

TC.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA
OZON'UN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gökhan GÜRKAN

Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr Murat SAYIN

İZMİR

TEMMUZ-2018

TC.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
ATATÜRK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA
OZON'UN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Gökhan GÜRKAN

Tez danışmanı: Yrd. Doç. Dr Murat SAYIN

Bu tez İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017-TDU-TIPF-0016 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

TEMMUZ-2018

TEZ ONAY SAYFASI

T.C.

**İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA OZON'UN
NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**TEZİ HAZIRLAYAN
Dr. Gökhan GÜRKAN**

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Uzmanlık Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma tarafımızca incelenerek her yönü ile “Tıpta Uzmanlık” tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Tez Danışmanı:

Üye:.....

Üye:

Üye:.....

Prof.Dr.....

Tıp Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve deneyimi ile bana ve tüm asistanlara yol gösteren, asistanların eğitimi için özveriyle çalışan, beyin cerrahisinin inceliklerini ve disiplinini kavramamda büyük yardımı olan, eğitimim için yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nurullah YÜCEER'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Spinal cerrahi teorik ve pratiğinde eğitimime kattığı yeniliklerden dolayı, uzmanlık eğitimim boyunca mesleki olsun veya olmasın her konuda desteğini esirgemeyen tez danışmanım Yrd.Doç. Dr. Murat SAYIN'a,

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi değerli uzman ve öğretim üyelerine, Op. Dr. Gönül GÜVENÇ'e, Op. Dr. İsmail Ertan SEVİN'e,

Asistanlığımın ilk yıllarında tanıştığım ve asistanlığımın her döneminde yardımlarını esirgemeyen fedakarca ve karşılıksız her zaman yanımda olacağına inandığım, yeni ve farklı vizyon kazanmamızda bir önder olan saygıdeğer abim Op. Dr. Ceren KIZMAZOĞLU'na,

Farklı şehirde olsa da desteğini ve yardımlarını esirgemeyen abim Yrd.Doç.Dr. Hasan Emre AYDIN'a,

Berber asistanlık yaptığımız, güzel günler geçirdiğimiz ve eğitimimde bana yardımcı olan başta abim Yrd.Doç. Dr. İsmail KAYA olmak üzere diğer tüm asistan abilerim ve arkadaşlarıma,

Asistanlık eğitimim boyunca bana yardımcı olan kliniğimizin ve ameliyathanemizin tüm değerli hemşire ve personellerine,

Üniversite ve asistanlık eğitimim boyunca her zaman yanımda olan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çocukluk arkadaşım, kardeşim Dr. Emin TAŞKIRAN'a,

Beni bugünlere getiren, verdikleri destekle her zaman yanımda olan sevgili annem Sebahat GÜRKAN, babam Aygün GÜRKAN ve canım kardeşim Gülşah GÜRKAN'a,

Fakülte ve uzmanlık eğitimim boyunca hep yanımda olan, sevgisi ve desteğiyle beni ayakta tutan, varlığıyla bugün ve daima bana güç veren sevgili eşim Dr. Ferda GÜRKAN'a

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

Dr. Gökhan GÜRKAN

İZMİR, 2018

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
TEŞEKKÜR	
KISALTMALAR	
ŞEKİL, GRAFİK VE RESİMLER DİZİNİ	
TABLolar	
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Omurilik Embriyolojisi ve Anatomisi	1
1.2. Omuriliğin Vasküler Yapısı	4
1.3. Omurilik Travmasının Tarihçesi	5
1.4. Omurilik Travması ile İlgili Araştırmalar	6
1.5. Omurilik Travmalarında Hasar Mekanizmaları	8
1.5.1. Primer Hasar Mekanizmaları	9
1.5.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları	10
1.6. Nöronal Plastisite ve Rejenerasyon	19
1.6.1. Nöronal Plastisite	19
1.6.2. Nöronal Rejenerasyon	19
1.7. Omurilik Yaralanmaları	20
1.7.1. Tam (komplet) Omurilik Yaralanması	21
1.7.2. Kısmi (inkomplet) Omurilik Yaralanması	21
1.8. Omurilik Hasarının Patolojisi	22
1.8.1. Akut Dönem	22
1.8.2. Subakut Dönem	23
1.8.3. Kronik Dönem	24
1.9. Omurilik Yaralanmasında Hasta Yönetimi	24
1.10. Omurilik Yaralanmasında Tanı	25
1.11. İnsan Omurilik Yaralanması ile Deneysel Modeller Arasındaki Benzerlikler ve Farklılıklar	25
1.12. Omurilik Travmasında Tedavi	26
1.12.1. Omurilik Travmasında Cerrahi Tedavi	26

1.12.2. Omurilik Travmasında Kök Hücre Tedavisi.....	27
1.12.3. Omurilik Travmasında Medikal Tedavi.....	27
1.12.4. Ozon.....	32

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER..... 39

2.1. Kullanılan Deneklerin Bakım Yeri ve Koşulları	39
2.2. Kullanılan Farmakolojik Ajanlar	39
2.3. Anestezi.....	39
2.4. Deney Grupları.....	39
2.5. Cerrahi İşlem.....	40
2.6. Deney Hayvanlarının Postoperatif İzlemleri	42
2.6.1. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu	43
2.7. Davranış Testi ve Fonksiyonel İyileşmenin Değerlendirilmesi.....	43
2.7.1. Inclined Plane Testi.....	44
2.7.2. Basso, Beattie, Bresnahan Skorlaması	44
2.7.3. Modifiye Tarlov Skalası.....	46
2.7.4. Drummond and Moore Kriterleri	46
2.8. Biyokimyasal Analizler	46
2.8.1. Tnf – α	47
2.8.2. IL – 6	47
2.8.3. IL - 1 β	48
2.8.4. Total Oksidan Status (TOS) Ölçümü	48
2.8.5. Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümü.....	49
2.9. Histopatolojik Değerlendirme.....	49
2.9.1. Doku Takiba, Gömme ve Bloklama.....	49
2.9.2. Kesit Alma	50
2.9.3. Hematoksilen Eosin (H.E.) Boyama	50
2.9.4. Cresyl Violet Boyama	51
2.9.5. İmmünohistokimya Prosedürü (Antikonneksin-43).....	52
2.9.6. TUNEL Tekniği ile Boyama.....	53
2.10. İstatistiksel Yöntem	55

3. BULGULAR	56
3.1. Davranış Testleri ve Fonksiyonel İyileşme Nörolojik Değerlendirme	
Testlerinin Sonuçları.....	56
3.1.1. Inclined Plane Test (IPT) sonuçları	59
3.1.2. Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) Skorlaması Sonuçları.....	59
3.1.3. Modifiye Tarlov Skalası Sonuçları	59
3.1.4. Drummond and Moore Kriterlerine Göre Sonuçlar	59
3.2. Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları.....	61
3.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	65
3.3.1. Grup 1 - Laminektomi Grubu	65
3.3.2. Grup 2 – Spinal kord hasarı grubu	65
3.3.3. Grup 3 -Spinal kord hasarı ve metilprednizolon verilen grup.....	65
3.3.4. Grup 4- Spinal kord hasarı ve ozon verilen grup	66
3.3.5. Grup 5 - Spinal kord hasarı sonrası metilprednizolon ve ozon verilen grup	66
3.4. Anti-konneksin 43 Boyama	69
3.5. TUNEL boyama.....	70
3.6. Yarı niceliksel Derecelendirme Skalası.....	72
4. TARTIŞMA	75
ÖZET.....	86
ABSTRACT	88
KAYNAKLAR	90

KISALTMALAR

5-HT	: Serotonin
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim
AMPA	: α -amino 3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid
ASIA	: Amerika spinal travma derneği
ATSL	: Amerikan cerrahi koleji travma programı ile yaşam desteği
BBB	: Basso, Beattie, Bresnahan
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
D&M	: Drummond and Moore
HBO	: Hiperbarik oksijen
H&E	: Hematoksilen eozin
IPT	: Inclined plane test
KA	: Kainite
MAG	: Myelin associated glikoprotein
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
NASCIS	: Ulusal akut spinal kord yaralanma çalışmaları
SSS	: Santral sinir sistemi
TTX	: Tetrodotoksin
TAS	: Total antioksidan status
TOS	: Total oksidan status
TRH	: Tirotropin releasing hormon
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidly transferase biotin-d UTP nick end Labeling

ŞEKİL, GRAFİK VE RESİMLER DİZİNİ

Şekil 1:	Nöral plaktan nöral tüp ve krista nöralis gelişmesi	1
Şekil 2:	İntrauterin 5½ haftada omuriliğin transvers kesiti	2
Şekil 3:	Spinal kord zarları	3
Şekil 4:	Omurilik arterleri.....	4
Şekil 5:	Omurilik yaralanma mekanizması	13
Şekil 6:	Brown Sequard Sendromu	21
Şekil 7:	Santral Kord Sendromu	22
Resim 1:	Yaşargil anevrizma klipi	41
Resim 2:	Operasyon bölgesinin traşı ve antisepsi sağlanması	41
Resim 3:	Laminektomi sonrası omuriliğin görünümü	42
Resim 4:	Omuriliğin anevrizma klipi ile klipajı	42
Resim 5:	Hasarlanmış omurilik bölgesinin disseke edilmiş hali	43
Resim 6:	H&E boyaması genel görünümü	67
Resim 7:	Crystal violet boyaması genel görünümü.	68
Resim 8:	Anti-Konneksin 43 immün boyaması.	70
Resim 9:	TUNEL boyaması	71
Grafik 1.	Gruplara ait TUNEL pozitif nöron sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.	71

TABLULAR

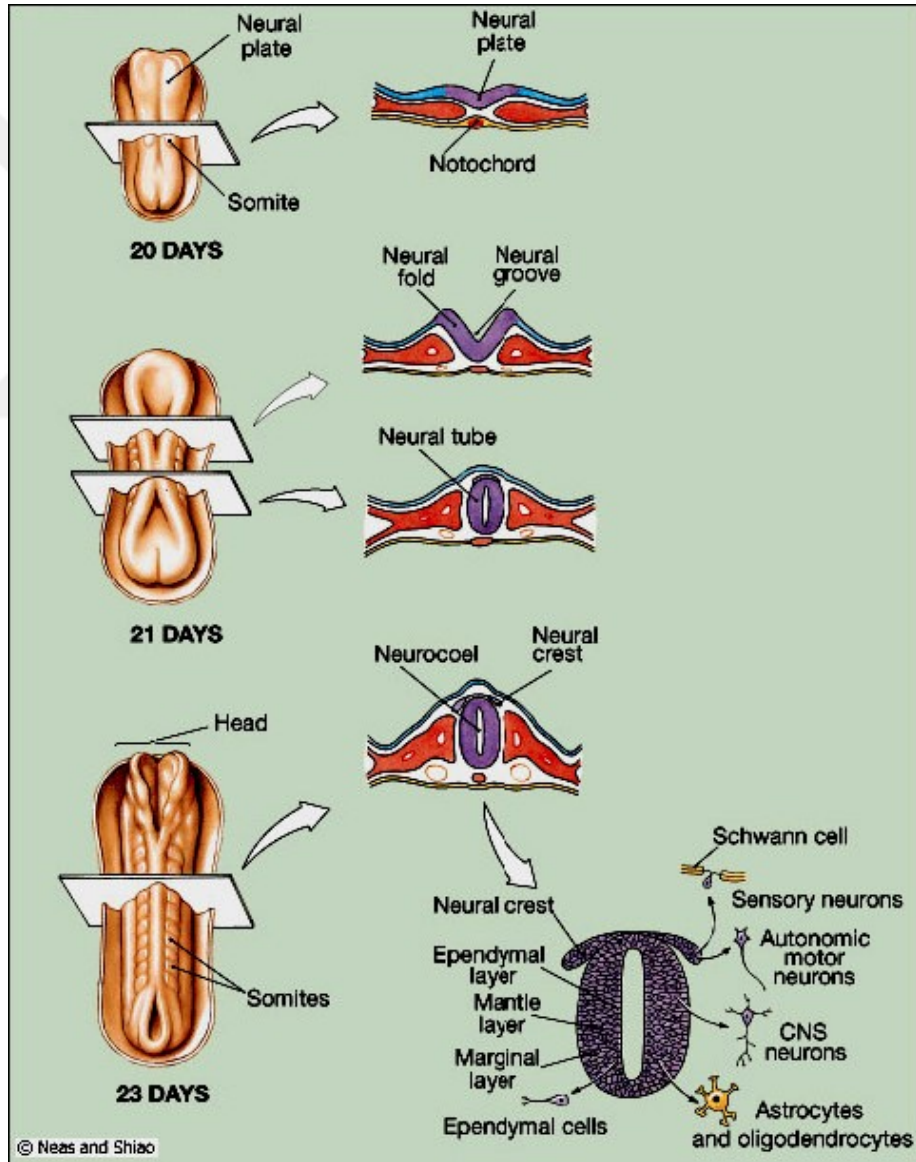
Tablo 1:	Omurilik yaralanma modellerinin tarihsel gelişimi	7
Tablo 2:	Deneysel omurilik yaralanma modelleri	8
Tablo 3:	Omurilik yaralanmasında primer hasar mekanizmaları	9
Tablo 4:	Sekonder hasar oluşumunda etkili olan mekanizmalar	12
Tablo 5:	Akut omurilik yaralanması patolojisi.....	23
Tablo 6:	Omurilik yaralanmasında kronik dönemde izlenen patolojik bulgular.....	24
Tablo 7:	İnsan ve kemirgenlerde omurilik yaralanmasında cevabın karşılaştırılması	26
Tablo 8:	Ozon gazının uygulama yolları	35
Tablo 9:	Lokal ve sistemik uygulamada ozonun tıbbi etkileri	36
Tablo 10:	Ozunun Kullanıldığı Çeşitli Hastalıklar ve Uygulama Şekilleri.....	37
Tablo 11:	BBB davranış değerlendirme skalası	45
Tablo 12:	Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 1.	56
Tablo 13:	Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 2	57
Tablo 14:	Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 3	57
Tablo 15:	Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 4	58
Tablo 16:	Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 5	58
Tablo 17:	2. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme	60
Tablo 18:	3. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme	60
Tablo 19:	4. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme	60
Tablo 20:	5. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme	61
Tablo 21:	Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 1	61
Tablo 22:	Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 2	61
Tablo 23:	Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 3	61
Tablo 24:	Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 4	62
Tablo 25:	Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 5	62
Tablo 26:	Grup 1 ile Grup 2 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	62
Tablo 27:	Grup 1 ile Grup 3 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	62
Tablo 28:	Grup 1 ile Grup 4 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	63

Tablo 29: Grup 1 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	63
Tablo 30: Grup 2 ile Grup 3 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	63
Tablo 31: Grup 2 ile Grup 4 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	63
Tablo 32: Grup 2 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	64
Tablo 33: Grup 3 ile Grup 4 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	64
Tablo 34: Grup 3 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	64
Tablo 35: Grup 4 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik.....	64
Tablo 36: Yarı niceliksel derecelendirme skalası.....	72
Tablo 37: Tüm grupların yarı niceliksel değerlendirme skalası sonuçları	73
Tablo 38: Grup 1 ile diğer gruplar karşılaştırıldığındaki istatistiksel sonuçlar	73
Tablo 39: Grup 2 ile Grup 3,4, 5 karşılaştırıldığındaki istatistiksel sonuçlar.....	73

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Omurilik Embriyolojisi ve Anatomisi

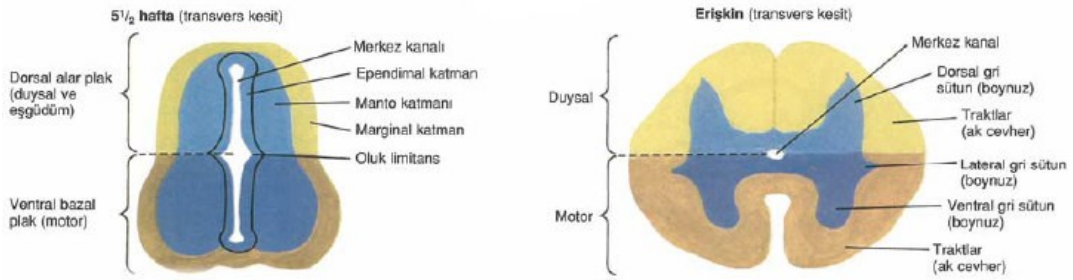
Sinir sistemi embriyonik dönemin 3. haftasında ektodermin kalınlaşmasıyla oluşur. Ektoderm altında yer alan notokord ve mezodermin indüklenmesiyle nöral plak oluşur. Nöral plaktan da nöral tüp ve krista nöralis gelişir (Şekil 1) (1).



