz, apoptozis, lökosit infiltrasyonu, ödem, glial hücre aktivasyonu, diğer sitokinlerin aktivasyonu ve nitrik oksit sentezi ile ilişkilidir (34). Örneğin IL-1 beta astrositlerden IL-6 sekresyonuna, astrosit stimülasyonuna ve astrositlerden sinir büyüme faktörü ve temel fibroblast büyüme faktörünün salınmasına neden olabilir (35). IL-1 reseptör antagonistinin sistemik enjeksiyonu nöronal hücre ölümünü azalttığı ve lateral sıvı perküsyon kafa travmasında kognitif fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (36).

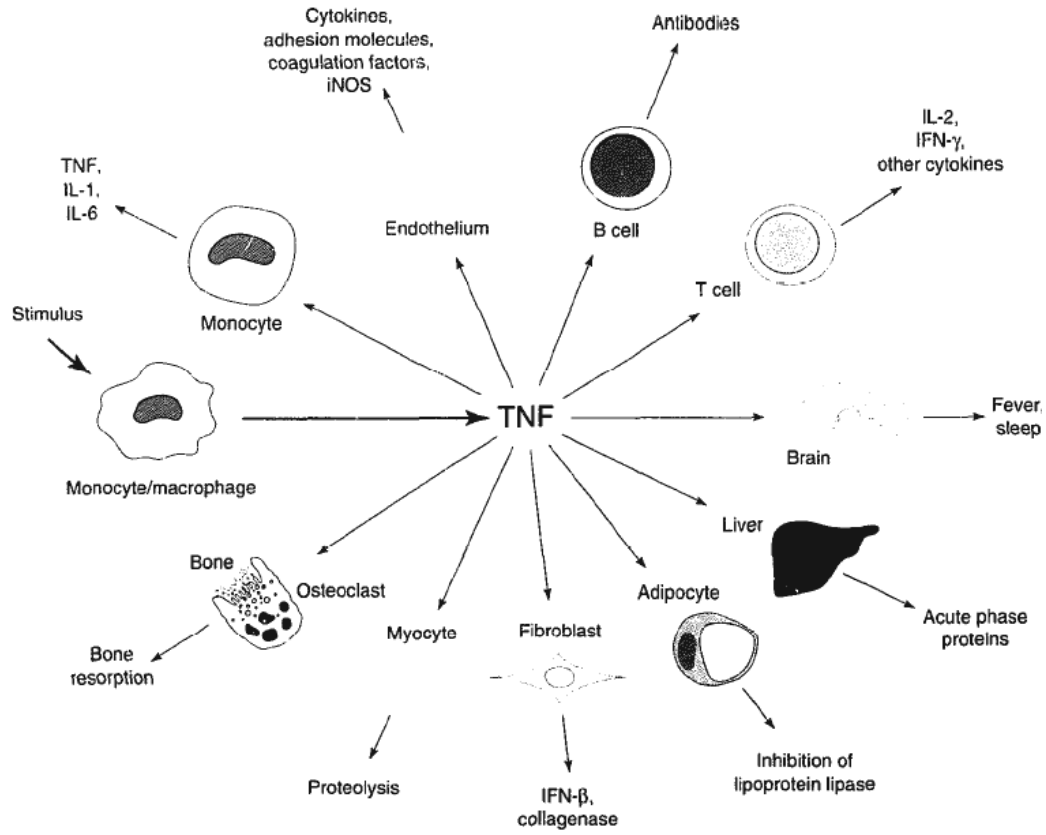
2.3.2. Tümör Nekrozis Faktör alfa (TNF-alfa)

TNF-alfa birçok inflamatuvar ve enfeksiyöz hastalıkların patogeneğinde önemli role sahiptir. TNF alfa'nın major kaynağı aktive olmuş monosit ve makrofajlardır. TNF 233 aminoasit ve 26 kDA ağırlığında proproteinden sentezlenir. Proprotein spesifik metalloproteaz (TNF-alfa konverting enzim-TACE) tarafından 17 kDA, 157 aminoasitten oluşan monomerik formuna bölünür. TNF etkisini membran bağımlı reseptör molekülleri TNF reseptör I (TNFRI, p55) ve TNFRII (p75)

aracılığıyla gösterir (37). TNF reseptörleri çözülebilir yapıda olup TNF'yi bağlama yeteneğindedir. Böylece TNF'nin akut etkilerini sınırlayabilmektedir (38).

TNF'nin temel fonksiyonlarından bazıları:

1. Lökositler için vasküler endotelial hücre adezyonunun indüksiyonu
2. Fagositlerin stimülasyonu ve IL-1, IL-6, IL-8 gibi sitokinlerin ürünlenmesi, antiinflamatuvar sitokinleri (IL-4, IL-10, IL-13, TGF-beta) uyarması, ayrıca doğal sitokin inhibitörleri olan IL-1ra ve solubl TNF reseptörlerinin üretimini arttırması (Böylece aşırı sitokin yanıtı dengelenir)
3. MHC-Class I molekül indüksiyonu
4. Lökosit aktivasyonu
5. Uzun süre uygulaması sonucu kaşeksi ve kas erimesi
6. Gram negatif sepsiste septik şok nedeni olması
7. Endotelial hücreler ve astrositler üzerinde ICAM-1 ekspresyonu artışı
8. Schwartzman reaksiyonu sonucu tümör nekrozu, endojen pirojen etki, akut faz reaktanlarında artış (33).



Şekil 1.

TNF sentezi, birçok farklı eksojen maddeler (lipopolisakkaridler, beta-glukanlar) veya endojen mediatörler (IL-1) aracılığıyla monosit ve makrofajlarda uyarılır.

Plazmada artmış konsantrasyonu çeşitli infeksiyöz ve inflamatuvar hastalıklarda gösterilmiştir (sepsis, bakteriyel menenjit, serebral malarya, adult respiratuvar distres sendromu, romatoid artrit) (39).

Anti TNF ajanlar 3 grup içinde sınıflandırılabilir. Birincisi; TNF'nin sentezi fosfodiesteraz inhibitörleri, prostanoidler, adenosin, kortikosteroidler, IL-10 tarafından inhibe edilebilir. İkincisi; TNF pro-protein, TNF metalloproteaz spesifik inhibitörleri tarafından inhibe edilebilir. Üçüncüsü; salınmış TNF proteinin etkileri TNF reseptörleri veya anti-TNF antikorları tarafından antagonize edilebilir (39).

Yapılan çalışmalarda TNF-alfa mRNA ve proteinlerinin, omurilik hasarını takiben omurilikte arttığı gösterilmiştir. Omurilik hasarı sonrası TNF-alfa proteinleri, aktive monosit/makrofajlar sayesinde omurilikte bulunur. Omurilikte, TNF-alfa proteinleri erken 1. saatte tespit edilir ve travmadan sonra 7 gün boyunca bulunur. Astrosit ve mikrogliaların Merkezi sinir Sistemi hasarına cevapta TNF-alfa sekrete ettikleri gösterilmiştir (40). Monositler hasardan sonra erken dönemde (30 dakika) tespit edilmiştir (41). TNF-alfa'nın bu erken sentezi omurilikteki ilerleyici inflamatuvar cevabın başlangıcı için önemli bir sinyaldir. TNF-alfa ürünleri hasar sonrası 1-3. günler arasında nötrofil ve monositlerin yayılması için gereklidir.

TNF-alfa sinyal mekanizması çok karışıktır. TNF-alfa'nın ortaya çıkması ve SSS'nde biyolojik cevabın ortaya çıkması için RGS7'nin (regulator of G-protein signaling-7) hazırda bulunmasını gerektirir. Son zamanlardaki çalışmalarda, omurilik hasarı sonrası nöron ve makrofajlarda RGS7 miktarı gösterilmiştir (40).

Bazı çalışmalarda gösterilmiştir ki, TNF-alfa nöroprotektiftir. Örneğin, TNF-alfa hipokampal kültürlerde reaktif oksijen radikal toplanmasını suprese eder, amiloid alfa-peptidin sitotoksik etkisini düşürür, glutamat nedenli hücre ölümünü önler (42).

2.4. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Kafeik asit fenetil ester (CAPE), arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir. Propolis'in antimikrobik, antienflamatuvar, immunmodülatör, antimitojenik, antioksidan etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konmuş, bu etkilerin çoğunun propolis'in etkin maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (43). İnsan vücudundaki normal hücrelere karşı hiçbir zararlı etkisi bulunmamaktadır. Arı kovanlarının çatlak ve hasarlanmış yerlerinin tamirinde, dış ortamdan izole edilmesinde, giriş deliklerinin daraltılmasında, kovanın içine giren zararlı maddeler, mikroorganizmalar ve böceklerin mumlanarak etkisiz hale getirilmesinde propolis kullanılmaktadır. Propoliste yaklaşık 100 çeşitten fazla bileşen bulunmuştur. Propolis arıların bitkilerden topladığı maddelere göre değişmektedir. Flavonoidler, kafeik asit ve esterleri propoliste en fazla bulunan ve propolisin biyolojik olarak aktif

bileşenidir (44). CAPE, kafeik asit ve fenetil alkol üzerinden asit ile esterifikasyon ile kimyasal olarak da üretilmektedir (45).

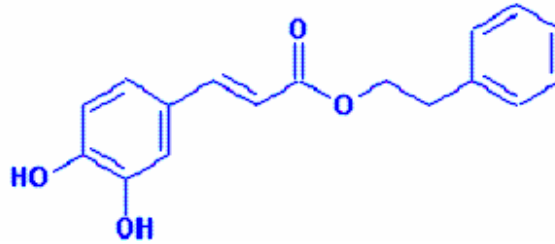
2.4.1. CAPE nin Yapısı ve Kimyasal Özellikleri

Yapısal olarak flavanoidlere benzeyen CAPE'nin iki halkasal yapısı vardır.

MOLEKÜL FORMÜLÜ: C₁₇H₁₆O₄

MOLEKÜL AĞIRLIĞI: 284.3

Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)



Şekil 2. CAPE'in kimyasal formülü (46).

Halkalardan bir tanesinde molekülün hemen hemen bütün kimyasal özelliklerini gösteren ve fonksiyonel olan iki “-OH” grubu vardır. Hidroksil grupları, aktif bir şekilde elektron alıp vererek oksidan ve redüktan özellik gösterirler. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özelliktedirler. Böylece molekülün kolayca hücre membran yapılarından geçmesi ve etki edeceği bölgeye ulaşması kolaylaşır. CAPE intraperitoneal olarak uygulandığı zaman yeterli kan konsantrasyonuna ulaşmaktadır (47).

2.4.2 CAPE nin Antiinflamatuvar Etkisi

CAPE'nin antiinflamatuvar etkinliği yapılan çalışmalarda Diklofenak ve Hidrokortizon ile eşdeğer bulunmuştur. CAPE, özgül olarak NF-κB'yi bloke ederek ve oksijen radikallerini bloke ederek başta TNF-α olmak üzere birçok inflamatuvar ajanları bloke etmektedir. CAPE'nin glukokortikoid reseptörlerinden bağımsız olarak inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği de gösterilmiştir. Ayrıca CAPE; ornitin karboksilaz, 5-alfa redüktaz, proteaz, lipoksijenaz, HIV-1 integras gibi bazı enzimlerin potansiyel engelleyicisidir (48).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Deney Hayvanları ve Deney Planı

Çalışmamızın cerrahi işlem bölümü SDÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma laboratuvarında, biyokimyasal incelemeleri SDÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında, histopatolojik incelemeler SDÜ Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmada ağırlıkları 170-346 gram olan 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı.

Çalışma 3 ana grup olarak planlandı.

Grup 1a: (n=8) Sadece laminektomi (1. saat)

Grup 1b: (n=8) Sadece laminektomi (6. saat)

Grup 2a: (n=8) Laminektomi + Travma + SF (1. saat)

Grup 2b: (n=8) Laminektomi + Travma + SF (6. saat)

Grup 3a:(n=8) Laminektomi + Travma + CAPE (1. saat)

Grup 3b:(n=8) Laminektomi + Travma + CAPE (6.saat)

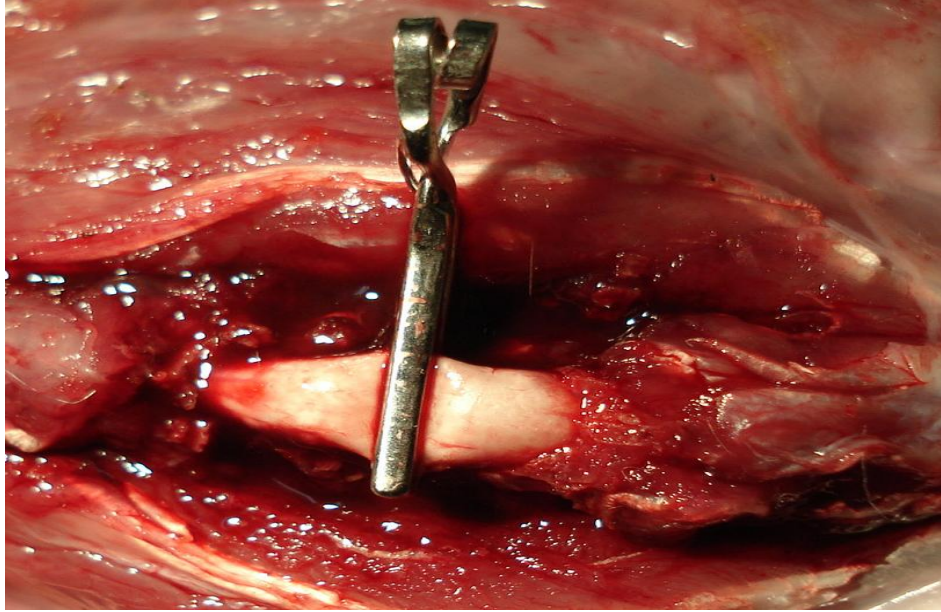
Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm gruplardaki hayvanlara genel anestezi amacıyla intraperitoneal olarak 60 mg/kg dozunda Ketamin (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul) ve 10 mg/kg dozunda Xylazaine (Alfazyne) uygulandı.