Şekil 1: Nöral plaktan nöral tüp ve krista nöralis gelişmesi (1)

Nöral tüp, merkezi sinir sistemine yani omuriliğe ve beyne farklılaşırken, krista nöralis de periferik sinir sistemine dolayısıyla kranial, spinal sinir ve otonom gangliyonlara farklılaşır.

Nöral tüp, 4. haftada 4. somitler bölgesinde oluşur. Nöral plağın ve nöral tüpün kranial 2/3'ü beyni ve 1/3'ü ise omuriliği oluşturur. 9. ve 10. haftalarda nöral tüpün lateral duvarları ortada kanal kalana kadar kalınlaşır. Nöral tüpün duvarları çok katlı kolumnar epiteliumdan oluşur. Bu nöroepitel hücrelerden ventriküler zon (ependimal tabaka) gelişir. Nöroepitelyal hücrelerden daha sonra dışta marjinal zon gelişir. Bu zondan omuriliğin beyaz cevheri oluşur. Omurilik duvarında uzunlamasına oluşan sığ oluğa sulcus limitans adı verilir. Omurilik bu olukla birlikte ventral ve dorsal kısımlara ayrılır. Dorsal kısma alar plak (alar lamina), ventral kısma ise bazal plak (bazal lamina) denir. Alar plak kornu posteriodaki gri cevheri meydana getirir. Bazal plak kornu anterior ve kornu lateralisteki efferent nukleus gruplarını meydana getirir.



Şekil 2: İntrauterin 5½ haftada omuriliğin transvers kesiti(1)

Fetal hayatın 3.ayına kadar omurilik uzunluğu vertebral kolon uzunluğu kadarken, vertebralar omurilikten daha hızlı uzayarak 5. ayın sonunda omurilik sakrumun tabanında ve doğum sırasında yaklaşık L3 seviyesinde sonlanır (1).

Omurilik anatomik olarak foramen magnumdan başlar ve erişkinde L1 vertebraasının alt kenarı düzeyinde sonlanır. Vertebral kanalın üst 2/3 kısmında yer alır ve dura mater, arachnoidea mater ve pia mater isimli üç zar ile çevrilidir. Spinal kordu çevreleyen spatium subarachnoideumda bulunan beyin omurilik sıvısı (BOS) besleyicidir ve spinal kordu koruma görevi yapar(2).

Spinal kord servikal ve lomber bölgelerde iki adet genişleme gösterir. Bu genişlemeler intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbosakralis olarak adlandırılır. Alt seviyelerde spinal kord gittikçe incelik ve conus medullaris oluşturur. Conus medullaris'in tepesinden pia materin bir uzantısı aşağıya inerek coccyxin arka yüzüne yapışır ve filum terminale olarak isimlendirilir.

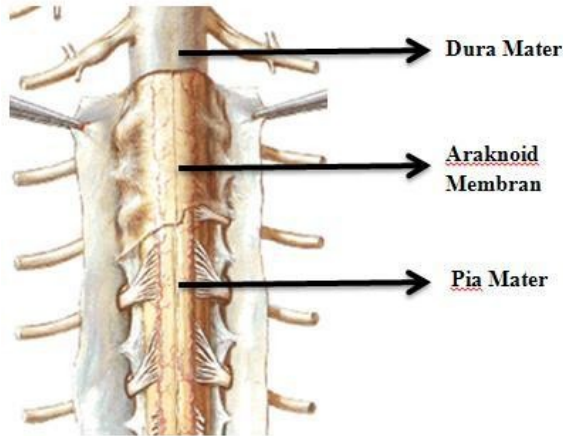
Spinal korda tüm uzunluğu boyunca radix anterior (motor) ve posterior (duysal) tarafından oluşturulan 31 adet spinal sinir tutunur.

Spinal kord gri maddeden yapılmış substantia grisea olarak adlandırılan bir iç kısım ile bunu çevreleyen substansia alba olarak adlandırılan dış tabakadan oluşmuştur. Substansia grisea sinir hücreleri ve uzantılara, nöroglia ve kan damarlarından oluşurken substansia alba ilaveten miyelinli sinir liflerinin daha fazla olması nedeniyle beyaz olarak görülür (2).

Dura mater, spinal kord çevreleyen fibröz yapıda sağlam bir zardır. Üst seviyede foramen magnum aracılığıyla devam eder ve S2 vertebranın alt kısmına kadar uzanarak filum terminalede sonlanır.

Arachnoidea mater, spinal kord saran ince ve geçirgen olmayan bir zardır. Pia materden BOS ile dolu bir boşluk olan spatium subarachnoideum ile ayrılır. Dura mater gibi filum terminale seviyesinde sonlanır.

Pia mater, spinal kord sıkıca saran vasküler bir zardır. Bilateral sinir kökleri arasında kalınlaşarak ligamentum denticulatumu oluşturur. Bu bağ laterale doğru uzanarak arachnoid ve duraya yapışır ve omuriliğin dural kılıfın ortasında asılı kalmasını sağlar (2).



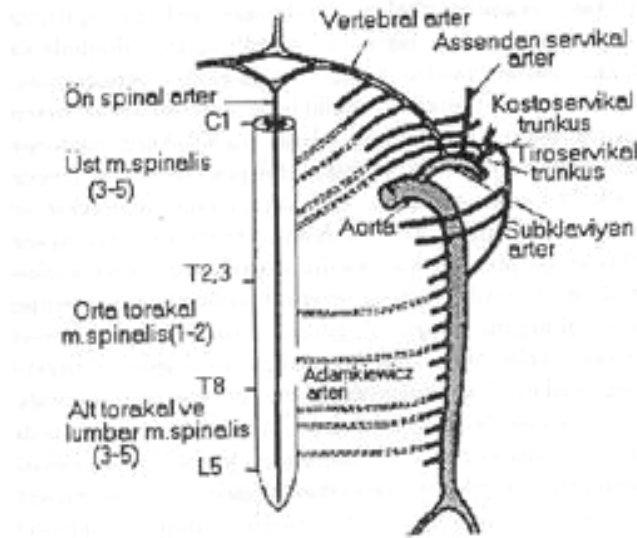
Şekil 3: Spinal kord zarları

1.2. Omuriliğin Vasküler Yapısı

Omurilik arteriyel kanını arteria spinalis anterior ve iki arteria spinalis posterior olmak üzere üç ince arterden alır. Posterior spinal arterler arteria vertebralislerden direkt olarak veya arteria inferior posterior cerebellilerden indirekt olarak çıkarak spinal kordun arka 1/3 kısmını beslerler. Anterior spinal arter kafatası içinde her iki taraftaki arteria vertebralislerden çıkan arterlerin birleşmesi ile oluşur ve omuriliğin ön 2/3 kısmını besler. Longitudinal olarak uzanan anterior ve posterior spinal arterler her bir intervertebral delikte küçük segmental arterlerle desteklenirler.

Bir diğer önemli besleyici arter olan arteria radicularis anterior magna (Adamkiewicz arteri) aortadan alt torasik veya üst lomber düzeylerden tek taraflı olarak çıkar ve çoğunlukla spinal korda sol taraftan girer. Spinal kordun T8 ve konus medullaris arasında kalan alt 2/3 kısmını besleyen ana kan kaynağıdır. Orta torakal bölge 'watershed zone' olarak adlandırılır ve beslenmesi nispeten daha azdır. Tek besleyicisi T4 ve T5 seviyesindeki radiküler arterler olduğundan dolayı bu bölge vasküler hasara daha yatkındır (3).

Omuriliğin venleri ise serebral venlere ve dural venöz sinüslere açılan 6 adet kıvrımlı longitudinal kanala drene olurlar (2).



Şekil 4: Omurilik arterleri (4)

1.3. Omurilik Travmasının Tarihçesi

Akut omurilik yaralanması yüzyıllardır bilinen patolojik bir durum olup, toplumları sosyal ve ekonomik açıdan derinden etkilemektedir. Omurilik yaralanmasında oluşan hasarı önleme ve iyileştirme konusunda halen etkin bir tedavinin bulunmamış olması ve evrensel bir tedavi protokolünün olmayışı bu patolojik durumu günümüzün en ciddi sağlık sorunlarından biri yapmıştır (5, 6).

Akut omurilik hasarı konusunda bilinen ilk yazılı belge Eski Mısır'da milattan önce 17. yüzyılda yazıldığı düşünülen papirüslerdir. 1930'da Breasted tarafından tercüme edilmiş olan "Edwin Smith" cerrahi papirüsünde omurilik yaralanmalarının medikal tarihçesine ilk kez rastlanmaktadır (7). Imhotep bu papirüste sözü edilen ilk cerrahdır ve Büyük Piramitlerin yapımı sırasında 48 travmanın altısında omurilik hasarı tespit etmiştir. Bu yüksek orandan dolayı omurilik travmaları üzerine çalışmalar yapılabilmektedir. Imhotep bu lezyonu anlatarak ligaman hasarına, vertebral subluksasyon ve dislokasyonu tanımlamış; kuadripleji ve paraplejilerden bahsetmiştir. Edwin Smith papirüsünde bulunan omurilik travması hakkındaki bilgiler yaklaşık 4500 yıl geçmiş olmasına rağmen geçerliliğini korumaktadır (8).

Yunanlı filozof Hipokrat (M.Ö. 460-377) vertebra dislokasyonuna eşlik eden ekstremitelerde paralizileri hakkında geniş bilgiler vermiş ve paraplejiyi tariflemiştir. Kırıkları redükte etmek için kendine özgü bir traksiyon cihazı geliştirmiştir (9).

Hayvan deneyleri ilk kez Galen (M.S.130-201) tarafından yapılmıştır. Kesilen medulla segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu göstermiştir (10). Omuriliğe boylamasına yapılan kesinin hasar oluşturmadığı aksine enine yapılan kesi sonucu motor ve duysal bozuklukların ortaya çıktığını söylemiştir. Böylece Hipokrat'ın lezyon seviyesinin altında motor ve duyu kaybının olduğu hipotezini yaptığı çalışmalarla doğrulamıştır (11).

Egeli Paulus (625-690) traksiyon ile omurilik hasarının önlenemeyeceğini düşünerek ilk kez laminektomi ve dekompresif cerrahi fikrini ortaya koymuştur (12).

1543'de yayınlanan kitabında Andreas Vesalius, insan sinir sistemi üzerine detaylı şekilde çizimler yapmıştır. 16. yüzyılda Fransız cerrah Pare, odundan bir düzeneğe kurmuş ve spinal dislokasyonları redükte etmeyi amaçlamıştır. Bu amaçla vertebra ve sinirleri öne itmeyi önermiştir.

1646'da Fabricius Hildanus, yumuşak dokular ve spinöz çıkıntılara bir çivi takıp klemp ile çekerek servikal fraktür ve dislokasyonlarda redüksiyon ve traksiyonu hedeflemiştir. 1762'de Louis, lomber bölgede paraplejiye yol açan metal bir fragmanı komplikasyonsuz olarak çıkartmış ve tam iyileşme bildirmiştir (12).

1.4. Omurilik Travması ile İlgili Araştırmalar

İlk fizyopatolojik çalışma 1890 yılında Schamus tarafından yapılabilmektedir. Schamus tahtalardan bir düzeneğe hazırlanmış ve tavşanların sırtına travma uygulamıştır. Travma sonrasında omurilik içindeki dejenerasyon ve kavitasyonları gözlemiştir (13).

1906'da Santiago Ramon Cajal, santral sinir sistemi yapısını tarif ederek Nobel ödülünü kazanmıştır.

1911'de Reginald Allen omurilik üzerine ağırlık düşürerek hasar oluşturma tekniğini anlatmıştır. Köpeklerde torakal laminektomi sonrası hayvanların dursunun üzerine dik açı ile bir tüp yerleştirmiş ve omurilik üzerine farklı miktarlarda ağırlıklar düşürerek farklı şiddette travmalar oluşturmuştur. Ağırlık düşürme modeli olarak bilinen bu modelde travma şiddeti yükseklik ile ağırlığın çarpımına eşittir. Bu modelin en büyük dezavantajı ise posterior kord kompresyonu oluşturmaktır. Oysa insanlarda anterior kord kompresyonu yaygındır. Yine de bu model insan omurilik yaralanmasının biyomekaniğini çok iyi taklit eden bir modeldir (14).

1943'de rehabilitasyon amacıyla Sir Ludwig Guttmann, Ulusal Stoke Mandeville Omurga Merkezi'ni açmıştır. Birinci Dünya Savaşı sırasında servikal omurilik hasarlarında %80 oranında 1-2 hafta içinde ölüm gerçekleşmekteyken bu merkezde yapılan özel programlarla birlikte bu grup hastalarda ilerleme kaydedilmiştir.

Tarlov 1953'de epidural aralıkta balon şişirerek omurilik yaralanması yaratmıştır.

1978 yılında Tator ve Rivlin tarafından geliştirilen klip kompresyon modelinde omurilik, çeşitli zaman aralıklarında farklı kapanma gücüne sahip anevrizma klipleri ile kliplenmekte ve değişik deviyelerde travma oluşturulmaktadır. Bu modelde istenilen şiddet miktarına göre klip kapanma gücü ve zamanı değiştirilerek travma maruziyeti oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak, aynı zamanda iskemi oluşturulmasıdır. Bu model insanlarda meydana gelen travma sonrası yaralanmaya benzer bir model teşkil etmektedir (15, 16).

Watson 1986'da lazer ile omurilik kesisi yapmıştır. Stokes ve Reider 1990'da omuriliğe yapılacak olan darbenin şiddet ve hızını önceden belirleyip darbenin sonunda ön görülen travmanın olup olmadığını denetleyen elektromekanik bir cihaz geliştirmişlerdir.

Tablo 1: Omurilik yaralanma modellerinin tarihsel gelişimi (17).

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

Omurilikte travma modellerinin bu kadar farklı tekniklerle uygulanması bunların standardize edilmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle Chung daha standart, daha ideal hayvan modeli oluşturulması için bazı kriterler önermiş ve Collins de buna atıfta bulunarak omurilik travması ve tedavi metodlarını gözden geçirmiştir (11).

Bahsedilen bu kriterler;

1. Oluşturulacak travma, doku hasarı ya da nöronal disfonksiyon, hayvandan hayvana değişmez şekilde yaratılabilmela, travma sonrası değerlendirilecek parametrelerdeki varyasyonlar kabul edilebilir sınırlarda olmalı, prelinik çalışma başlamadan önce bu sınırlar belirlenmelidir.

2. Hayvan modelindeki kaçınılmaz yan etkiler (cerrahi yaralanma, anestezi ajanlarının etkisi, metabolik ve hemodinamik değişiklikler) en aza indirgenmela, çalışma başlamadan olası etkiler tanımlanmalıdır.

3. Çalışmanın sonuçları tekrarlanabilir ve sayısal hale getirilebilir olmalıdır.

Tablo 2: Deneysel omurilik yaralanma modelleri (17)

A) Travmatik Yaralanma
1- Akut Kinetik Kompresyon Kaf Klip Balon Vertebral dislokasyon
2- Akut Statik Kompresyon Ağırlık uygulanması
3- Ağırlık Düşürme
4- Akselerasyon-deselerasyon
5- Distraksiyon
6- Transeksiyon parsiyel, komplet lazer, bistüri
B) Non-travmatik Yaralanma
1- İskemi Aort oklüzyonu Selektif arter ya da ven oklüzyonu
3- Tümör kompresyonu
3- Kimyasal

1.5. Omurilik Travmalarında Hasar Mekanizmaları

Omurilik hasarının patofizyolojisi en iyi 'bifazik yaralanma' olarak tanımlanmıştır (18). Bifazik yaralanma primer (direkt) ve sekonder (indirekt) olmak üzere iki mekanizma ile ortaya çıkmaktadır (19). Akut omurilik yaralanması sonrası gelişen nörolojik hasar, birincil mekanik yaralanma ile birlikte yaralanma sonrasında gelişen ikincil yaralanmayı izleyen nekroz ve daha

geç dönemde görülmeye başlayan apoptozise bağlıdır (20). Primer hasar mekanik etki ile ortaya çıkarken, sekonder hasar bir dizi biyokimyasal ve hücrel reaksiyonların primer hasar üzerine eklenmesiyle ortaya çıkar (21).