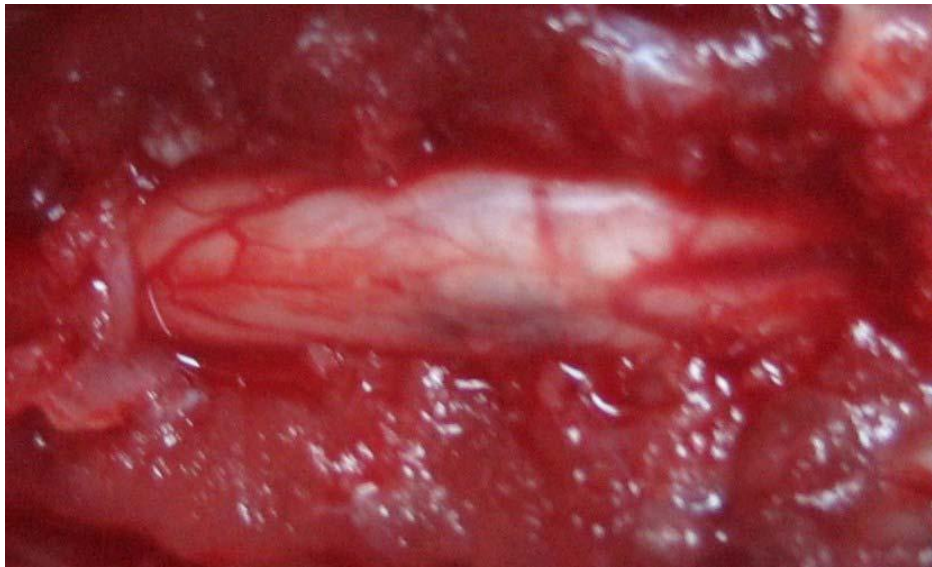
Cerrahi işlem

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.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 klipi (Sugita no: 07-934-11, kapanma basıncı: 1.37-1.72 N) ile dura ve spinal kord çepçevre olacak şekilde, horizontal ekstradural olarak 1 dakika süreyle klibe edildi (Resim 1) ve omurilik hasarı oluşturuldu. Hemostazı takiben tabakalar anatomiye uygun olarak 3/0 prolen ile kapatıldı.



Resim 1. Klip sonrası görünüm



Resim 2. T travma sonrası omurliliğin görünümü

Her grupta 8 adet rat kullanıldı.

1-Birinci gruba(1a) (n=8): Laminektomi sonrası 1. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

2-İkinci gruba(1b) (n=8): Laminektomi sonrası 6. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

3-Üçüncü gruba (2a) (Kontrol 1) (n=8): Laminektomi sonrası klip yöntemi ile 1 dakika süreyle spinal travma oluşturuldu. Travmadan 30 dk sonra intraperitoneal (tedavi dozu ile aynı dozda) Serum Fizyolojik verildi. Travma sonrası 1. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

4-Dördüncü gruba (2b)(Kontrol 2)(n=8): Laminektomi sonrası klip yöntemi ile 1 dakika süreyle spinal travma oluşturuldu. Travmadan 30 dk sonra intraperitoneal (tedavi dozu ile aynı dozda) Serum Fizyolojik verildi. Travma sonrası 6. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

5-Beşinci gruba (3a)(Tedavi 1) (n=8): Laminektomi sonrası klip yöntemi ile 1 dakika süreyle spinal travma oluşturuldu. Travmadan 30 dk sonra intraperitoneal

Kafeik Asit Fenetil Ester (sigma) verildi. Travma sonrası 1. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

6-Altıncı gruba (3b)(Tedavi 2) (n=8): Laminektomi sonrası klip yöntemi ile 1 dakika süreyle spinal travma oluşturuldu. Travmadan 30 dk sonra intraperitoneal CAPE verildi. Travma sonrası 6. saatte kanı alındı ve rat sakrifiye edilir edilmez hemen ekspose edilen spinal kordun tümünün üzerine enzimatik reaksiyonları durdurmak amaçlı sıvı nitrojen döküldü. TH10 seviyesinin iki alt iki üst segmenti çıkarıldı. Spinal kordan 5 mm si histolojik inceleme için ayrıldı ve geri kalan travmalı kısmı Azot tankında donduruldu.

Işık mikroskopik inceleme için alınan omurilik segmentleri %10'luk formalinde fikse edildi.

Çıkarılan omurilik dokuları azot tankında dondurulduktan sonra -80 C buzdolabına yerleştirildi. Omurilik dokularında interlökin-1 beta ve tümör nekrozis faktör alfa düzeylerine bakıldı. Alınan serumlarda santrifüze edilerek interlökin-1 beta ve tümör nekrozis faktör alfa düzeylerine bakıldı.

3.2. Doku Homojenizatının Hazırlanması

Medulla spinalis tartılarak, 1/9 oranında 0.1 M fosfat tamponuyla karıştırılarak buz üzerinde, homojenizatörle 10.000 devir/dk'da 1dk homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 5000 g'de +4°C'da soğutmalı santrifüjde 5 dakika santrifüze edildi. Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında İnvitrogen USA Elisa kiti kullanılarak aeroset cihazında protein tayini yapıldı.

3.3. TNF alfa ve IL-1 Beta Tayini

TNF α Ölçümü

Rat TNF α ELİSA kiti (İnvitrogen USA, catalog no KRC3011) kullanıldı.

Ölçüm Biotec instrument, inc EL *808U cihazında yapıldı (pg/ml) (132)

IL1 β Ölçümü

Rat E IL1- β ELİSA kiti (İnvitrogen USA, catalog no KRC0011) kullanıldı.
Ölçüm Biotec instrument, inc EL *808U cihazında yapıldı (pg/ml) (132)

3.4. Histopatolojik Analiz

Doku takip çalışmaları

Işık mikroskopik inceleme için alınan omurilik segmentleri nötral formaldehit ve paraformaldehit solüsyonunda, immersiyon fiksasyon yöntemi uygulanarak tespit edilen dokular yıkama işleminden sonra aşağıda gösterilen işlemlerden geçirildi.

A) Dehidratasyon

Dokular dereceli alkollerde aşağıdaki sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi Süre

%50	1 saat
%70	1 saat
%80	1 saat
%90	1 saat
%96	1 saat
%100	1 gece

Şeffaflaştırma

Ksilolde 5-15 dk.

Emdirme

Ksilol+parafin (60 oC etüvde) 15 dakika

Yumuşak parafin (60 oC etüvde) 1 saat

Sert parafin (60 oC etüvde) 4 saat

Gömme

Sert parafin kullanılarak dokular bloklandı. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica marka kızaklı mikrotom kullanılarak 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Histolojik değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı.

3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistik analizde, SPSS 17.0 programı kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmada, Mann Whitney U testi kullanıldı ve 0,05'in altındaki p değerleri, istatistik açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Grafikler, Mikrosoft Excel programında oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. İstatiksel Bulgular

Araştırma gruplarından alınan serum ve dokuların biyokimyasal analiz sonuçları tablo 3’de gösterilmiştir. Orta değer, minimum değer, maksimum değer ve standart sapmaları tablo 4’de gösterilmiştir.

Laminektomi grubunda (G1a) 1. saatte bakılan TNF- α /protein (188.03 \pm 100) ve IL-1 β /protein (159,13 \pm 93) değerleri ile kontrol grubu (G2a) TNF- α /protein (194,23 \pm 111) ve IL-1 β /protein (159,32 \pm 100) değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık saptanmadı. Tedavi grubu 1. saatte TNF- α /protein (407.90 \pm 368.57) değerleri G1a ve G2a ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak TNF- α /protein da anlamlılık saptanmadı. Tedavi grubu 1. saatte (G3a) IL-1 β /protein (354,04 \pm 241,60) G1a ve G2a ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak (p< 0,05) anlamlılık saptandı. (Tablo:5)

Laminektomi, kontrol ve tedavi gruplarının 6. saatlerinde bakılan serum ve doku örneklerindeki TNF- α /protein, IL-1 β /protein değerlerinde istatistiksel anlamlılık saptanmadı.(Tablo 6)

Laminektomi, kontrol ve tedavi gruplarının 1. saatlerinde bakılan serum örneklerindeki TNF- α /protein, IL-1 β /protein değerlerinde istatistiksel anlamlılık saptanmadı.(Tablo5, Tablo 6)

Tablo 3. Araştırma gruplarının biyokimyasal değerleri

Grup	Ağırlık	TNFalfa Serum	TNFalfa doku	IL1beta serum	IL1beta doku	Protein	TNFalfa doku son	IL1beta doku son
1a	196 gr	9,292	113,66	28,732	124,093	83,7	271,589	148,259
1a	250 gr	14,463	65,358	20,283	86,454	85,8	152,35	100,762
1a	193 gr	14,257	31,662	27,065	104,704	86,1	73,547	121,607
1a	246 gr	15,296	115,477	83,253	230,232	71,8	321,663	320,657
1a	206 gr	8,53	75,026	24,365	136,707	101,9	147,254	134,158
1a	192 gr	8,021	140,729	11,843	255,364	88,8	316,957	287,572
1a	194 gr	6,254	61,13	13,058	81,458	96,4	126,826	84,5
1a	219 gr	8,34	46,068	12,157	73,974	97,9	94,112	75,561
1b	207 gr	10,254	24,239	35,658	143,929	73,7	65,777	195,29
1b	188 gr	9,676	66,071	15,95	83,956	58,1	227,439	144,503
1b	183 gr	13,243	54,231	18,224	51,049	88,4	122,694	57,748
1b	197 gr	9,292	66,661	27,182	149,675	91,8	145,231	163,045
1b	170 gr	8,091	124,169	31,584	116,542	112,4	220,941	103,685
1b	255 gr	9,676	117,172	27,261	124,093	109,2	214,601	113,638
1b	189 gr	8,356	128,452	13,385	112,356	95	270,425	118,269
1b	228 gr	9,869	139,046	11,057	146,11	117,8	236,071	124,032
2a	219 gr	8,719	98,008	38,732	135,086	63,9	306,754	211,402
2a	198 gr	9,869	25,219	32,583	73,238	49,5	101,895	147,956
2a	183 gr	15,928	35,584	54,107	49,531	50,2	141,769	98,667
2a	238 gr	11,234	57,518	47,156	106,094	79,2	145,247	133,957
2a	215 gr	9,1	26,845	19,155	56,174	104,5	51,378	53,755
2a	277 gr	10,265	121,731	16,362	136,106	103,8	234,549	131,123
2a	248 gr	7,96	80,754	20,164	101,592	88,6	182,289	114,664
2a	270 gr	10,063	88,724	32,583	174,293	45,5	389,996	383,062
2b	213 gr	12,027	53,884	38,07	81,458	67,4	159,893	120,858
2b	207 gr	13,031	35,352	56,381	51,372	70,3	100,575	73,075
2b	156 gr	10,625	140,006	17,361	38,562	109,8	255,02	35,12
2b	270 gr	9,483	137,26	47,039	236,256	98,2	279,552	240,587
2b	174 gr	9,125	116,512	20,194	139,175	71,8	324,546	193,837
2b	165 gr	8,152	142,007	31,351	205,633	81,6	348,056	252,001
2b	215 gr	9,162	101,143	19,964	159,215	92,6	218,451	171,938
2b	346 gr	8,964	115,826	15,32	146,788	102,6	225,782	143,068
3a	248 gr	7,956	45,3	30,257	142,364	60,2	150,498	236,485
3a	243 gr	9,628	63,593	17,316	91,087	10,4	1222,942	875,837
3a	206 gr	9,564	88,832	30,068	200,531	62,3	285,175	321,88
3a	245 gr	10,821	102,385	36,78	267,157	79,5	257,572	336,047
3a	255 gr	8,71	130,498	17,152	162,423	104,5	249,757	155,429
3a	255 gr	8,961	111,288	20,518	182,691	52	428,031	351,329
3a	275 gr	8,534	94,365	21,339	145,372	72,21	261,363	201,318
3a	256 gr	9,675	.	17,208
3b	252 gr	9,162	87,495	12,058	109,095	92,7	188,77	117,686
3b	266 gr	9,486	90,257	13,69	119,357	33,6	537,244	355,229
3b	229 gr	8,756	118,535	29,761	215,403	66,7	355,427	322,943
3b	220 gr	10,184	126,226	44,882	160,218	83,1	303,793	192,801
3b	267 gr	9,21	106,18	16,901	116,098	89,9	236,218	129,141
3b	275 gr	10,02	113,709	23,358	131,154	102,1	222,74	128,456
3b	195 gr	9,08	103,824	22,165	115,421	107,2	193,701	107,669
3b	208 gr	8,65	113,801	18,157	111,865	70,9	321,018	157,779

Tablo 4. Araştırma gruplarının tanımlayıcı istatistik değerleri (En düşük, en yüksek, orta değer ve standart sapma değerleri)