1.5.1. Primer Hasar Mekanizmaları

İlk yaralanma sonrasında kompresyon, kemik, intervertebral disk ve yabancı cisimlerin omurilikte oluşturdukları geri dönüşsüz, mekanik hasar primer hasar olarak adlandırılmaktadır. Yaralanma akson, kan damarları ve hücre membranlarının hasarına neden olan primer mekanik etki ile başlar. Omurilik yaralanması sonrası ilk 2 saat içerisinde aksonlarda travmatik yaralanma, gri cevher hemorajisi, hemorajik nekroz, mikroglial aktivasyon gibi histopatolojik bulgular görülür. Biyokimyasal olarak ise IL-1 β , TNF- α , IL-6 gibi akut faz reaktanlarının salınımı gerçekleşir (18).

Travma sonrası mekanik etki ile oluşan bu primer hasar genellikle fleksiyon, ekstansiyon, rotasyon, distraksiyon ve aksiyel yüklenme sonucu oluşur(18). Bu hasarı takiben omurilikte gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri sekonder hasar olarak adlandırılır ve omuriliğin daha fazla zarar görmesine dolayısıyla travma sonrası hücre ölümünün devam etmesine neden olmaktadır (22). Primer hasarın medikal veya cerrahi tedavisi olmadığından dolayı yapılan tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yöneliktir.

Primer yaralanmanın derecesine, yaralanmaya neden olan kuvvetin genliğine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına göre değişir (23). Omuriliğin uzun süre bası altında kalmasa, nörolojik hasarın artmasına ve doğal olarak prognozun daha kötü olmasına neden olur.

Tablo 3: Omurilik yaralanmasında primer hasar mekanizmaları (24)

Mekanik Güç	Hasar Mekanizması
Darbe ve kalıcı kompresyon	Patlama fraktürü, fraktür-dislokasyon
Darbe ve geçici kompresyon	Hiperekstansiyon
Distraksiyon	Hiperfleksiyon
Laserasyon, transeksiyon	Patlama fraktürü, laminal fraktür, ateşli silah yaralanması

1.5.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları

Primer mekanik travmanın tetiklediği patofizyolojik olaylar uzamış sekonder hasar fazı ile devam eder. Sekonder hasar primer olaydan dakikalar, saatler sonra meydana gelen ve mekanizması tam olarak aydınlatılamamış patofizyolojik olaylar zinciridir. Primer hasar sonrası gelişen ödem, iskema, membran hasara, hücre içi kalsiyum artışa, eksitatör aminoasit ve serbest radikallerin ortaya çıkması sonucu; vasküler, elektrolit, biyokimyasal, enerji metabolizmasındaki değişikliklere bağlı patolojik hasar mekanizmaları devreye girer. Primer hasar sonrası gelişen bu olaylar doğrudan ve dolaylı etkileri ile ikincil hasarı oluşturur. Omurilik yaralanmasının tedavisinde amaç ikincil hasarın gelişimini önlemektir (25).

Bu nedenle son dönemde yapılan deneysel çalışmalarda bu sekonder yaralanmanın önüne geçebilecek medikal tedaviler üzerinde durulmaya başlanmıştır (26).

Akut yaralanma sonrası ilk 15 dakikada gri maddede peteşiyal kanamalar, beyaz maddede ödem oluşur. 2-4 saatte gri maddedeki kanamalar artar ve ödem meydana gelir. Zamanla patolojik değişiklikler kötüleşir ve yaralanmadan 6 gün sonar ileri derecede nekrozun olduğu gösterilmiştir (27).

1978'de Nemecek, ışık mikroskopunda yaralanmış dokudaki intravasküler trombusları göstermiş ve bu ciddi nekrozu "otodestruksiyon" olarak tanımlamıştır (28).

Omurilik yaralanmasında sekonder hasar mekanizmaları birbiriyle ilişkilidir ve birbirini tetikleyen dört ana teoride toplanmıştır:

-Serbest oksijen radikalleri teorisi: İskemik dokuda fazla miktarda biriken radikaller ve onların ürünleri doku hasarının ilerlemesine sebep olurlar.

-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.

-Opiat reseptör teorisi: Naloxone gibi opiat reseptör blokörleri nörolojik iyileşmeyi hızlandırır.

-Enflamasyon teorisi: Lipid enflamasyon mediatörleri ve diğer sitokinler lezyon sahasında birikirler ve takiben makrofaj ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonuna neden olurlar.

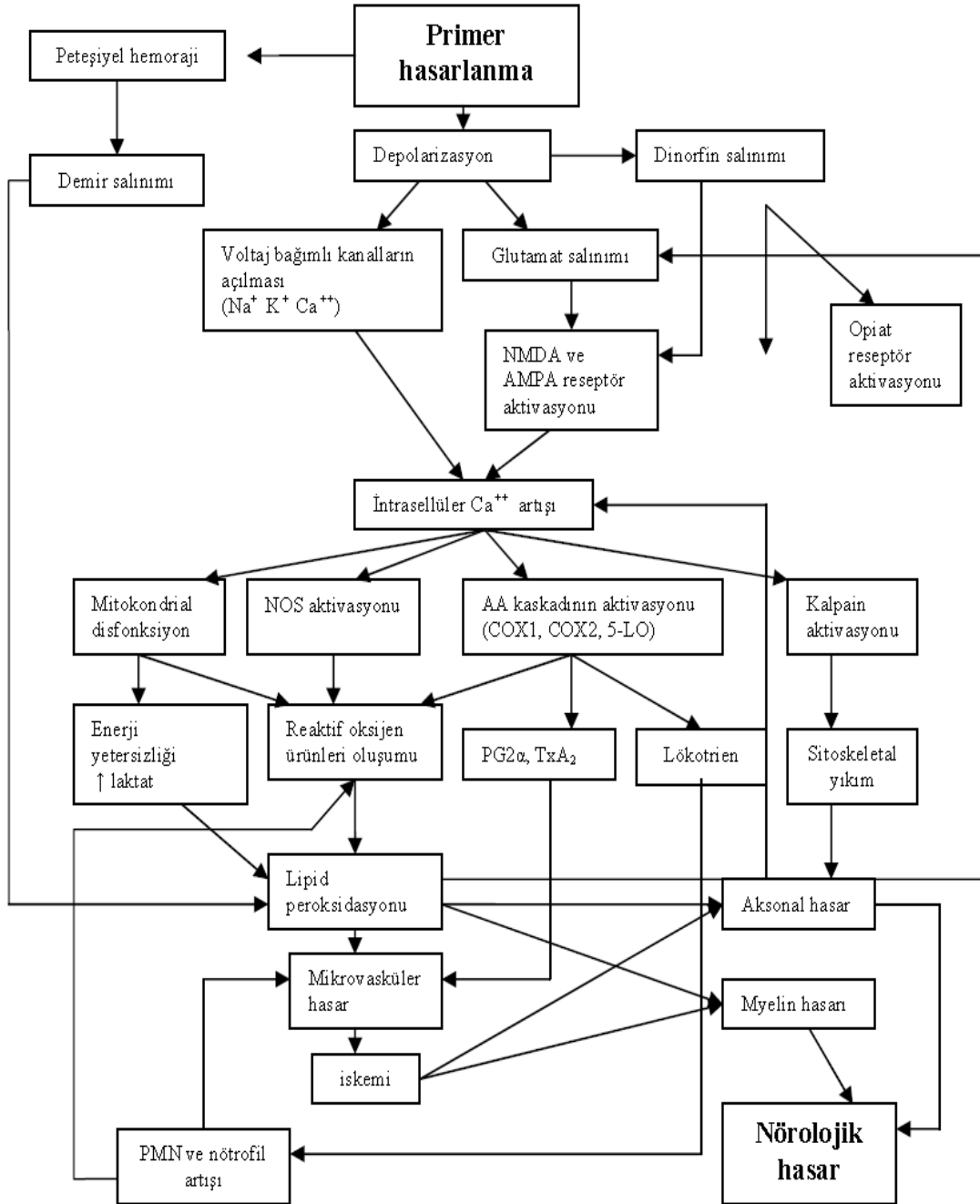
Bu teoriler göz önüne alındığında omurilik yaralanmalarında nöroprotektör etkisi olabileceği düşünülen pek çok madde denenmiştir. Kortikosteroidler (metilprednizolon), gangliozidler, aminosteroidler, opioid reseptör antagonistlere, eksitatör aminoasit antagonistlere, kalsiyum, sodyum, potasyum kanal blokerlere, antioksidanlar ve serbest radikal yakalayıcılar, antiinflamatuvar ajanlar, nörotransmitter reseptör antagonistlere, nörotrofik faktörler, nötralizan antikorlar, melatonin, hiperbairk oksijen omurilik yaralanmalarında kullanılmıştır.

Bu sayılanlar arasında sadece metilprednizolon klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmıştır ve halen kullanılmaktadır.

Sekonder yaralanma kaskadının içeriğinde ise artmış glutamat seviyesi, eksitotoksisite, oksidatif hasar, iskema, nitrik oksidin Ca^{++} 'a bağlı üretime, hücrel membranlarda serbest radikal hasarı ve lipit peroksidasyonu yer alır (29).

Tablo 4: Sekonder hasar oluşumunda etkili olan mekanizmalar

Sistemik Etkiler(Nörojenik şok)
Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi Kan basıncında kısa süreli artış, sonra uzun sürelihipotansiyon Periferik dirençteazalma Kardiak debide azalma
Omurilik Dolaşımında Lokal Vasküler Hasar
Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma Özellikle gri cevherde hemoraji Mikrodolaşımda kayıp:mekanik, tromboz, vazospazm
Biyokimyasal Değişiklikler
Serbest radikal üretimi Lipid peroksidasyonu Eksitotoksitite: glutamat Nörotransmitter birikimi Ketakolaminler-noradrenalin, dopamine, araşidonik asit salınması Eikazanoid üretimi Prostaglandinler Endojen opioidler Sitokinler
Elektrolit
İntasellüler kalsiyumda artış Ekstrasellüler potasyumda artış İntasellüler sodyumda artış
Yangısal Yanıt
Serbest Radikal üretimi Makrofajlar Aksonal Yıkım, Miyelin Artıklarının Salınımı Sitokinlerin Salınması Glial hücre aktivasyonu Oligodendritsitlerde sitotoksik etkiler Wallerian dejenerasyon
Ödem
Apoptozis
Enerji metabolizmasında kayıp
ATP üretiminde azalma



Şekil 5: Omurilik yaralanma mekanizması (30)

1.5.2.1. Sistemik etkiler

Akut omurilik yaralanması sistemik etkileri nörojenik şok ve respiratuar yetmezlik şeklinde göstermektedir. Nörojenik şok, vasomotor uyarı sonrasında gelişen ciddi paralizinin neden olduğu yetersiz doku perfüzyonu olarak tarif edilmektedir. Bu tablo kardiak output depresyonu, hipotansiyon ve bradikardi ile

karakterizedir. Bu etkiler ise sempatik tonus azalması ve artan vagal tonusa bağlı miyokardiyal fonksiyon bozulması ile ilişkilidir. Ancak nörojenik şok tablosu tedavi edilmez ise nöral doku hasarını şiddetlendirir (6, 31). Oluşan şok meydana gelen travmanın seviyesi ile de ilişkilidir. Özellikle servikal düzeyde meydana gelen omurilik yaralanmalarında ciddi nörojenik şok tablosu meydana gelebilmektedir (32). Omurilik yaralanmasında nörojenik şokun nedena, sempatik tonusun azalması ve vagusun anormal kardiyak etkisi ile bradikardi gelişmesidir (33). Travmatik spinal kordun otheregölasyonu kaybetmesi nedeniyle oluşan sistemik hipotansiyon, posttravmatik iskemiye şiddetlendirmekte ve bu yüzden hemen tedavi edilmelidir. Ancak intramedüller hiperemi ve hemorajiden kaçınmak amacıyla kan basıncı, normotansif seviyelerde tutulmalıdır (34).

1.5.2.2. Lokal vasküler etkiler ve spinal iskemi

Lokal etkiler hasarlı omurilik segmentinde otheregölasyon kaybı, hem gri hem beyaz cevherde hemorajik görünüm ve komşu bölgelerde mikrosirkülasyonda belirgin azalma olarak kendini gösterir (27). Akut omurilik yaralanmasında erken ve geç evrelerde vasküler hasara bağlı ciddi değişiklikler oluşmaktadır. Tüm modellerde ve insan omurilik yaralanmasında en sık gözlenen etka, özellikle gri cevherde olmak üzere omuriliğin santralinde görülen hemorajidir. Mekanik darbenin ilk etkileri olarak küçük damar yapılarında yırtılmalar olur ve hemorajide progresyon görülür. Nadiren de olsa geniş damar yaralanmaları gözlene de bu damarlar genelde direkt travmadan kurtulurlar (35, 36). Omurilik yaralanması sonrasında venül ve kapiller akım bozulur. Bu mikrosirkülasyon bozukluğu direkt mekanik etkiye bağlı olarak vazospazma neden olur, bu vazospazmda katekolaminler, glutamat ve prostaglandinler gibi mediatörler de rol alır (35).

Nöronların iskemiye dayanıksızlığının temelinde glutamat sorumlu tutulmaktadır. Glutamat reseptör aktivasyonu önce Na⁺ u hücre içine toplayarak sitotoksik ödeme neden olur. Sonrasında hücre içine Ca⁺⁺ toplanması ile nöronal harabiyet olur. Kalsiyum bağımlı proteaz aktivasyonu ile daha fazla hasar ortaya çıkar (27).

Sekonder hasarda önemli rol oynadığı düşünülen posttravmatik iskemi konsepti, geri dönüşlü ve tedavi edilebilirdir. Bu durum büyük önem taşımaktadır.

Omuriliğin değişen kan basınçlarında omurilik kan akımını sabit tutmasına otheregölasyon denir. Spinal şok durumunda otheregölasyonun bozulması ile perfüzyon basıncı düşer ve gerekli miktarlarda oksijen ve metabolit taşınmaz. Bu da omuriliğin olumsuz yönde etkilenmesine neden olur (27).

1.5.2.3. Biyokimyasal etkiler

Akut omurilik yaralanmasında biyokimyasal bozukluklar ve eşlik eden sıvı elektrolit bozuklukları önemli rol oynamaktadır. Eksitator nörotransmitterlerin salınarak birikmesi spinal kord dokusuna direkt hasar verir (30).

Eksitator aminoasitler L-Glutamik asit ve L-Aspartik asit iken, inhibitor aminoasitler GABA, Glisin, Taurin, Prolin ve Alanin dir. Glutamat santral sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteridir (6).

Omurilik yaralanmasını takiben dakikalar içinde glutamat salınımının arttığı gösterilmiştir. Glutamatın duysal iletimin sağlanmasında, ayrıca motor aktivite, hafıza, öğrenme ve spinal reflekslerin düzenlenmesi gibi birçok fonksiyonda rol aldığı düşünülmektedir (37).

Aspartatın da spinal korda eksitator ara nöronlarda iletilmesi, motor ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol alması muhtemeldir (37).

Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu nöronal hasara yol açtığı için birçok nörolojik hastalıkta doku hasarını artırdığı düşünülmektedir (38).

Glutamat reseptör aktivasyonu; bir dizi hücre içi olayı başlatarak proteaz ve lipaz gibi enzimlerin aktivasyonuna yol açar. Bu aktivasyon hücre membran ve nöroflaman hasarına neden olur (39).

Eksitotoksisite; özellikle NMDA reseptörleri tarafından yönetilen, en sonunda nöronal ölüme yol açan, lipid peroksidasyonu, Na-K ATPaz aktivasyon inhibisyonu, membran sodyum kanallarının inaktivasyonu, mitokondri solunum zinciri enzim inhibisyonu, gliseraldehit 3P dehidrogenaz inaktivasyonu ve

önemli proteinlerin diğer oksidatif modifikasyonları gibi mekanizmalara neden olan kompleks olayları başlatmaktadır (31).

Omurilik yaralanmasında Glutamat antagonistleri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. NMDA reseptör antagonistlerine yönelik yapılan çalışmalarda omurilik hasarında histolojik ve klinik iyileşmeye neden oldukları gösterilmiştir (38).

Araşidonik asit, eikosanoid ve prostoglandinlerin travma sonrası aşırı üretime, lipid peroksidasyonuna neden olur ve serbest oksijen radikallerinin açığa çıkmasına yol açarak hücre hasarının gelişmesine neden olur (33).

1.5.2.4. Elektrolit dengesizlikleri

SSS (santral sinir sistemi)'nde yaralanmayı takiben nöronal dejenerasyonun patogeneğinde Ca^{++} 'a karşı oluşan membran geçirgenliğindeki değişiklikler önemli rol oynar (40). İntraselüler Ca^{++} artışı proteazların, endonükleazların aktivasyonuna; apoptoz, nekroz, mitokondrial hasar ve asidoza öncülük eder ve artmış Serbest Radikal üretimi aksonal yaralanmaya neden olur (33). Kalsiyumun travma sonrası hücre içine girişi 3 yolla olur:

- Hasar görmüş olan hücre membranından
- Voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından
- Glutamat ile aktive olan kalsiyum kanallarından.

Kalsiyumun hücre içine girişi nörotoksisiteyi tetikler. Hücre içinde aşırı biriken kalsiyum litik enzimlerin aktivasyonuna neden olan yolları tetikler ve hücre hasarı meydana gelir (41).

Omurilik travmasında elektrolit konsantrasyonundaki anormallikler ile gradient değişiklikleri olduğu görülmüştür. Hücre içine Na^{+} 'un girmesi K^{+} konsantrasyonunun değişmesine ve böylece aksonal iletimin durmasına neden olduğu gösterilmiştir (33).

Sodyuma bağlı hücre yaralanmasının potansiyel mekanizmaları;

- Sitotoksik ödem indüksiyonu,
- İntraselüler fosfolipaz aktivitesinin stimülasyonu,
- Na^{+}/H^{+} kapısı yolu ile intraselüler asidoz

-Na⁺/Ca⁺ değiştiricisinin ters çalışması ile intraselluler Ca⁺⁺ artışı

1.5.2.5. Serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu

Serbest radikaller dış yörüngelerinde fazladan bir çiftlenmemiş elektron bulunduran moleküllerdir (42). Elektronlar dış yörüngelerinde çiftler halinde bulduklarında daha kararlı bir yapıya sahipken, eksik elektronlu moleküller kararlı değildir ve kolayca elektron alış verişinde bulunup başka moleküller ile reaksiyona girebilirler. Serbest oksijen radikalleri çok reaktiftir. Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun; yaşlanma, diyabet, katarakt gibi hastalık patogenezinde önemli rol oynadıkları yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (43).

Serbest radikaller normal koşullarda mitokondiride oluşur ve antioksidan sistemler ile zararlı etkileri engellenir. Hücrenin maruz kaldığı iskemi ve bunu takip eden reperfüzyon esnasındaki serbest oksijen radikali artışı karşısında, endojen antioksidanlar, serbest oksijen radikal temizleyicileri ve peroksidazlar yetersiz kalmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir(44).

Serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipidlerdir. Yüksek oranda poliansatüre yağ asitleri içeren hücre membranının yıkılması, serbest radikallere bağlı nöronal hasar oluşmasının en önemli aşamasıdır (45).

Serbest yağ asitleri serbest radikal ile okside olunca lipid peroksidasyonu adını alır ve lipid peroksidasyonu ilk kez başladığında, demir özellikle lipid hidroperoksitleri oluşumunda önemli rol oynar (44). Omurilik yaralanması sonrasında kanamayı takiben demir açığa çıkar ve serbest demir ile demir şelatları serbest radikal oluşumunda etkili olur. Membran fosfolipidleri okside olunca membran parçalanır ve hücre ölür. Ayrıca serbest oksijen radikalleri endotel hasarı yaratarak kan omurilik bariyerinin bozulmasına neden olurlar (46).

1.5.2.6. Ödem

Omurilik yaralanma mekanizmasında ödemin tek başına bir sebep mi yoksa yaralanmanın sonucu mu olduğu tam netlik kazanmasa da travma

sonrasında ciddi ve progresif bir ödemin varlığı kaçınılmazdır. İskemi ile birlikte sodyum hücre içinde artarak sitotoksik ödeme neden olur. Ödem, travma sahasının çevresinde de görülür (33).

1.5.2.7. Apoptoz

Apoptotik hücre ölümü indüklenebilir hücreler tarafından spesifik indükleyici bir uyarana ile regüle edilen fizyolojik ve programlanmış hücre ölümüdür.

Apoptozis, genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir.

SSS'de apoptozis, hem nöronları hem de glial hücreleri etkiler. Glutamat, kalsiyum iyonları, serbest radikaller, fas bağımlı protein faktörleri ve hücreler tarafından salınan sitokinler apoptozisin oluşumundan sorumludur (47).

Apoptozis sırasında nukleusta kromatin kümeleşmesi, çekirdekte büzülme ve DNA fragmentasyonu olur. Membran ve organel yapıları korunur. Histolojik tanıda DNA fragmentasyonunu göstermek amacıyla TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling) boyaması kullanılır (48).

Apoptozis, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasını ve sinir sisteminin sürekliliğini sağlamak amacıyla inflamasyonu başlatmadan hücreyi ortadan kaldırdığından dolayı önemli bir rol oynar (48).

1.5.2.8. İnflamasyon

Yaralanma sonrası doku tamirinde lökositlerin aktiviteleri başlar ve fagositoz ile hücresel debris kaldırılır. Yaralı bölgede enzimler salgılayarak hücrelerin proliferasyonlarını yönlendiren sitokinleri salgırlar (49).

Yaralanmayı takiben lezyon içine aktive astrositler ve microglial hücreler göç ederler. Makrofajlar ve mikroglia sitokinlerin salınımı (TNF, IL-1, IL-6, IL-10) ile sekonder patolojik ve inflamatuvar yanıtta rol alırlar.

İnflamasyonun spinal kord yaralanması sonrası hem nörokonstrüktif hem de nörodestriktif işlemlere yardımcı olduğuna inanılır.

IL-1 β inflamasyonun major mediyatörüdür ve omurilik yaralanmasından sonra lezyon bölgesinde artarken IL-10 potent bir antiinflamatuvar sitokindir. IL-10'un TNF üretimini azalttığı ve omurilik yaralanması sonrasında monositler ve immün hücreler üzerinde inhibitor etki yaptığı görülmüştür. IL-10 nöroprotektiftir ve motor fonksiyonu iyileştirir (41, 50).

1.6. Nöronal Plastisite ve Rejenerasyon

Kısa bir süre öncesine kadar hasar görmüş insan sinir dokusunun kendini tamir etme kapasitesinin hiç olmadığına ve hasar görmüş dokunun fonksiyonlarının yerine bir daha gelmeyeceğine inanılırdı. Günümüzde ise nörobilim alanındaki çalışmalar bu düşüncenin aksine sonuçlar ortaya çıkarmaktadır. Bu konuda nöronal plastisite ve rejenerasyon terimleri önemlidir.

1.6.1. Nöronal Plastisite

Nöronal plastisite sinir sisteminin uyumunu ifade eder. Nöronal plastisite, gelişmesini sürdüren immatür sinir sistemi dokuları için varsayılmakla birlikte, yaşam boyunca da bazı durumlarda belirli oranlarda görülebilmektedir. Plastisite hasar etkisinin azaltılmasında ve iyileşmede rol oynadığı gibi yapısal yeniden düzenlemelerle birlikte fonksiyon seviyesindeki değişimler ile de kendini gösterebilir ve buna fonksiyonel plastisite denir (51).

1.6.2. Nöronal Rejenerasyon

Nöronal rejenerasyon herhangi bir nedenle hasarlanmış ve fonksiyon kaybına uğramış sinir dokusunun bu hasarlanma sürecinde kendini tamir etme işlemini ifade eder. SSS dokusunda meydana gelen hasar, santral nöronların aksonal rejenerasyon yapamadıklarından dolayı geri dönüşümsüz ve şiddetlidir. Her ne kadar zedelenmiş akson kökünde bazı kısa oluşumlar filizlenebilse de çok

az olguda bu filizlenme fonksiyonel iyileşme sağlamaktadır. Monoaminerjik ve miyelinize olmamış kolinerjik santral sinir sistemi aksonlarının rejenere olduğu, fetal monoaminerjik nöral greftlerin yetişkin alıcı beyin merkezlerinde muhtemelen bağımsız olarak yaşayabildikleri ve denerve olmuş hedefleri yeniden innerve ederek fonksiyonu tekrar sağlayabildikleri gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada, periferik sinir implantasyon tekniği kullanılarak santral sinir sistemine yerleştirilen bir periferik sinir kökünde santral aksonal sistemlerinin aktif bir şekilde büyüdüğü gösterilmiştir(52).

Nöronal gelişmenin erken safhalarında ekstrasellüler matriks den salınan ve aksonal büyümeyi destekleyen bazı proteinler yetişkin memelilerin periferik sinir dokularında bulunmalarına rağmen beyin ve omurilikte bulunmamaktadır. Böylece aksonal rejenerasyon yetişkin SSS dokusunda mümkün olmaz (53). Matür SSS'nde büyümeyi hızlandıran ve destekleyen proteinlerin eksik olmasının yanı sıra aksonal büyümeyi inhibe eden moleküllere de rastlanmaktadır ve bu moleküller oligodendrositlerden salgılanır. Dahası farelerde bu inhibitör moleküllere karşı gelişen antikorların aksonal rejenerasyonu uyarıcı etki yaptıkları gösterilmiştir.

Hasarlı SSS dokusunun çevresi astrositlerin oluşturduğu glial skar dokusu ile çevrenmekte ve doku bizzat kendisi aksonal rejenerasyonu engellemektedir. Bu astrositler yalnızca olgun astrositlerdir.

Bu anlatılan mekanizmalar, gelişim sırasında aksonal büyümeyi destekleyen moleküllerin ortadan kaybolması ve inhibitör moleküllerin ortaya çıkması ile neden santral nöronların rejenerasyon kapasitesini kaybettiklerini açıklayabilmektedir (52).

1.7. Omurilik Yaralanmaları

Omurilik hasarına bağlı oluşan lezyonun alt seviyesinde hiçbir duyu veya motor fonksiyon yoksa tam kesa, az da olsa duyu veya motor fonksiyon varsa kısmi kesi olarak adlandırılır.

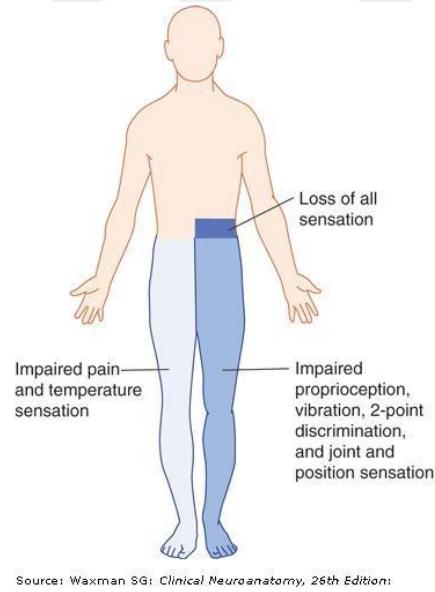
1.7.1. Tam (komplet) Omurilik Yaralanması

Omurilik travmasının 3 veya daha fazla segment üstünde hiçbir duyu ve motor fonksiyonun korunmaması olarak tanımlanır. Bulguların 24 saatten fazla devam etmesi hiçbir distal fonksiyonun geri gelmeyeceğinin işaretidir (54).

1.7.2. Kısmi (inkomplet) Omurilik Yaralanması

Kısmi omurilik yaralanması Brown Sequart, Santral kord, Anterior kord ve posterior kord sendromu olmak üzere karşımıza çıkar (54).

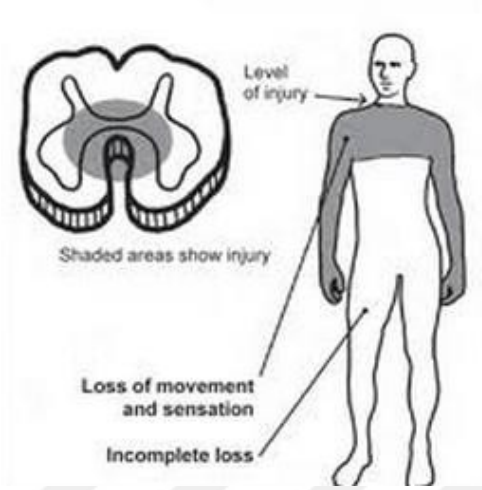
Brown Sequart sendromu; omuriliğin hemilateral lezyonları sonucu oluşur. Lezyon seviyesi altında karşı tarafta ağrı, ısı kaybı ve değişken derecede idrar, gaita inkontinansı oluşurken aynı tarafta derin duyu, propriosepsiyon, vibrasyon, iki nokta diskriminasyon hissi kaybı ile birlikte motor paralizisi görülür (Şekil 6).



Şekil 6: Brown Sequart Sendromu (55)

Santral kord sendromu; kısmi omurilik yaralanmalarının en sık görülen şeklidir. Lezyon seviyesinin altında üst ekstremitelerde daha belirgin olmak üzere tüm ekstremitelerde motor deficit görülür. Üst ekstremitelerde ağrı, ısı duyusu kaybı

görülür. Sfinkter disfonksiyonu ve %7 oranında Lhermitte bulgusu vardır. İyileşme süreci distalden proksimale doğrudur (54) (Şekil 7)



Şekil 7: Santral Kord Sendromu

Anterior kord sendromu; anterior spinal arterin beslediği kordun ön kısmındaki lezyonlara bağlı bu bölgede gelişen spinal kord enfarktıdır. Klinik olarak parapleji veya C7 seviyesi üzerinde ise tetrapleji ve bilateral ağrı, ısı kaybı ile karşımıza çıkar. Kısmi omurilik yaralanmaları içinde en kötü prognoza sahip olanıdır (54).

1.8. Omurilik Hasarının Patolojisi

Akut omurilik yaralanmasında meydana gelen patolojik değişikliklerin çoğu yapılan deneysel çalışmalardan elde edilmektedir. Ancak klinik ve deneysel çalışmalardaki patolojik değişikliklerin arasındaki benzerlik çok belirgindir (33).

1.8.1. Akut Dönem

Makroskobik olarak vertebral kolon etrafındaki yumuşak doku hemorajiktir. Kırık görünür durumdadır. Ekstradural boşluklarda kan görünür. Kord etrafındaki subaraknoid boşluklarda da kan görülebilir (56).

Mikroskopik olarak yaralanmanın fazına göre değişmekle birlikte travma ile başlayan birkaç günü içerir. Histolojik görüntüde ödem, aksonal şişme, kanama görülür. Kan akımı azalır, iskemik nekroz oluşur (56).

Travmayı takiben 15 dakika içinde gri cevherde peteşiyel kanamalar, beyaz cevherde ödem olur. İkinci saat içerisinde gri cevher kanaması artar, 8. saatten sonra beyaz cevhere yayılmaya başlar. 8-24 saatler arasında hemodinamik bozukluk ve nekroz ışık mikroskobu ile incelenebilir düzeyde olmuştur (14).

Yaralanmadan 12 saat sonra lezyon alanı büyümüştür ve lezyon çevresindeki sağlam hücreler morfolojik bütünlüklerini kaybederler (57).

Tablo 5: Akut omurilik yaralanması patolojisi

Santralhemoraji:Kapiller,venüllervearteriollerdenözelliklegricevheriçine
Hematomyeli
Uzak kanamalar- özellikle venöz
Santral hemorajik nekroz
Post travmatik infarkt
Subaraknoidkanama
Subdural veya ekstradural kanamalar-nadir
Ödem: lokal, genişleyen
Aksonalhasar:transeksiyon,aksolemmarüptürü,şişme,devaksonlar, organel kümelenmesi
Myelin kılıf hasarı: rüptür, veziküler ayrılma , periaksonal boşluklar
İnflamasyon:Makrofajlar, mikroglia

1.8.2. Subakut Dönem

Omurilik yaralanmasından sonra 8. Günde akut dönem değişlikleri azalmaya başlar, ödem azalır, küçük kanamalar rezorbe olur. Büyük kanamalar organizasyon ile giderilmeye çalışılır ve rekanalizasyon izlenir (58).