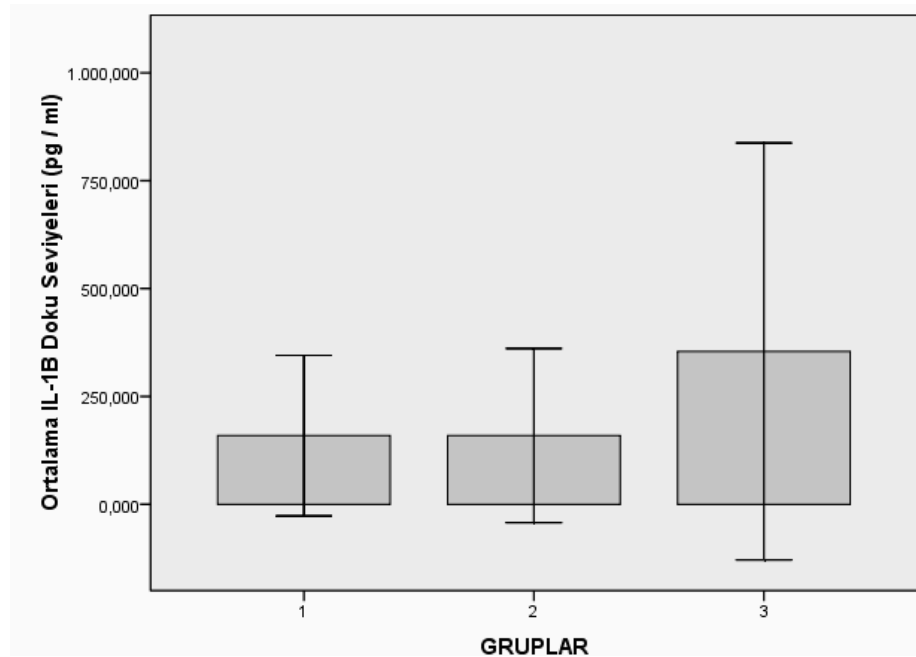
Grup		N	Minimum	Maximum	Mean Std.	Deviation
1a	TNFSERUM pg/ml	8	6.254	15.296	10.55663	3.524934
1a	IL1BSERUM pg/ml	8	11.843	83.253	27.59450	23.485760
1a	TNFDokuson pg/mg	8	73.547	321.663	188.03726	100.050479
1a	IL1bdokuson pg/mg	8	75.561	320.657	159.13464	93.119298
1b	TNFSERUM pg/ml	8	8.091	13.243	9.80712	1.574772
1b	IL1BSERUM pg/ml	8	11.057	35.658	22.53763	9.066745
1b	TNFDokuson pg/mg	8	65.777	270.425	187.89745	69.163677
1b	IL1bdokuson pg/mg	8	57.748	195.290	127.52630	41.178954
2a	TNFSERUM pg/ml	8	7.960	15.928	10.39225	2.453481
2a	IL1BSERUM pg/ml	8	16.362	54.107	32.60525	13.685888
2a	TNFDokuson pg/mg	8	51.378	389.996	194.23466	111.379674
2a	IL1bdokuson pg/mg	8	53.755	383.062	159.32321	100.823192
2b	TNFSERUM pg/ml	8	8.152	13.031	10.07113	1.684781
2b	IL1BSERUM pg/ml	8	15.320	56.381	30.71000	15.219009
2b	TNFDokuson pg/mg	8	65.777	270.425	187.89745	69.163677
2b	IL1bdokuson pg/mg	8	57.748	195.290	127.52630	41.178954
3a	TNFSERUM pg/ml	8	7.956	10.821	9.23113	.882327
3a	IL1BSERUM pg/ml	8	17.152	36.780	23.82975	7.521157
3a	TNFDokuson pg/mg	7	150.498	1222.942	407.90548	368.577690
3a	IL1bdokuson pg/mg	7	155.429	875.837	354.04624	241.601096
3b	TNFSERUM pg/ml	8	8.650	10.184	9.31850	.551063
3b	IL1BSERUM pg/ml	8	12.058	44.882	22.62150	10.631948
3b	TNFDokuson pg/mg	8	188.770	537.244	294.86411	115.456037
3b	IL1bdokuson pg/mg	8	107.669	355.229	188.96310	96.740532

Tablo 5. Birinci saatte, gruplar arası karşılaştırmalı p değerleri.

Gruplar	TNF - Alfa		IL- 1 Beta	
	Serum	Doku	Serum	Doku
1 – 2	0,645	1,000	0,234	1,000
1 – 3	0,959	0,152	0,574	0,009
2 – 3	0,195	0,072	0,234	0,021

Tablo 6. Altıncı saatte, gruplar arası karşılaştırmalı p değerleri.

Gruplar	TNF - Alfa		IL- 1 Beta	
	Serum	Doku	Serum	Doku
1 – 2	0,959	0,234	0,279	0,442
1 – 3	0,505	0,065	0,959	0,234
2 – 3	0,574	0,505	0,279	0,798

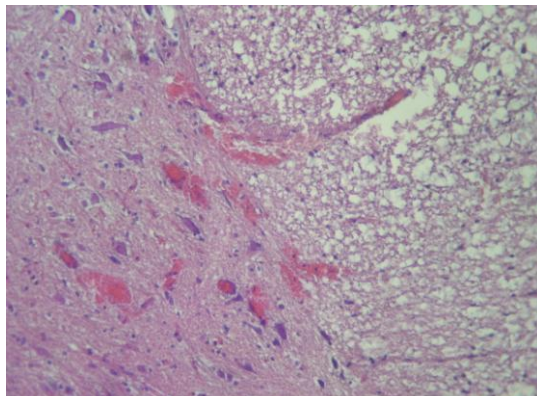
**Grafik 1.** Deneklerin 1. Saat IL-1 beta/protein düzeylerinin karşılaştırılması

G2a: laminektomi + travma + SF sonrası 1. saat

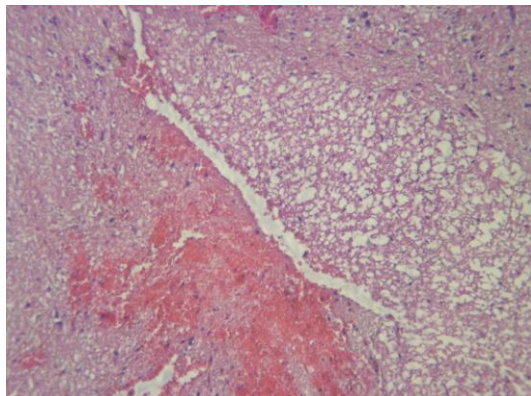
G3a: laminektomi + travma + CAPE sonrası 1. saat

*: Tedavi grubu ve CAPE grubu 1. saat IL 1 Beta / protein düzeyleri arasında istatistiksel anlamlılık ($p < 0,05$)

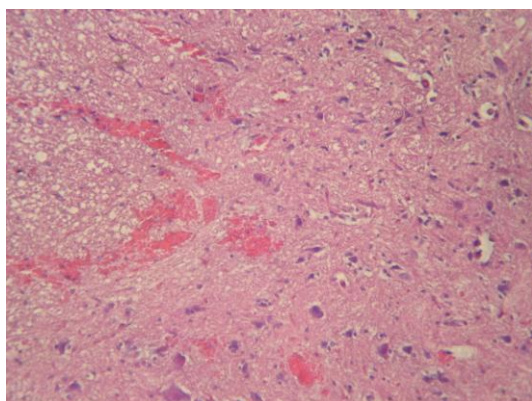
4.2. Histopatolojik Bulgular



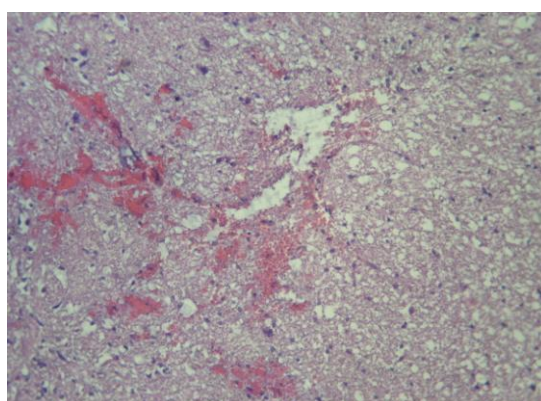
Fotoğraf 1a:



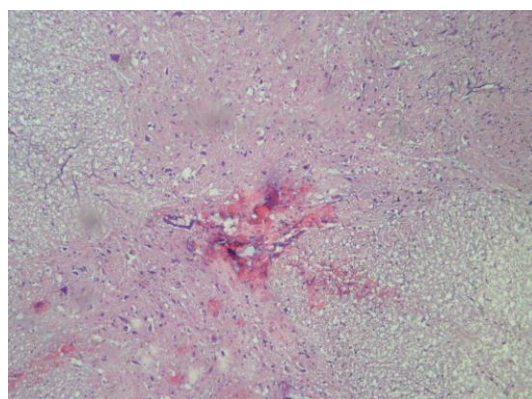
Fotoğraf 1b:



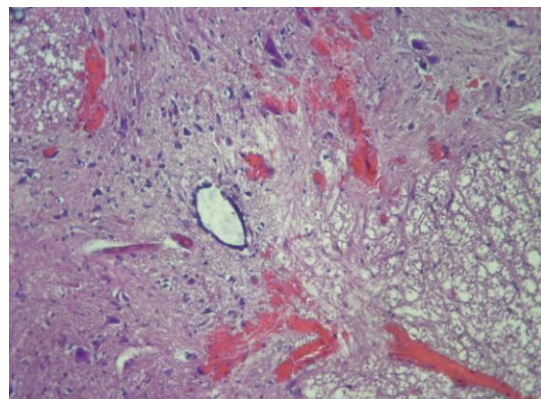
Fotoğraf 2a:



Fotoğraf 2b:



Fotoğraf 3a:



Fotoğraf 3b:

Deneysel parametrelerin histolojik (yapısal) değerlendirmesi skorlandı.

(-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,

(+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,

(++) skor (2 pozitif skor): orta derecede,

(+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

1a grubu= Santral kanalda dejenerasyona rastlanmadı. Her iki cevherde de nekroz tespit (+1) edildi. Gri cevherde hemoraji (+2), Multipolar motor nöronların nissl cisimcikleri gözlendi(+1). Likefaksiyon nekroza rastlanmadı.

2a grubu= Likefaksiyon nekroza rastlandı. Her iki cevherde de nekroz tespit edildi (+2). Multipolar motor nöronların nissl cisimciklerinde herhangi bir azalma gözlenmedi (-). Hemoraji Gri cevherde (+2)

3a grubu= Santral kanal çevresinde hemoraji görüldü(+1), beyaz cevherde hemoraji görüldü (+1), Likefaksiyon nekroza rastlandı. Multipolar motor nöronların nissl cisimciklerinde herhangi bir azalma gözlenmedi (-). İmedi (-).

1b grubu= Likefaksiyon nekroza rastlandı. Her iki cevherde de nekroz tespit edildi (+2). Multipolar motor nöronların nissl cisimcikleri gözlemlenmedi(-). Gri ve beyaz cevherde yoğun hemoraji (+3) görüldü. Her iki cevherde de nekroz tespit edildi. Özellikle gri cevherde.

2b grubu= Likefaksiyon nekroza rastlandı. Her iki cevherde de nekroz tespit edildi (+1). Multipolar motor nöronların nissl cisimcikleri gözlemlenmedi. Gri ve beyaz cevherde yoğun hemoraji (+3) görüldü. Her iki cevherde de nekroz tespit edildi.

3b grubu=Likefaksiyon nekroza rastlanmadı. Gri cevherde nekroz görülmedi. Beyaz cevherde nekroz tespit edildi (+1). Gri ve beyaz cevherde hemoraji (+1)

görüldü. Multipolar motor nöronların nissl cisimciklerinde herhangi bir azalma gözlenmedi.

Grup	Nekroz	Hemoroj
1a	+1	+2
2a	+2	+2
3a	+1	+1
1b	+2	+3
2b	+1	+3
3b	+1	+1

5. TARTIŞMA-SONUÇ

Omurilik hasarı fiziksel, duygusal ve ekonomik boyutu ile toplumun geniş bir kesimini etkilemektedir. Komplet ya da inkomplet olsun sonuçları açısından büyük bir sosyal problemdir (52,53). Hayatta kalanların yarısından fazlası normal yaşantısına geri dönememektedirler. Birçok araştırmacı nörolojik fonksiyonları düzeltmek akut omurilik hasarı patofizyoloji mekanizmaları üzerinde değişik metodlar bulmaya çalışmaktadır. Tedavi için harcanan yoğun çabalar, çağdaş yaklaşıma olumlu katkılarda bulunmaktadır ancak kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve aynı zamanda evrensel bir tedavi protokolü geliştirilememiştir (54)

Omurilik hasarı patofizyolojisinde, 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 (49).

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, hümmoral ve hüccresel yanıtları içermekle birlikte organizmanın zedeleyici etkeni çevreleyerek yok etme ve zararlı süreçleri sınırlandırmasını sağlayan ve takiben doku onarımına yol açan bir süreçtir (50).

Travma sonrası bu alana infiltre olan nötrofiller, makrofajlar ve aktive mikroglialar 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.

Akut omurilik hasarını takiben IL-1 beta, TNF-alfa, IL-6 nın hücrel kaynaklı tartışmalıdır. Bazı otörler bu sitokinlerin nötrofil ve makrofajların primer ürünleri olduğuna inanırlar. Ama diğer çalışmalar göstermiştir ki endojen SSS hücreleri (mikroglia) çok sayıdaki hasar modelinde proinflamatuvar sitokinleri salgılamaktadır (51).