Ortamda lipid ve hemosiderin yüklü makrofajlar mevcuttur. Astrositik yanıt yaralanmadan 14 gün sonar maksimum düzeye ulaşır (58).

Aksonal bağlantı kesilmiş ise nöronda ‘santral kromatolizis’ görülür. Aksonda kesi olduğunda distal kısımda Wallerian dejenerasyon meydana gelir.

Yaralanmanın başlangıcında ödemli olan omurilik onarım sonuna doğru inceler ve atrofik bir hal alır. Deneysel çalışmalarda rejenerasyonun üç yıla kadar yavaş bir şekilde devam ettiği gösterilmiştir (58).

1.8.3. Kronik Dönem

Travma sonrası 6 ay ve daha geç dönemde izlenen değişikliklerdir. Yaralanma bölgesinde omurilik üzerinde dura ve araknoid zar kalınlaşmıştır. Meningeal zar duraya yapışıklık göstermiştir. Omurilik makroskopik düzeyde küçülmüştür ve sert kıvamlıdır. Skar dokusunun yanı sıra bazı nöronlarda aksonal rejenerasyon, Schwann hücrelerinde remiyelinizasyon görülebilir (59).

Tablo 6: Omurilik yaralanmasında kronik dönemde izlenen patolojik bulgular

Santral Kaviteasyon
Aksonların devamlı subpial rimi
Posttravmatik infarkt
Posttravmatik syringomyeli
Kistik myelomalezi
Uzak nekrotik odak
Demiyelinizasyon
İnflamasyon
Wallerian dejenerasyon
Skar ve gliosis
Araknoidit
Atrofi
Rejeneratif süreçler-Aksonlar,Schwann hücreleri, ependim

1.9. Omurilik Yaralanmasında Hasta Yönetimi

Omurilik yaralanmalarında ölümün en önemli nedeni aspirasyon ve şoktur (nörojenik ve hipovolemik). ATSL (Amerikan cerrahi koleji travma programı; ileri yaşam desteği) protokolüne göre travma sonrası hastanın hava yolu açıklığı

kontrolü sağlandıktan sonra solunum, dolaşım ve kanama kontrolünü takiben nörolojik durum değerlendirilmelidir (3).

Nörojenik şokta klinik olarak hipotansiyon, bradikarda, sıcak ekstremiteler vardır. Hipotansiyon genelde T6 düzeyi üzeri lezyonlarda görülür. Tüm reflekslerin kaybı söz konusudur. Spinal kordun otomatizmasına bağlı olarak küçük bir uyararla kısa süreli görülen mass refleksi mevcuttur (60).

Hipovolemik şokta hipotansiyon, taşikarda, hipotermi kliniği mevcuttur. Bulgular kan kaybı ve sıvı açığına bağlı gelişir. Bu olumsuzluklar omurilikteki sekonder hasarı artırabilir. Hipovolemik şok ve nörojenik şok ayrımı iyi yapılmalıdır. Her ikisinde de hipotansiyon kliniği görülür. Ayrım iyi yapılmaz ise tedavi planında uyumsuzluk olabilir (18).

Nörolojik muayane bulguları için uluslararası kabul gören ASIA (Amerika spinal travma derneği) ve Frankel nörolojik performans skalaları kullanılmaktadır.

1.10. Omurilik Yaralanmasında Tanı

Omurilik travması ve şüphesinde tanı ve seviye tespiti için radyolojik incelemeler yapılmalıdır. İlk aşamada direkt grafiler kullanılmalıdır. Tüm spinal aks taranmalı ve şüphelenilen bölgeler için BT (bilgisayarlı tomografi) çalışılmalıdır. Kemik patolojileri en iyi BT göstermekle birlikte ciddi omurilik yaralanması olan hastalarda ligament hasarı, hematoma, nöronal hasarlanma gibi yumuşak doku patolojilerini görmek amacı ile MRG (manyetik rezonans görüntüleme) çalışılmalıdır (3, 18).

1.11. İnsan Omurilik Yaralanması ile Deneysel Modeller Arasındaki Benzerlikler ve Farklılıklar

Omurilik yaralanmasındaki morfolojik değişiklikler insanlarda ve kemiricilerde benzerdir. Sitokin artışı insandaki ile benzerken, inflamatuvar komponent kemiricilerde daha fazladır (61).

Omurilik yaralanma modellerinde birçok deneysel model bulunmasına rağmen bu modellerin bazı eksiklikleri mevcuttur. Örneğin ağırlık düşürme modeli sadece ilk darbeyi taklit eder fakat sonrasında devam eden sıkışma kuvvetini ihmal eder. Bir başka örnek insanda oluşan omurilik travmasında anterior ve anteroposterior omurilik kompresyonu olduğu halde deneysel modellerde çoğunlukla posterior kompresyon yaratılabilmektedir (62).

Tablo 7: İnsan ve kemirgenlerde omurilik yaralanmasında cevabın karşılaştırılması (63)

Dejeneratif Proçesler	KEMİRGEN	İNSAN
Vasküler yanıt	Hemoraja, anjiyogenezis	Hemoraja, anjiyogenezis
Inflamasyon	Aşırı	Daha az
Demyelinizasyon	Evet	Evet; daha az oranda
Aksonal dejenerasyon	Wallerian dejenerasyon	Wallerian dejenerasyon
Glial skar	Aşırı	Aşırı değil
Kist oluşumu	Rat; evet Fare; hayır	Evet
Schwan hücre yanıtı	Az oranda invazyon	Aşırı invazyon
Rejeneratif Proçesler		
Sinir liflerinde filizlenme	Evet	Evet
Remyelinizasyon	Evet	Evet
Sinir liflerinin uyumu	Evet	Evet

1.12. Omurilik Travmasında Tedavi

Omuriliktravması sonrası tedavinin asıl amacı oluşacak seconder hasara yöneliktir. Omuriliktravması sonrası birçok ilaç tekli veya kombine olarak deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Güncel tedavi yaklaşımı ise rejenerasyon çalışmalarıdır (21).

1.12.1. Omurilik Travmasında Cerrahi Tedavi

Travma sonrası primer hasara neden olabilen hematoma, kemik ve disk fragmanları dekompresif cerrahi ile erken dönemde fayda sağlayabilir. Ayrıca yapılacak olan stabilizasyon anatomik pozisyonda düzelme ile sekonder hasarın şiddetinde azalma yapabilir (64).

1.12.2. Omurilik Travmasında Kök Hücre Tedavisi

Kök hücre, kendini yenileme özelliği olan ve birçok patolojik durumda tedavi edici roller tanımlanmış olan hücrelerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle nöron hasarına bağlı patolojilerde kemik iliğinden elde edilen kök hücreler intravenöz yol ile verilip, rejenerasyonun hızlandığına ve remyelinizasyonun oluştuğuna dair kanıtlar elde edilmiştir (18).

Son yıllarda mezenkimal ve nöral krest kaynaklı kök hücreler deneysel çalışmalarda kullanılmıştır ancak bu tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (65).

Kemik stroma hücrelerinin BOS yolu ile verilmesi denenmiştir. Bu deneme sonunda aksonal rejenerasyon ve lokomotor iyileşme sağlandığı görülmüştür (66).

Kök hücre tedavisi yapılan araştırma gruplarında fizik tedavi uygulamasının nörolojik iyileşmeyi artırdığına dair çalışmalar mevcuttur. Bu modellerde motor nöronlar ve beyaz cevherdeki hücrelerde rejenerasyon gibi olumlu değişiklikler olmaktadır (67).

1.12.3. Omurilik Travmasında Medikal Tedavi

Diğer tedavi şekillerinde olduğu gibi medikal tedavi seçeneğinde de asıl amaç sekonder hasar mekanizmalarını engellemeye çalışmaktır. Geçmişten günümüze kadar birçok çalışma yapılmasına rağmen halen daha evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün bulunmayışı laboratuvar ve klinik çalışmaların devam etmesine neden olmuştur.

Nöroprotektif etkilerinden dolayı deneysel omurilik yaralanma modellerinde denenen çok sayıda medikal ajandan sadece biri olan metilprednizolonun, kontrollü, çok merkezli, geniş klinik çalışmalarda, insanlarda fonksiyonel iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir. Faydaları konusunda fikir ayrılıkları olmasına rağmen günümüzde halen daha klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (62).

Geliştirilmeye çalışılan farmakolojik tedavi protokollerinin amacı ilerleyici nöral hasarın azaltılmasını hedeflemekte ve oluşan sekellerin en aza indirilmesidir (6).

1.12.3.1 Kortikosteroidler

Metilprednizolonun spinal kord hasarındaki etki mekanizması; lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, doku kan akımının ve aerobik enerji metabolizmasının düzenlenmesi ile ilerleyici posttravmatik iskemiden korunma, nöroflament degradasyonunun inhibisyonu, intrasellüler kalsiyum birikiminin engellenmesi, vasoaktif prostoglandin F2 α ve tromboksan A2 formasyonunun inhibisyonu, spinal nöron eksitabilitesinin azaltılması olduğu düşünülmektedir (68).

Ulusal Akut Spinal Kord Yaralanma Çalışmaları (NASCIS I, II, III), travma sonrası ilk 8 saat içerisinde uygulanan yüksek doz metilprednizolonun nörolojik düzelme sağladığını desteklemektedir (69).

Belirgin olumsuz yan etkileri nedeni ile uzmanlar arasında bile hala oldukça tartışmalı bir yeri olan metilprednizolon güncel ve etkili tek medikal tedavi yöntemi olarak kabul görmektedir (3).

1.12.3.2. Gangliozidler

SSS hücre membranlarının dış yaprağında yüksek konsantrasyonda bulunur. Nöron aksonlarında, miyelin kılıflarında ve beyaz cevher içerisindeki glial hücrelerde bulunur (70).

1992 yılında çok merkezli yapılan GM-1 kullanımı etkilerini gösteren çalışmada metilprednizolon verilen gruplar ile karşılaştırma yapıldığında motor iyileşme bakımından anlamlı fark bulunmadığı gösterilmiştir (71).

1.12.3.3. Aminosteroidler (lazoroidler)

Steroid olmalarına rağmen yan etkileri steroid gibi değildir. Antioksidan özellikleri çoktur. Lipid peroksidasyonunu inhibe ederler. Membran

stabilizasyon özellikleri vardır. Yapılan çalışmalarda spinal kord kan akımında artışa sebep oldukları gösterilmiştir. Metilprednizolon ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda etkileri arasında fark bulunmasa da yine de bu ilaçlar konusunda ciddi planlanmış çalışmalara gereksinim olduğu bir gerçektir (72).

1.12.3.4. Opioid reseptör antagonistleri

Akut omurilik yaralanması sonrası artmış opioid seviyeleri ve reseptör aktivasyonları gösterilmiştir. Bu da sekonder hasarın şiddetlenmesinde rol oynamıştır. Naloksan ve TRH (tirotropin releasing hormon) endojen antagonistler olup hayvan modellerinde spinal kord kan akımını arttırmış ve nörolojik defisitleri azaltmıştır (41).

1.12.3.5. Eksitatör aminoasit antagonistleri

Bu aminoasitler hücre içine kalsiyum girişini artırır. Kalsiyumun hücre içine girişi de hücre ölümüne kadar giden reaksiyonlar zincirini başlatır. Hücre içine kalsiyum girişi azaldığı zaman nörolojik fonksiyonlarda belirgin düzelmeler gözlenmiştir. Glutamat ın NMDA, AMPA (α -amino 3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid), KA (kainite) reseptörleri bulunmaktadır. Deneysel çalışmalarda bu reseptörlerin blokajı akut omurilik yaralanması sonrasında nöroprotektif etki göstermiştir (73).

1.12.3.6. Kalsiyum, sodyum, potasyum kanal blokerleri ve magnezyum

Yaralanma ve iskemi sonrasında hücre membranının hasara uğraması sonucu kalsiyum kanalları depolarize olur ve hücre içine kalsiyum akışı olur. Kalsiyumun nörotoksik etkisine ek olarak vasküler düz kas hücrelerinde vazospazma yol açması beslenmenin bozulmasına da neden olmaktadır. Nimodipin en çok üzerinde çalışılmış ajandır ancak etkilerinin travma öncesinde

kullanılmaya başladığında ortaya çıkması klinik kullanımda önem ve pratiğinin sınırlanmasına neden olmuştur (74).

Travma sonrası hücre içi Na⁺ miktarında önemli bir artış söz konusudur. Sodyum kanal blokajı seconder hasarın şiddetinin engellmesinde rol oynayabilir. TTX (tetrodotoksin) ve Riluzol'ün sodyum kanal blokajı yaparak nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir (74).

Yaralanma sonrası myelin kaybına bağlı potasyum kanalları açılır ve nöron içine potasyum girişi olur. Artmış ekstrasellüler potasyum nöronlarda depolarizasyon yapar. Bu da spinal şokun altta yatan kritik sebebidir. Yapılan çalışmalarda verilen potasyum kanal blokerlerinin kronik fazda fonksiyonel iyileşme gösterdikleri gösterilmiştir (75).

Omurilik yaralanmasında magnezyum preparatları NMDA reseptör blokajı yapar ve glutamat toksisitesinin önler. Bu indirekt etki ile lipid peroksidasyon yan ürünleri azaltılmış olur (76).

1.12.3.7. Antioksidanlar ve serbest radikal yakalayıcılar

SSS mekanik travması sonrasında reaktif oksijen türevlerinde belirgin artış söz konusudur. Bu artışın inhibisyonu davranışsal ve fonksiyonel iyileşme sağlayabilir. Yaralanma sonrası lipid peroksidasyonu endojen antioksidanlar tarafından azaltılmaktadır. Ancak travma sonrası bu antioksidanların seviyeleri de düşmektedir. Dışarıdan antioksidan replasmanı lipid peroksidasyonuna bağlı hasarı azaltmada etkili olabilir (71).

1.12.3.8. Nörotransmitter reseptör antagonistleri

Spinal aksonlar GABA, norepinefrin, 5-HT (serotonin) gibi reseptörlere sahiptir. Bu reseptörlerin antagonistleri akson üzerinde kuvvetli eksitator etkiye neden olur. Bu antagonistlerin deneysel omurilik yaralanma modellerinde nöroprotektif etkili olduğu yayınlanmıştır (73).

1.12.3.9. Nörotrofik faktörler

Nöronların yaşam sürelerini uzattıkları ve nekrotik alanları azalttıkları bildirilmiştir (73).

1.12.3.10. Nötralizan antikolar

Bir nötralizan antikor olan IN-1 myelinlerde üretilen inhibitör proteinlerin etkilerini bloke etmektedir. Bu antikor infüzyonu aksonlarda rejenerasyona ve dallanmaya yol açmaktadır. Oligodendrositlerden elde edilen MAG (myelin associated glikoprotein) de nötralizan bir antikordur (73).

1.12.3.11. Melatonin

Antioksidan bir ajandır. Lipid peroksidasyonunu azaltarak omuriliği sekonder hasardan koruduğu bildirilmiştir (73).

1.12.3.12. Hipotermi

Hipotermimin omurilik kan akımını azalttığı ve perfüzyonu etkilediği bilinmektedir. Orta derecede hipotermimin apoptotik nöronal ölüm fraksiyonunu azalttığı gösterilmiştir (73, 77). Serbest radikal üretiminin azaltılması, beyin ödeminin azaltılması, intrasellüler kalsiyum konsantrasyonunun azaltılması, artmış GABA salınımı ve glutamate salınımının engellenmesi hipotermimin diğer potansiyel nöroprotektif mekanizmalarıdır (78).

1.12.3.13. Hiperbarik Oksijen

HBO (hiperbarik oksijen) tedavisi tüm vücut dokularında parsiyel oksijen basıncını ve konsantrasyonunu artırır. Vazojenik ödemi azaltır. Kollejen üretimi ve kapiller proliferasyon sağlar. İskemiyi azaltarak nörolojik iyileşme üzerine etkili olduğu yayınlanmıştır (79).

1.12.3.14. Diğer Tedavi Denemeleri

Siklosporin A: Mitokondri iç membrane permeabilite değişiklikleri ve lipid peroksidasyon inhibisyonu ile etki gösterir (74).