Akut omurilik hasarının optimal tedavisi için gelişmeler devam etmektedir. Günümüzdeki farmakolojik tedavi, yaralanmadan sonraki 8 saat içinde iv prednizolon verilmesini içermektedir (30 mg/kg iv 15 dakikada bolus, sonrasında 23 saatte 5.4 mg/kg/saat devamlı infüzyon). Randomize yapılan klinik çalışmaların sonucunda metilprednizolonun belirtileri gerçektir ama klinik gelişmedeki rolü sınırlıdır. Son zamanlarda serbest radikaller, eksitatör aminoasitler, inflamatuvar cevap mediatörleri, lokal nörotransmitter toksisitesi gibi posttravmatik patokimyasal olayları inhibe etmeye odaklanılmıştır (49).

Bizde çalışmamızda kafeik asit fenetil esteri kullandık. CAPE'nin protein tirozin kinaz, siklooksijenaz (non-spesifik olarak) ve lipooksijenaz aktivitesini baskıladığı ve böylece lipid peroksidasyonunu engellediği gösterilmiştir. CAPE nin antiinflamatuvar etkinliği yapılan çalışmalarda diklofenak ve hidrokortizon ile eşdeğer bulunmuştur. CAPE'nin glukokortikoid reseptörlerinden bağımsız olarak inflamatuvar hücrelerde apoptozisi önlediği de gösterilmiştir.

Çalışmamızda Rivlin ve Tator tarafından 1978 yılında geliştirilen klip kompresyon modelini kullandık.(13). 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.

Laminektomi (G1a) ve laminektomi sonrası travma + SF uygulanan grup

(G2a) arasında serum ve dokuda bakılan 1. saat TNF- α /protein, IL-1 beta/protein düzeylerinin ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0,01$) (Tablo 5)

Laminektomi sonrası travma oluşturulup CAPE verdiğimiz 1. saatte (G3a) bakılan IL-1 beta değerleri grup 1a, grup 2 a göre yüksek olup (tablo 5) bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,009$)($p=0,021$).Birinci saatteki tedavi grubu G1a ve G2a göre TNF- α değerinde anlamlılık saptanmadı. Bizim çalışmamızda 1. saatteki anlamlı IL-1 β artışına karşılık TNF- α da anlamlı bir farklılık saptanmadı. 6. saat serum IL1beta ve TNF alfa değerlerinde anlamlı farklılık saptanmadı.

Yapılan histopatolojik değerlendirmede gruplar arasında nekroz ve hemoroji değerlendirildi. Birinci saatte karşılaştırılan doku preparatlarında oluşan nekrozda farklılık saptanmadı. Omurilik dokusundaki hemorojik değişiklikte CAPE verilen grupta diğer gruplara göre anlamlı derecede hemorojide azalma olduğu görüldü. Travmanın 6. Saatinde alınan dokularda CAPE verilen grupta diğer gruplarla karşılaştırıldığında ciddi derecede nekrozda ve hemorojide azalma olduğu görüldü.

Sonuç olarak çalışmamız, CAPE'nin erken omurilik hasarı sonrası 1 saatte ortaya çıkan inflamatuvar sitokinlerinden olan IL1 betayı serumda yükseltmediği fakat hasarlı omurilik dokusunda anlamlı olarak yükselttiği görüldü. Bu sonuçlar; CAPE nin hasarlı omurilik dokusunda inflamasyonu artırdığını düşündürmektedir. Dokuların histopatolojik incelemeleri sonucunda CAPE nin oluşan nekrozu ve hemorojiyi azalttığı saptandı.

ÖZET

Akut Omurilik Hasarı Sonrası Kafeik Asit Fenetil Esterin İnflamatuvar Sitokinler Üzerine Etkisi

Amaç

Çalışmamızda, erken omurilik hasarı sonrasında CAPE nin inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β ve TNF- α üzerine olan etkisinin araştırılması ve hasarlı omurilik dokusundaki histopatolojik değişikliklerin tespiti amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bu çalışmada 170-361 gram arası ağırlıkta, 48 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Çalışma 3 grup olarak planlandı. Her bir grupta kendi arasında 2 alt gruba ayrıldı bunlarda 1. ve 6. saat olarak ikiye ayrıldı. 1. grupta 16 adet sıçana laminektomi sonrası 1 dakika travma uygulandı. 2. grupta 16 adet sıçana laminektomi sonrası travma uygulandı ve 30 dakika sonra SF verildi. 3. grupta 16 adet sıçana laminektomi sonrası travma uygulandı ve 30 dakika sonra CAPE verildi. Tüm grupların yarısı 1. saatte diğer yarısı 6. saatte sakrifiye edildikten sonra omurilikleri alındı. Alınan omurilik dokuları histolojik inceleme ve biyokimyasal analiz için ayrıldı. Ve dokular azot tankında dondurulduktan sonra -80 derecede muhafaza edildi. Daha sonra ELİSA kiti ile IL-1 β ve TNF- α değerleri çalışıldı. Histopatolojik inceleme içinde fiksasyon işlemlerinden geçirilerek ışık mikroskopunda incelendi.

Bulgular

İstatistiksel analiz sonucunda CAPE veriln grupta 1 saatte omurilik dokusunda IL1 beta değerlerinde artış olduğu istatistiksel olarak anlamlı bulundu.6. saatte IL1 beta ve TNF alfa değerlerinde istatikselsel anlamlılık saptanmadı. Histopatolojik çalışma sonrası CAPE nin oluşan nekrozu ve hemorojiyi azalttığı saptandı.

Sonuç

Sonuç olarak çalışmamız, CAPE erken omurilik hasarı sonrası 1.saatte ortaya çıkan inflamatuvar sitokinlerinden olan IL1 beta ı anlamlı olarak yükselttiğini ortaya koymaktadır. Travmalı omurilik dokusunda nekrozu ve hemorojiyi azalttığı görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Omurilik hasarı, inflamasyon, CAPE

SUMMARY

Aim: We aimed to investigate the effectiveness of CAPE on the inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α and to determine the histopathological changes in the spinal cord tissue following the early phase of the spinal cord injury.

Material and Methods: Forty-eight male Wistar-Albino rats weighing between 170-361 g were used in this study. The study was planned as 3 groups. Each group was also divided into two sub-groups. As a first and sixth hour. In the first group, sixteen rats were exposed to trauma for a minute after laminectomy. In the second group, sixteen rats were exposed to trauma after laminectomy and serum physiologic was administered after thirty minutes. In the third group, sixteen rats were exposed to trauma after laminectomy and CAPE was administered after thirty minutes. Half of the animals in each group were sacrificed at the first hour and the others were sacrificed at the sixth hour following trauma. Their spinal cords were removed. The tissue samples of the spinal cord segments were divided for histological and biochemical analysis. The tissues were frozen in the nitrogen tank and preserved at the temperature of -80°C . Then, the IL-1 β and TNF- α levels were analysed by ELISA. The samples for histopathologic analysis were evaluated at the light microscopy after fixation processes.

Results: In the group was administered CAPE, IL-1 β levels increased at the first hour in the spinal cord tissue and this was found statistically significant, but the IL-1 β and TNF- α levels were not found statistically significant at sixth hour. After histopathologic analysis, it was determined that CAPE decreased the necrosis and hemorrhage.