Minosiklin: Kaspaz 1 üzerinden apoptozu azaltır ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçer (80).

Tacrolimus: Farelerde nöroprotektif etkisi gösterilmiştir (74).

1.12.4. Ozon

1.12.4.1. Ozon Gazının Özellikleri

Ozon (O₃), üç oksijen atomundan oluşur ve gaz halinde bir moleküldür. Normal atmosferik oksijenin (O₂) çok enerji yüklü biçimidir. Oksijen molekülü kararlı olmasına karşın ozon kararsız bir moleküldür (81).

Ozon gazı renksiz ve keskin kokuludur. Atmosferin üst katmanlarında bulunan ozonun %90'ı stratosfer tabakasındadır. Kalan kısmı troposferde bulunur. Stratosfer tabakasındaki ozon ultraviyole radyasyonun etkisi ile bir yandan oluşurken bir yandan da yok olur (82).

Gökyüzüne mavi rengi veren tabaka ozon tabakasıdır. Sıvı haldeyken laciverte yakın bir rengi vardır. Atmosferde katmanlarına göre ya UV ışınları etkisi ile ya da elektrik akımının oksijeni parçalaması ile meydana gelir. Havanın temizlenmesinde önemli rol oynar. Akciğer ve gözler ozonun etkisine karşı çok hassastır. Ozonun konsantrasyonuna bağlı olmakla birlikte akciğerde ciddi problemlere yol açabilmektedir (82).

Teknik ozon, ozon ve atmosferik havanın karışımı olup su sterilizasyonu ve kimyasal beyazlatma işlemlerinde kullanılırken tıbbi ozon saf tıbbi oksijenden elektrik deşarjı ile hazırlanır. İstenilen dozda ozon/oksijen karışımı elde edildikten sonra taze olarak çalışma yerinde uygulanması gerekir (83).

Ozon gazı kararsızdır ve yarılanma süresi camda 45 dakika, plastikte 30 dakikadır.

Ozon gazının güçlü oksidatif etkisi, biyolojik maddeler ile çözülmeyen bileşenlerle reaksiyona girmese, her türlü bakteri ve virüsü öldürebilme yeteneği dezenfekte edici özelliğini oluşturmaktadır (83).

1.12.4.2. Ozon Tedavisinin Tarihçesi

1839 - Alman kimyacı Christian Friedrich Schönlein ozon gazını keşfetmiştir.

1860 - Monako şehrinin su arıtma tesislerinde dezenfeksiyon amacı ile kullanılmıştır.

1935 - Alman Cerrahi Birliği toplantısında bilimsel olarak ilk kez gündeme alınmıştır.

1948 - Amerikalı Dr. William Turska karaciğer hastalıkları tedavisinde damara ozon verme işlemini resmetmiştir.

1957 - Dr. J. Hansler medikal ozon jeneratörü patentini almıştır.

1958 - Dr. J. Hansler ve Dr Hans Wolf derideki hastalıklarda ozonu torbalama yöntemini kullanmıştır.

1968 - Dr. Hans Wolf Almanya'da majör otohemoterapi yöntemini ortaya koymuştur.

1975 - Dr. Buckley ve arkadaşları ozon tedavisinde peroksit oluşumu ile sağlanan yüksek oksijenlenmenin glutatyon enzim sistemi üzerinden eritrositleri aktive ettiğini ilk kez kanıtlanmıştır.

1977 - Dr Renate Viebahn ozonun vücuttaki etkilerini fizyolojik olarak açıklamıştır.

1979 - Dr. George Freibott ilk kez AIDS hastalarını ozonla tedaviye başlamıştır.

1981 - Dr. H. Werkmeister düşük ozon dozlarının yara iyileştirmesini sağladığını göstermiştir.

1981 - Dr. Ziyad Fahmy intraartiküler (eklem içi) ozon tedavisine başlamıştır.

1987 - Dr. H. G. Knoch cerrahi kolit hastalarına rektal ozon uygulamıştır.

1989 - Dr. E. Riva Sanseverino omurgada ozon tedavisi uygulamıştır. 1990 yılında Dr. Bocci'nın ozonun immün sistemi güçlendirdiğini bilimsel olarak kanıtlamıştır.

1991 - H. Kirchner diş hekimliğinde kanal tedavilerinde ozon kullanmıştır.

1989 yılında Dr. Bocci ve Dr. Leon 1999 yılında Dr. Peralta farmakolojik olarak ozonun serbest radikallere karşı antioksidan sistemleri aktive ettiğini bilimsel olarak göstermiştir (84).

1.12.4.3. Tıbbi Ozonun Tedavide Kullanımı

Ozon uygulamaları arteriyel dolaşım bozukluklar, yanık tedavilere, proktit, kolit, yara iyileşmesi, karsinojenik durumlarda ek tedavi, geriatric sorunlar, romatizmal hastalıklar, yaşa bağlı maküler dejenerasyon, artrit, iskemik ve infeksiyöz (herpes, hepatit) hastalıklarda özellikle diyabet komplikasyonuna bağlı enfektif yara tedavisinde kullanılmış ve etkin bulunmuştur (85). Lomber disk hernisi içerisine de ozon/oksijen karışımı uygulanmış ve tedavide etkin bulunduğu gösterilmiştir (86).

Ozon reaktif bir molekül olduğundan tıbbi amaçlı kullanımlarda her zaman oksijen/ozon karışımı şeklinde kullanılmalıdır. Ozon uygulaması sırasında malzemeler ozona dayanıklı (paslanmaz çelik, nötral cam, teflon) olmalıdır. Kullanılan karışımda ozona en fazla %5 oranında bulunmalıdır (84).

Ozon terapisi alyuvar hücre metabolizmasında aktivasyon rolü oynar, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak interferon ve interlökin gibi yaşamsal sitokinleri serbest bırakır. Antioksidan aktivasyonuna da sebep olur.

Ozon uygulaması sırasında ozon hiçbir zaman damar içerisine direkt olarak verilmez. Bu gaz embolisine neden olabilir (84).

1.12.4.4. Ozonun Uygulama Yöntemleri

Tablo 8: Ozon gazının uygulama yolları (87)

Parenteral	Topikal veya lokorejiyonal
- İntramüsküler(IM) - Subkütan(SC) - İntraperitoneal(I.p) - İntraplevral(IPL) - İntra-artiküler(IPL) (a) Periaratiküler (b) Miyofasiyal - İntradiskal(ID) - İntraforaminal(IF) - Intralezyonel	- Nazal* - Tubal* - Öriküler - Oral* - Vajinal - Üretral ve mesaneici - Rektal - Kütanöz - Dental *30-40 sn'lik apne sırasında uygulanır.

Major Otohemoterapi: IV ozon uygulamasıdır. Vücuttan alınan kan ozon/oksijen karışımı ile temas ettirilir ve tekrardan dolaşıma geri verilir. Düşük riskli ozon uygulamasının en önemli biçimidir. Ozon ve kanın reaksiyonu hasta dışında gerçekleşir. En önemli endikasyonları arasında arteriyel dolaşım bozukluklara, bazı karsinomlar, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, hiperlipidemi ve postmenapozal osteoporozdur (83).

Minör Otohemoterapi: Lokal uygulamalarda kullanılır. Az miktarda kan ile ozon karışımı alerji ve akne lezyonunun olduğu bölgeye uygulanır. Bu uygulama immünmodülatör bir etkiye sahiptir (83).

Ozon/oksijen Karışımının Rektal İnsüflasyonu: Uygun karışımın anüs yolu ile rektum içerisine verilmesi esasına dayanır. Her iki gaz da muköz tabakada çözülür. Oksijen doğrudan emilirken, ozon reaktif bir molekül olduğundan mukozada bulunan protein ve lipidlerle etkileşir. Kısmen de antioksidanlarla etkileşir. Ucuz, noninvaziv ve pratik bir uygulamadır (88).

Düşük Basıncılı Ozon Gazı İrrigasyonu: Lokal olarak sınırlı yaralarda, dekübit yaralarında, radyasyona bağlı oluşan fistüllerde yararlı olduğu bilinmektedir.

İntraartiküler Ozon Enjeksiyonu: Eklem hareketlerinin ağırlı olduğu hastalıklarda diz ve omuz eklemine uygulanır.

Transkütanöz Ozon İrrigasyonu: Aşırı enfekte yaralarda ve toplardamar ülserlerinde kullanılır. Uygulamadan önce yara suyla yıkanır (83).

Ozonlanmış Su ve Zeytinyağı Uygulaması: Ozon/oksijen karışımının suyun içinden belirli bir süre boyunca geçirilmesi sonrasında elde edilen su ile cilt yıkanır; yara, yanık, yavaş iyileşen deri enfeksiyonları, ödem oluşumunun eşlik ettiği inflamatuvar durumlarda kullanılır. Benzer şekilde zeytinyağı uygulamasında da fistül, dekübit, ülser gibi dermatolojik hastalıklarda da ozon/oksijen karışımı kullanılabilir. Mantar ve bakteri öldürücü etki ile lezyonların lokal dezenfeksiyonu sağlanır (83).

1.12.4.5. Ozonun lokal ve sistemik etkileri

Tablo 9: Lokal ve sistemik uygulamada ozonun tıbbi etkileri (83)

Topikal Uygulamada (Lokal Uygulama) Ozonun Tıbbi Etkileri	Ekstra-korporal Kan Tedavisinde (Sistemik Uygulama) Ozonun Tıbbi Etkileri
<ol style="list-style-type: none">1. Antimikrobiyal etkiler<ul style="list-style-type: none">- Antibakteriyel- Antifungal- Antiviral2. Yara iyileştirici etki3. Bağışıklık sistemini harekete geçirici etki	<ol style="list-style-type: none">1. Alyuvar hücrelerinin uyarılmasıyla<ul style="list-style-type: none">- Reolojik özelliklerinin gelişmesi- Alyuvar metabolizmasının aktivasyonu sonucu 2,3-DPG ve ATP artışı- HbO₂/Hb dengesinin sağakayması- Oksijen açığa çıkarma özelliğinin artması2. Lökositlerin uyarılmasıyla<ul style="list-style-type: none">- Mononükleer hücrelerin ılımlı aktivasyonu- Sitokinlerin serbest bırakılması (IL-1, IL-2, IFN-γ, TNF-α, TGF-β vb)3. Biyolojik antioksidanların ve radikal süpürücülerin aktivasyonu ve indüksiyonu

1.12.4.6. Ozon Tedavisinin Uygulandığı Çeşitli Hastalıklar

Tablo 10: Ozunun Kullanıldığı Çeşitli Hastalıklar ve Uygulama Şekilleri (83)

Kullanıldığı Durumlar	Önerilen Uygulama Şekli
1. Arteriyel Dolaşım Bozuklukları a. Periferik arteriyel dolaşım bozuklukları b. Serebral dolaşım bozuklukları	* Majör Otohemoterapi
2. Dışsal Ülserler ve Deri Lezyonları a. Yatak Yarası (Decubitis) b. Ameliyat sonrası lezyonlar c. Radyasyon yaraları d. Diyabetik kangren e. Ulcus cruris f. Yanık	* Emilim kabı ile düşük basınçlı ozon irigasyonu * Ozona dirençli plastik bot * Ozonlanmış su (kompresse halinde)
3. Patolojik Bağırsak Hastalıkları a. Proktit ve kolit b. Crohn hastalığı	* Rektal insüflasyon
4. Viral Enfeksiyonlar a. Hepatit b. Herpes Simpleks (Uçuk) ve Herpes Zoster (Zona) c. Genel bağışıklık ve direnç zayıflaması	* Majör Otohemoterapi * Rektal insüflasyon
5. Karsinojenik Durumlar (Ek tedavi olarak)	* Majör Otohemoterapi * Rektal insüflasyon
6. Geriatrik Koşullar a. Genel canlandırma (Revitalizasyon) b. Yaşla bağlantılı maküler dejenerasyon	* Majör Otohemoterapi * Rektal insüflasyon
7. Romatizma ve Artrit a. Kronik poliartrit b. Eklemler inflamasyonu	* İntraartiküler uygulama * Majör Otohemoterapi (akut olmayan dönemde)
8. Dişçilik	* Ozonlanmış su

Ozonun kullanıldığı bu hastalıkların ortak noktası kronik oksidatif stres ve antioksidan yetersizliktir (89).

1.12.4.7. Güvenli olmaması nedeni ile önerilmeyen uygulama yolları

Ozonun direkt venöz uygulaması hava embolisi riski nedeni ile sakıncalıdır. Bu riskler inme gibi ciddi komplikasyonlardan öksürük, retrosternal

ağırlık hissa, baş dönmesi ve serebral iskeminin eşlik ettiği hipotansiyon krizi ile lme neden olabilmektedir.

Ozonla yapılan tedavi sırasında vitamin C ve Vitamin E gibi antioksidan maddelerin kanda aşırı miktarda bulunması ozonun etkinliğini olumsuz yönde etkiler.

Solunum yollarına toksik olması nedeni ile solunum yoluyla ozon uygulaması mutlak surette yasaktır (90).

1.12.4.8. Tıbbi ozon tedavisinin yan etkileri ve kontraendikasyonları

Bu güne kadar tıbbi oksijen/ozon tedavisinin ciddi bir yan etkisi belirtilmemiştir. Yan etkiler genelde uygulama koşullarına uyulmayan durumlarda ortaya çıkmaktadır. Ozon tedavisinin uygulanmaması gereken bazı özel durumlar: Kanama bozukluğu, hipertiroida, hamilelik, glukoz 6 fosfat dehidrogenaz eksikliğa, ACE (anjyotensin dönüştürücü enzim) inhibitörü tedavisi görenler, ciddi kardiyovasküler rahatsızlığı olanlar ve ozona reaksiyon gösteren astım hastaları.

2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

2.1. Kullanılan Deneklerin Bakım Yeri ve Koşulları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları laboratuvarında yetiştirilen, ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen, normal motor aktiviteye sahip, 31 adet Wistar Albino türü dişi sıçan çalışmaya alınmıştır. Sıçanlar, 12 saat gece ve 12 saat gündüz fotoperiyot uygulanan ve ad libitum olarak beslenen standart laboratuvar koşullarında izlenmiştir.

2.2. Kullanılan Farmakolojik Ajanlar

Ketamin (Ketalar, Parke-Davis. Eczacıbaşı, İstanbul)

Ksilazin (Rompun, Bayer, İstanbul)

Polyvidon iyot (Batticon, Adeka, Samsun)

Sefazolin Sodyum (Sefazol, Mustafa-Nevzat, İstanbul)

Metilprednisolon Sodyum Süksinat (Prednol, Mustafa-Nevzat, İstanbul)

Ozon gazı (Photonik by Dr. Hänslers Ozonosan)

2.3. Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm gruptaki hayvanlara intraperitoneal olarak 50 mg/kg ketamin + 5 mg/kg ksilazin uygulanarak anestezi sağlanmıştır.

2.4. Deney Grupları

Çalışma; her grupta 7 adet rat kullanılan 4 grup ve 3 adet rat kullanılan sham grubu olmak üzere toplam 5 grup olarak planlanmıştır.