Conclusion: Our study has shown that IL1 β -one of the inflammatory cytokines-levels significantly increased with the administration of CAPE at the first hour after early phase of the spinal cord injury. It is seen that the necrosis and hemorrhage in the traumatized spinal cord tissue decreased with administration of CAPE.

Key words: Spinal cord injury, inflammation, CAPE

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. 3.M.Hancı, B. E. Gençosmanoğlu: Omurilik yaralanmalarında sınıflama. *Omurilik Ve Omurga Cerrahisi Cilt I*, 2002 s:867
4. 4.Dr. E. Kaptanoğlu: TND Temel Nöroşirürji Cilt 2, s:1144-1145
5. Agrawal SK, Fehlings MG: Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of Na, Na-K ATPase, the NA-H exchanger and the Na-Ca exchanger. *J. Neuroscience*, 16 (2): 545-552, 1996.
6. İplikçioglu C: Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. *Omurilik Omurga Cerrahisi*, Ed. M.Zileli, Fahir Özer, 1. Baskı, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, 2002, s: 459-465
7. Naderi S, M.Zileli, A. Fahir Özer: Omurga Cerrahisinin Tarihçesi, *Omurilik ve Omurga Cerrahisi* Ed. M. Zileli, Fahir Özer, 2. baskı, cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir 2002, s:1-13
8. Xarchas K, Bourandas J: Injuries and disease of the spine in ancient times. *Spine*, 28 (13): 1481-1484, 2003
9. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurgery* 1991;75:15-26.
10. Heffner JE, Repine JE: Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Rev Respir Dis*, 140: 531-554, 1989
11. İplikçioglu C: Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. *Omurilik Omurga Cerrahisi*, Ed. Zileli M, Özer AF, 2.Baskı, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2002, s: 459-465.
12. Guha A, Tator CH. Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J Trauma* 28: 481-490, 1988.
13. Anthes DL, Theriault E, Tator CH. Ultrastructural evidence for arterial vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurg* 39. 804-814, 1996.
14. 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.
15. Taoka Y, Okojima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56. 341-358, 1998
16. Braughler RW, Duncan LA. Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2: 269-283, 1985.

17. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurological disorders. *N Eng J Med* 330: 613-622, 1994.
18. 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 2)* 91: 200-204, 1999.
19. Choi DW. Calcium specific mediated neurotoxicity: Relationship to channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11. 465-469, 1988.
20. Choi DW: Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol* 23, 1261-1276, 1992.
21. Regan FR. The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: Comparison with cortical neurons. *Neuroscience Lett* 213: 9-12, 1996.
22. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory aminoacids as a final common pathway for neurological disorders. *N Eng J Med* 330: 613-622, 1994.
23. Ghimikor RS, Lee YL, He TR, Eng LF. Chemokine expression in rat stab wound brain injury. *J Neurosci Res* 1996; 46: 727-733. 79.
24. Anderson DK, Demediuk P. Spinal cord injury and protection. *Ann Emerg Med* 14: 816-821, 1985.
25. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*; 43, 1656-1665, 1993.
26. Dohrmann GJ: Experimental spinal cord trauma. *Arc Neurol*, 27: 468- 473, 1972
27. Grossman S, Wolfe BB, Yasuda RP, Wrathall JR: Alterations in AMPA receptor subunit expression after experimental spinal cord injury. *The journal of neuroscience* 19(14): 5711-5720, 1999.
28. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319-370, 1996.
29. Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, et al. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nature medicine* 4: 814-821, 1998.
30. Guillion D, Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol* 27: 33-42, 1990.
31. Dinarello, CA. (1998). Interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int. Rev. Immunol.* 16, 457-499.
32. Allan, S.M., and Rothwell, N.J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 734-744.
33. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2003; 46: 299-307

34. Holmin S, Mathiesen T, 2000. Intracerebral administration of interleukin-1 beta and induction of inflammation, apoptosis and vasogenic edema. *J. Neurosurg.* 92, 108-120.
35. Dinarello CA. Interleukin-1. In: Thomson AW, editor. *The Cytokine Handbook*. Third edn. Academic Press Limited; 1998. p. 35-73.
36. Pshenichkin SP, Szekely AM, Wise BC. Transcriptional and posttranscriptional mechanisms involved in the IL-1, steroid, and protein kinase C regulation of nerve growth factor in cortical astrocytes. *J Neurochem* 1994; 63: 419-428.
37. Sanderson KL, Raghupathi R, Saatman KE, Marin D, Miller G, McIntosh TK. Interleukin-1 receptor antagonist attenuates regional neuronal cell death and cognitive dysfunction after experimental brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 17: 1118-1125.
38. Bazzoni E, and Beutler B. (1996) *Neze Engl. I. Med.* 334, 1717-1725.
39. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, and Wallach D, (1989), *I. Biol Chem* 264;11974-11980.
40. Andreas Eigler, Bhanu Sinha, Gunther Hartmann and Stefan Endres, Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Review immunology today*, october 1997, Vol. 18, No: 10, 487-492.
41. Hausmann ON, Hu W-H, Keren-Raifman T, et al. Spinal cord injury induces expression of RGS7 in microglia/ macrophages in rats. *Eur J Neurosci* 2002 (in pres).
42. Bethea JR, Castro M, Keane RW, et al. Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappa B activation. *J Neurosci* 1998; 18: 3251-3260.
43. Cheng B, Christakos S, Mattson MP. Tumor necrosis factors protect against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron* 1994; 12: 139-153.
44. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, Zararsız İ, Ögetürk M, Sarsılmaz M. Sıçanlarda Sigara İnhalasyonu Sonucu Prefrontal Kortekste Oluşan Yapısal Değişiklikler Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester(Cape)' in Etkisi. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2004;13:18-25.
45. Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Aydınç M, Karaman A, Gültek A, Akyol O, Gürsoy MH, Aydın E. Caffeic acid phenethyl ester prevents intestinal reperfusion injury in rats. *J Pediatr Surg.* 1999;34:1458-1462.
46. SON S, LOBKOWSKY EB, LEWIS BA. Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Synthesis and X-Ray crystallographic analysis. *Chem Pharm Bull* 2001; 49: 236-38.
47. S. Lieberman, Y.Y. Lin, Reflections on sterol sidechain cleavage process catalyzed by cytochrome P450(scc), *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 78 (2001) 1-14.
48. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia.* 2002;73:21-29.

49. 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.
50. 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.
51. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319-370, 1996.
52. 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.
53. Barami K, Diaz F: Cellular transplantation and spinal cord injury. *Neurosurgery*, 47:691-700, 2000.
54. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ: Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacology*, 24 (5): 265-279, 2001.
55. Flamm E, Young W, Demopoulos H: Experimental Spinal Cord Injury Treatment With Naloxone. *Neurosurgery*, 10:227-231,1982.