Grup 1 (n=3): Sham grubu, sadece laminektomi

Grup 2 (n=7): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra serum fizyolojik 0.5 cc uygulanan kontrol grubu

Grup 3 (n=7): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Metilprednisolon 30mg/kg intraperitoneal uygulanan grup

Grup 4 (n=7): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Ozon 60 µg/ml, 0.7 mg/kg intraperitoneal uygulanan grup

Grup 5 (n=7): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Metilprednisolon 30mg/kg intraperitoneal + Ozon 60 µg/ml, 0.7 mg/kg intraperitoneal uygulanan grup

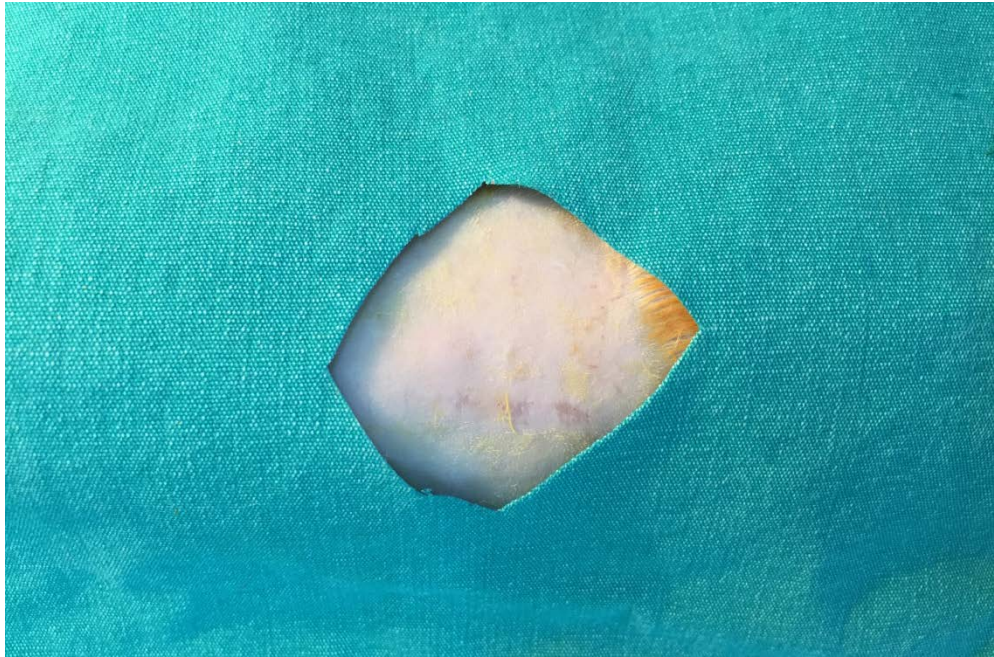
2.5. Cerrahi İşlem

Deney Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deneysel Araştırma Laboratuvarı operasyon salonunda, steril şartlarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem öncesi tüm hayvanlar standardizasyon amaçlı tartıldı. Oniki saatlik açlık sonrasında genel anestezi sağlamak amacı ile intraperitoneal olarak 50 mg/kg Ketamin, 5 mg/kg ksilazin uygulandı ve sıçanlar yüzüstü pozisyonda özel cerrahi tahtaları üzerinde tespit edildi. Tüm hayvanların genel anestezi altında sırt bölgesi traş edildi. Polyvidon iyot (Batticon, Adeka, Samsun) ile lokal antisepsi sağlandı (Resim 2). İnterskapuler mesafe referans alınarak prone pozisyonda T5-12 seviyesinde orta hat insizyonu yapılarak cilt, cilt altı dokuların geçilmesini takiben paravertebral kas fasyası açılarak kaslar laterale künt diseksiyon ile sıyrıldı (Resim 3). Torakal 7-10 laminaları görülerek total laminektomi uygulandı (Resim 3). Bu işlemler sırasında dura mater korundu. Grup 1'e laminektomi dışında işlem yapılmadı. Grup 2'deki deneklere laminektomiyi takiben ekstradural olarak 1 dakika süre ile klip (Resim 4) uygulanarak travma uygulandı. İntraperitoneal olarak 0.5 cc SF verildi. Grup 3'deki deneklere laminektomiyi takiben ekstradural olarak 1 dakika süre ile klip uygulanarak travma yaratıldı ve 1 saat sonra Metilprednisolon 30mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Grup 4'deki deneklere laminektomiyi takiben ekstradural olarak 1 dakika süre ile klip uygulanarak travma yaratıldı ve 1 saat sonra Ozon 60 µg/ml, 0.7 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Grup 5'deki

deneklere laminektomiye takiben ekstradural olarak 1 dakika süre ile klip uygulanarak travma yaratıldı ve 1 saat sonra Metilprednisolon 30mg/kg intraperitoneal + Ozon 60 µg/ml, 0.7 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandı. Standart travma amacıyla 70 gramlık kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klipi (Resim 1) (Aesculap FE 721) ile dura ve spinal kordu çepeçevre saracak şekilde, Tator ve Rivliv modeline uygun olarak bir dakika süreyle klipaj uygulandı. Daha sonra hemostazı takiben kaslar ve insizyon usulüne uygun kapatıldı. Travma uygulanan gruplarda uygulama sonrası deneklerin paraplejik olduğu tespit edildi.



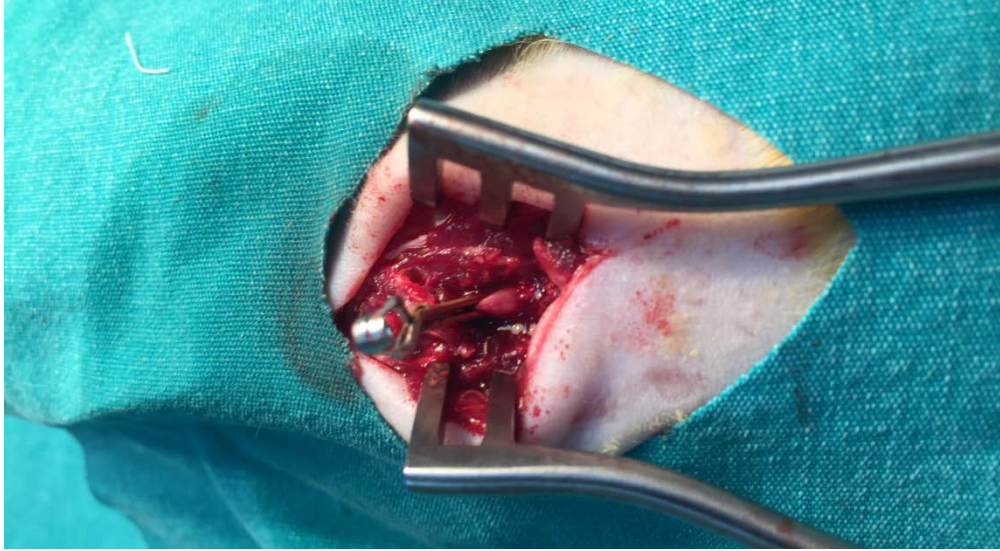
Resim 1: Yaşargil anevrizma klipi



Resim 2: Operasyon bölgesinin traşı ve antiseptisi sağlanması



Resim 3: Laminektomi sonrası omuriliğin görünümü



Resim 4: Omuriliğin anevrizma klipi ile klipajı

2.6. Deney Hayvanlarının Postoperatif İzlemleri

Tüm sıçanlar postoperatif dönemde, derlenme sürelerinin sonunda kafeslerine yerleştirilirda, su ve besine ulaşmaları sağlanarak serbestçe beslenmelerine izin verildi. Takip süreleri boyunca günde 2 kez mesane masajı ile mesaneleri manuel olarak boşaltıldı. Tüm sıçanlara cerrahi saha ve üriner enfeksiyondan korunmak amacı ile ilk 3 gün intraperitoneal olarak 40 mg/kg/gün sefazolin sodyum (Cefamezin, Eczacıbaşı İlaç San.ve Tic.A.Ş., İstanbul,

Türkiye) uygulandı. Takip süresi boyunca deneklerin düzenli pansumanları yapıldı.

2.6.1. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonu

Sıçanların 1 haftalık takip süreleri boyunca belirli aralıklarla davranış testleri ve nörolojik muayeneleri yapıldı. Sakrifikasyon öncesi sıçanlara anestezi işlemi uygulandı ve yeniden cerrahi tahta üzerine alınıp cilt, cilt altı dokuları geçildi. Hasarlanmış omurilik bölgesi görüldü ve merkez olacak şekilde 1 cm yukarı, 1 cm aşağı olmak üzere 2 cm kord disseke edildi. %10 formaldehit solusyonu içine bırakıldı. Takip eden süreçte denekler sırtüstü pozisyona edildi ve sternum referans alınarak kalbe ulaşıldı. Biyokimyasal analizler için kalpten steril şartlarda kan alındı ve denekler sakrifiye edildi.



Resim 5: Hasarlanmış omurilik bölgesinin disseke edilmiş hali

2.7. Davranış Testi ve Fonksiyonel İyileşmenin Değerlendirilmesi

Davranış testi ve fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi IPT (inclined plane testi), BBB (Basso, Beattie, Bresnahan), modifiye Tarlov ve Drummond and Moore davranış derecelendirme skalası kullanılarak yapıldı (91-93). Tüm değerlendirmeler, tedavi grupları hakkında bilgi sahibi olmayan, aynı kişi tarafından yapılacak şekilde planlandı.

Deneklerin davranış testi ve fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi, spinal travma sonrasında 1., 3., 5., 7. günlerde yapıldı ve skorlar kaydedildi.

2.7.1. Inclined Plane Testi

Deneysel akut omurilik yaralanmalarında sık kullanılan Rivliv ve Tator'un tarif ettiği eğimli alan yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde denek düz bir table üzerine konulduktan sonra önce table yere paralel iken sonra eğimi artırılarak, besin ile motivasyonu sağlanır ve tırmanması gözlenir. Deneğin table üzerinde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı deneğin IPA (inclined plane açısı) olarak kabul edilir.

2.7.2. Basso, Beattie, Bresnahan Skorlaması

Spinal kord yaralanması sonrasındaki tedavilerde davranışsal sonuçların ölçümünde araştırmacılar tarafından sıkça kullanılan BBB skorlaması 1995'te Basso ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Tablo 11) Bu skala çok merkezli hayvan spinal kord yaralanma çalışmalarında (NASCIS) ve halen nörotravma literatüründe yaygın olarak kullanılmaktadır (91).

BBB skorlamasında arka ayaklarda hiç hareket olmamasından (0 puan), tam vücut stabilitesi ve kuyruğun havada olmasına kadar (21 puan) çok geniş aralıklarda lökomotor hareket değerlendirilir (94).

21 puanlı bu skalada 0 ile 7 puan arası ölçümler müdahale sonrası erken dönemde arka ayakların eklem hareketlere, 8 ile 13 puan arası ara dönemde adım atma ve koordinasyon, 14 ile 21 puan arası geç dönemde parmak temizleme hareketi ve pençe rotasyonu değerlendirilir. BBB skalasına, veriler hakkında sürekli değil ara dönemlerde bilgi verir.

Çalışmamızda spinal kord yaralanması sonrası akut dönem takibi yapıldığından 0-7 puan arası ölçümler dikkate alınmıştır.

Tablo 11: BBB davranış değerlendirme skalası

I: İyileşmenin erken döneminde (Arka ekstremite hareketleri)
0- Gözlenebilen arka ekstremite (AE) hareketiyok
1- Bir veya iki eklemde hafif hareket (Genelde diz ve/veyakalça)
2- Bir eklemde geniş hareket veya bir eklemde geniş hareket + diğer eklemde hafif hareket
3- İki eklemde genişhareket
4- Üç eklemde hafif hareket (AE) (Kalça, diz, ayak bileği)
5- İki eklemde hafif hareket+üçüncü eklemde geniş hareket
6- İki eklemde geniş hareket +üçüncü eklemde hafif hareket
7- Üç eklemde geniş hareket (AE)
II: İyileşmenin Orta Döneminde (Adım atma koordinasyonu)
8- Ağırlığını taşımadan sürünmek veya pençenin plantaryerleştirilmesi
9- Ağırlığını taşıyarak pençenin plantar yerleştirilmesi veya tek bir defa, ara sıra , sık sık , sürekli ağırlığını kaldırarak dorsal adımlama + plantar adımlamayok
10- Arasına ağırlığını taşıyarak plantar adımlama. Ön ekstremite (ÖE) arka ekstremite koordinasyonu yok
11- Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ÖE, AE koordinasyonu yok
12- Sık sık, sürekli ağırlığını taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ÖE, AE koordinasyonu mevcut
13- Sürekli ağırlığını kaldırarak plantar adımlama ve sık sık ÖE, AE koordinasyonu
III: İyileşmenin Geç Döneminde (Ayrıntılar, ince hareketler)
14- Sürekli ağırlığını taşıyarak adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu veya hareket sırasında predominant pençe pozisyonunda yuvarlanma veya sık plantar adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu, arasıra dorsal adımlama
15- Sürekli ÖE, AE koordinasyonu, parmak temizleme hareketi yok veya ekstremitenin öne ilerletilmesi ile ara sıraparmaktemizlemehareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi vücuda paralel
16- Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak
17- Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında apredominant pençe hareketi paralel
18- Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu ve ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sürekli parmak temizlemehareketi, ilk dokunuşta predominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak
19- Yürüyüş ile sürekli koordineli ÖE, AE hareketa, ekstremitenin öne hareketi ile sürekli parmağı temizleme hareketi; ilk dokunuşda ve kaldırıldığında predominant pençe hareketiparalel
20- Sürekli koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme hareketa, ilk dokunuşta ve kaldırıldığında predominant pençe hareketi paralel; fakat gövde instabilitesi var; kuyruksürekli havada
21- Koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme, predominant pençe pozisyonu paralel, sürekli gövde stabilitesa, kuyruk sürekli havada

2.7.3. Modifiye Tarlov Skalası

- 1: Hareket yok.
- 2: Arka bacaklarında minimal hareket var, arka ayakları üzerinde duramıyor.
- 3: Ayakları üzerinde durabiliyor ancak yürüyemiyor.
- 4: Bir miktar spastisite ile yürüyebiliyor ya da arka bacaklarda inkoordinasyon var.
- 5: Normal motor hareket.

2.7.4. Drummond and Moore Kriterleri

- 0: Parapleja, alt ekstremitelerde motor hareket yok.
- 1: Alt ekstremitelerde zayıf motor hareket var.
- 2: Alt ekstremitelerde orta derecede motor hareket var fakat ekstremitayı gövdesinin altına çekemiyor.
- 3: Alt ekstremitelerde güçlü motor hareket var. Alt ekstremitayı gövdesinin altına çekebiliyor.
- 4: Normal motor fonksiyon.

2.8. Biyokimyasal Analizler

Her gruba ait deneklerden alınan kan örneklerinin steril koşullarda 10 dakika 4000 rpm de santrifüj işlemleri tamamlanarak serumları ayrıldı. Serumlar çalışma anına kadar derin dondurucuda -80 °C'de temiz ve kuru eppendorf tüplerde saklandı. Hemolizli ve lipemik numuneler çalışmaya dahil edilmedi.

SSS'nde inflamasyon varlığında TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler anahtar rol oynar. Hücre membranına direkt hasar vermelerinin yanında, oluşturdukları serbest oksijen radikalleri nötrofillerin toplanmasına yol açarak daha fazla TNF- α ve IL-1 β oluşumuna yol açar. Bu proinflamatuvar sitokinler sonuç olarak endotelial hücre hasarını tetikleyecek daha birçok sitokinin üretilmesine ve spinal

kord iskemisine yol açar. Bu sitokinlerden özellikle TNF- α glial ve nöronal apoptoz ilişkili bulunmuştur (95, 96).

Oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanabilir. Oksidatif stres hasarlanan bölgede antioksidan maddelerin azalması, serbest oksijen radikallerin ve NO in artmasıyla meydana gelir. Serbest oksijen radikalleri lipidi protein ve nükleik asitlere hasar vererek sitotoksositeye sebep olur. Oksidatif stres, primer hasar sonrasında spinal kord lezyonlarının progresyonunda büyük rol oynar. Spinal kord gibi nöronal dokular, içeriklerinde büyük miktarda lipid bulundurduğundan oksidatif strese oldukça duyarlıdır. TAS, organizmanın antioksidan savunma düzeyine, TOS ise oksidan yükü göstermekte olup ikisi birlikte kullanıldığında oksidatif stresin güvenilir bir göstergesidir (97, 98).

2.8.1. Tnf – α

Antikor ile kaplı kuyucuklara denek serumu pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor eklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 400 mikrolitre yıkama solüsyonu ile 4 kere yıkandı. Streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 kez 400 mikrolitre yıkama solüsyonuyla otomatik yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek (ELx800, USA) marka yarı otomatik elisa cihazında Rat TNF- α Elisa kiti (eBioscience, Vienna, Austria) kullanıldı.

2.8.2. IL – 6

Antikor ile kaplı kuyucuklara denek serumu pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor eklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 400 mikrolitre yıkama solüsyonu ile 6 kere yıkandı. Streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 6 kez 400 mikrolitre yıkama solüsyonuyla otomatik yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra

oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek (ELx800,USA) marka yarı otomatik elisa cihazında Rat IL-6 Elisa kiti (eBioscience, Vienna, Austria) kullanıldı.

2.8.3. IL - 1 β

Antikor ile kaplı kuyucuklara denek serumu pipetlendi. Her kuyucuğa biotin işaretli antikor eklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 400 mikrolitre yıkama solüsyonu ile 3 kere yıkandı. Streptavidin işaretli HRP enzimi eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 3 kez 400 mikrolitre yıkama solüsyonuyla otomatik yıkama yapıldı. HRP enzimi için substrat eklendikten sonra oda sıcaklığında karanlıkta 10 dk inkübasyon sonrası H₂SO₄ kullanılarak reaksiyon sonlandırıldı. Elisa plate okuyucuda 450nm'de absorbanslar okunup standart absorbans eğrisine göre konsantrasyon hesaplandı. ELİSA yöntemi için Biotek (ELx800,USA) marka yarı otomatik elisa cihazında Rat IL-1 β Elisa kiti (eBioscience, Vienna, Austria) kullanıldı.

2.8.4. Total Oksidan Status (TOS) Ölçümü

TOS ölçümü, ticari olarak üretilmiş ölçüm kiti kullanılarak (Total Oxidant Status Assay Kit, Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) Abbott C16000 cihazında spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Numunede bulunan oksidan maddeler, ferröz iyon şelatör kompleksini ferric iyon haline okside etmiştir. Ferric iyon formu, asidik ortamda kromojen ile renkli bir kompleks meydana getirmiştir. Renk oluşumu; numunedeki oksidan moleküllerin miktarı ile doğru orantılı olduğundan, spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve TOS değeri elde edilmiştir.

2.8.5. Total Antioksidan Status (TAS) Ölçümü

TAS ölçümü, ticari olarak üretilmiş ölçüm kiti kullanılarak (Total Antioxidant Status Assay Kit, Rel Assay Diagnostics®, Gaziantep, Türkiye) Abbott C16000 cihazında spektrofotometrik olarak gerçekleştirildi. Numunede bulunan antioksidan maddeler, kit içindeki reaktiflerden biri olan koyu mavi-yeşil renkteki ABST radikal solusyonunu renksiz forma redüklemiştir ve reaksiyon karışımının 660 nm deki absorbans değişimi ölçülmüştür. Absorbans değişimi, numunede bulunan TAS düzeyi ile doğru orantılıdır.

2.9. Histopatolojik Değerlendirme

Alınan spinal doku örnekleri, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı'nda görevli, tedavi gruplarını, uygulanan tedavileri ve nörolojik değerlendirme sonuçlarını bilmeyen iki histoloji uzmanı tarafından burada değerlendirmeye alındı. Hematoksilen Eozin, Cresyl Violet, Antikonnesin-43, Tunel boyamaları yapılarak; Olympus BX-51 mikroskop ve görüntüleme cihazı ile incelemeler yapıldı, kesit fotoğrafları çekildi. Bu boyamalar ile spinal kordda bulunan anormallikler, zararlanmalar ve dokudaki apoptotik hücre sayıları tespit edildi.

2.9.1. Doku Takiba, Gömme ve Bloklama

- Parçalar % 4 paraformaldahit (veya % 10 formalin) (Formaldehyde solution min. 37% free from acid) çözeltisi içerisinde 24 saat süreyle bekletilerek fikse edildi (Parça boyutuna göre farklılık gösterir).

- 30 dakika PBS (Bioshop phosphate buffered saline tablets) tamponunda bekletilerek yıkandı.

- 1,5 saat % 80 Etanol (Merck Ethanol absolute),
- 1 saat % 95 Etanol I,
- 1 saat % 95 Etanol II,

- 1 saat % 100 Etanol I,
- 1 saat % 100 Etanol III'de bekletilerek dehidretasyon işlemi gerçekleştirildi.
- Ksilol (Sigma-Aldrich Xyleneshistological grade) ile şeffaflandırma aşamasına geçildi (Ksilol I 30 dakika, Ksilol II 30 dakika).
- Şeffaflandırma aşamasını sonrası 60°C etüvde erimiş parafin (Tek Path 10 KG boncuk Paraffin) içerisine alınan parçalar Parafin I 30 dakika, Parafin II 30 dakika bekletildi.
- Ertesi gün etüvden çıkarılan parçalar bloklandı.

2.9.2. Kesit Alma

- Işık mikroskopik incelemeler için mikrotomda (Leica RM 2145) 5µ'luk kesitler alınarak 37°C su banyosunda kesitlerin açılması sağlandı.
- Tercihe göre rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine doku kesitleri alındı.
- Tüm kesitler 1 gece 37°C'lik etüvde tutularak lam üzerine yapışmaları sağlandı.
- Kesitler 62°C'lik etüvde 2 saat bekletildikten sonra Ksilol 1, 1 saat Ksilol 2, 1 saat tutularak parafinden uzaklaştırma işlemi gerçekleştirildi.

2.9.3. Hematoksilen Eosin (H.E.) Boyama

Hematoksilen boyası kromatini boyadığından dolayı apoptozise özgü değişiklikler hücre çekirdeğinde görülebilir. Hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin çekirdek zarının periferinde toplanması ve çekirdek küçülmesi apoptozise özgü bulgulardır.

- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- % 80 Alkol 2 dakika

- Distile su 5 dakika
- Hematoksilen(Hematoxylin solution modified acc. to Gill III) 4 dakika
- Akarsu 5 dakika
- Asit alkol (Doku pembe renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Amonyaklı su (Doku mor renk alana kadar batırıp çıkarıldı)
- Akarsu
- Distile su 5 dakika
- Eosin (Bio-Optica Milano S.p.a. Eosin Y 1% aqueous solution)5 dakika
- % 95 Alkol 2 dakika
- % 100 Alkol I 2 dakika
- % 100 Alkol II 2 dakika
- Ksilol I 10 dakika
- Ksilol II 10 dakika
- Boyalı preparatlar entellan damlatılarak kapatıldı.

2.9.4. Cresyl Violet Boyama

Nissl maddesi granuler endoplazmik retikulum ve ribozom içerir ve nöronlarda bulunur. Ayrıca Nissl cisimciği veya granülü olarak adlandırılır. Crezyl viole boyası nöronların gövdelerini belirler (mor menekşe rengi) ve glial hücreleri boyamaz. Bu boya genellikle nöron sayımı yapmak için kullanılır. Nöronlar için en güvenilir ve en kolay işaretleme yöntemidir (99).

- Ksilol 5 dakika
- %95 Alkol 3 dakika
- %70 Alkol 3 dakika
- Deiyonize distile su 3 dakika

- Kesitler 60° C lik etüvde 8-14 dakika bekletildikten sonra Cresyl Violet ile boyandı.

- Distile su 3 dakika
- %70 Alkol 3 dakika
- %95 Alkol 1-2 dakika
- %100 Alkol
- Ksilen 5 dakika
- Sonrasında boyalı preparatlar kapatıldı.

2.9.5. İmmünohistokimya Prosedürü (Antikonneksin-43)

Daha önceki çalışmalar bazı astrositlerin connexin 43 (cx43) yarım kanallarını açarak ATP saldığını göstermiştir. Connexinler ikili kanal fonksiyonu olan proteinlerdir. Geleneksel olarak aralık bağlantıları (gap junction) oluşturup 2 hücrenin birbirine bağlanmasını sağlarlar. Bu bağlantılar hücreden hücreye Ca²⁺, cAMP, IP3, ATP, glutamate ve glukoz gibi iyon ve küçük moleküllerin geçişini sağlar. Aralık bağlantısı oluşturmayan yarım kanallar ise ATP ve glutamat gibi düzenlenmiş gliotransmitter maddelerin salınımında görev alırlar. Bu yarım kanalların açılması çok sıkı kontrol edilir çünkü uzun süre açık kalmaları hücre yaşamla bağdaşmaz (100).

- Kesitler, bir gece 60°C etüvde ve soğuduktan sonra 3x30 dakika ksilolde tutuldu.
- Sırasıyla %95, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde 2'şer dk bekletildi.
- Kesitler distile su ile 10 dk yıkandı ve çevreleri sınırlayıcı kalem (PAP PenSigma PAP pen for immunostaining 5 mm tip width) ile çizildi.
- PBS (1X) (Phosphate Buffered Saline) solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Kullanılacak antikor için önerilen "antijen retrieval" yöntemi uygulandı (0,01 M citrat tamponu içerisinde 90° C mikrodalgada 30 dakika).
- Örnekler soğutulduktan sonra 5 dakika % 0,25 Triton X-100 (Sigma-aldrich Triton™ X-100 laboratory grade) PBS'de bekletildi.

- Endojen peroksit blokajı yapıldı, distile su ile seyrelterek (% 3 H₂O₂) (5 dakika).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandıktan sonra kesitler üzerine Blok solüsyonu (veya % 1 BSA-PBS) (non-immun serum) damlatılarak 1 saat beklenildi.
- Blok solüsyonu yıkamadan uzaklaştırıldı ve uygun şekilde dilüsyonu yapılmış 50 µl primer antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda bir gece 4°C'de bekletildi (Anti konneksin 43 Primer antikor dilüsyonları (PBS ile 1/100).
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı.
- Primer antikor ile uyumlu biyotinlenmiş sekonder antikor damlatıldı, kapalı nemli kutuda 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. Hazırlanan streptavidinle işaretli sekonder antikor damlatılır, kapalı nemli kutuda 30 dk oda ısısında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile 3x5 dk yıkandı. DAB (ScyTek ACK 500 DAB Chromogen/Substrate Bulk pack) (3,3-diaminobenzidine) solüsyonu damlatılır, 8 dk kapalı nemli kutuda bekletildi ve tekrar PBS solüsyonu ile 3x5 dk ve distile su ile yıkandı.
- Mayers'in (Mayer's hemalum solution) hematoksilen ile Nükleus boyanması kontrol edilerek 2 dk boyama yapıldı.
- Distile su ile yıkandı.
- Sırasıyla % 80, % 95 ve % 100'lük etil alkolde 1'er dk bekletildi.
- Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dk ksilolde şeffaflaştırıldı.
- Kapama mediumuyla lamel ile kesitler kapatıldı.

2.9.6. TUNEL Tekniği ile Boyama

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick EndLabeling) yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar ve lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin kesin varlığı bu yolla saptanabilir. Işıkmikroskopik görüntüsünde kahverengi nöronlar görülür. Spinal kord

travması sonrası erken vegeç dönemde apopotozisi göstermek üzere çalışmalarda kullanılmıştır. TUNELYötemiyle hazırlanan preperatlar, elektron mikroskop altında bakıldığında nöronal apopotozis sitoplazmik organellerde ve membranlarda düzensizlik olarak karşımıza çıkar(101, 102).

- 61°C 2 saat etüv deparafinizasyon
- Overnight Ksilol I ve II
- % 100 EtOH 2 dakika
- % 95 EtOH 2 dakika
- % 80 EtOH 2 dakika
- Distile su 5 dakika
- % 0,1 Triton X-100'lü PBS ile yıkama (pH:7.4) 5 dakika
- Dokuların etrafı sınırlayıcı kalem ile çizilir
- Proteinaz K eklenerek lamaların üzeri cover slip ile kapatılır 15-30 dakika

oda sıcaklığı

- Dokular 2 kez PBS ile yıkanır.
- 100µl Label solution (vial2)den çekilerek negatif kontrole eklenir, vial 2 de geriye kalan 450µl sıvıya 50 µl Enzyme solution (vial1) eklenir ve iyice karıştırılır. Total hacim 500µl olur (Örnek başına 50 µl eklenerek 10 örnek 1 vial ile boyanabilir).

• Hazırlanan solüsyondan 50 µl eklenerek lamaların üzeri cover slip ile kapatılır nemli ortamda 60 dakika 37°C inkübe edilir

- Dokular 3 kez PBS ile yıkanır.
- Dokular üzerine 50 µl Converter-POD (vial3) eklenir ve nemli ortamda 30 dakika 37°C inkübe edilir.

- Dokular 3 kez PBS ile yıkanır.
- Dokular üzerine 50-100 µl DAB Substrat eklenir ve 10 dakika 15-25°C inkübe edilir.

- Dokular 3 kez PBS ile yıkanır.
- Mayers Hematoksilen ile 1 dakika boyanır.
- Çeşme suyu 2 dakika
- Distile su 2 dakika

- % 80 alkol
- % 95 alkol
- % 100 alkol
- Entalen ile kapama.

2.10. İstatistiksel Yöntem

İstatistiksel analiz için SPSS 21.0 V programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler, kategorik değişkenler için sayı ve yüzdeler, sayısal değişkenler için ortalama ve standart sapmalar olarak sunuldu. Sayısal değişkenler için çoklu bağımsız grup karşılaştırmalarında normal dağılım varsayımı sağlandığı durumda ANOVA test, sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis testi; ikili bağımsız grup karşılaştırmalarında normal dağılım varsayımı sağlanmadığı durumda Mann Whitney U Test, sağlandığı durumda ise T testi kullanıldı. Kategorik değişkenler için ise Ki-Kare testi kullanıldı. Sayısal veriler arasındaki ilişkide normal dağılım sağlandığı korelasyonlar için Pearson; sağlanmadığı korelasyonlar için Spearman's rho testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p değerinin 0,05ten küçük olması durumu olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

Dört grupta 7 sıçan, sham grubunda 3 sıçan olmak üzere toplam 31 sıçan kullanıldı. Çalışmaya başlamadan önce deney hayvanlarının ağırlık ölçümleri yapıldı. Ortalama ağırlıkları 250-300 mg arasında hesaplandı. Sıçanların çalışma sırasındaki ağırlık ölçümlerinde %10'dan fazla ağırlık kaybı olmadı. Ağırlık kaybı nedeni ile ya da herhangi başka bir sebeple çalışmadan çıkartılan sıçan olmadı.

3.1. Davranış Testleri ve Fonksiyonel İyileşme Nörolojik Değerlendirme Testlerinin Sonuçları

Tablo 12: Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 1.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
1. Gün IPT	3	8,00	9,00	8,5714	,53452
1. Gün BBB	3	6,00	7,00	6,5714	,53452
1. Gün Tarlov	3	5,00	5,00	5,0000	,00000
1. Gün D&M	3	4,00	4,00	4,0000	,00000
3. Gün IPT	3	8,00	9,00	8,5714	,53452
3. Gün BBB	3	6,00	7,00	6,5714	,53452
3. Gün Tarlov	3	5,00	5,00	5,0000	,00000
3. Gün D&M	3	4,00	4,00	4,0000	,00000
5. Gün IPT	3	8,00	9,00	8,5714	,53452
5. Gün BBB	3	6,00	7,00	6,5714	,53452
5. Gün Tarlov	3	5,00	5,00	5,0000	,00000
5. Gün D&M	3	4,00	4,00	4,0000	,00000
7. Gün IPT	3	8,00	9,00	8,5714	,53452
7. Gün BBB	3	6,00	7,00	6,5714	,53452
7. Gün Tarlov	3	5,00	5,00	5,0000	,00000
7. Gün D&M	3	4,00	4,00	4,0000	,00000
Geçerli N	3				

Tablo 13: Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 2

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
1. Gün IPT	7	4,00	5,00	4,1429	,37796
1. Gün BBB	7	,00	1,00	,2857	,48795
1. Gün Tarlov	7	,00	2,00	1,1429	,89974
1. Gün D&M	7	,00	2,00	,5714	,78680
3. Gün IPT	7	3,00	5,00	3,8571	,69007
3. Gün BBB	7	,00	3,00	1,4286	1,13389
3. Gün Tarlov	7	1,00	2,00	1,7143	,48795
3. Gün D&M	7	,00	2,00	1,2857	,95119
5. Gün IPT	7	4,00	5,00	4,1429	,37796
5. Gün BBB	7	,00	2,00	1,0000	,81650
5. Gün Tarlov	7	1,00	2,00	1,7143	,48795
5. Gün D&M	7	,00	2,00	1,0000	,81650
7. Gün IPT	7	4,00	5,00	4,7143	,48795
7. Gün BBB	7	2,00	4,00	2,7143	,75593
7. Gün Tarlov	7	2,00	3,00	2,2857	,48795
7. Gün D&M	7	1,00	3,00	1,8571	,89974
Geçerli N	7				

Tablo 14: Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 3

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
1. Gün IPT	7	5,00	6,00	5,4286	,53452
1. Gün BBB	7	1,00	5,00	2,7143	1,38013
1. Gün Tarlov	7	1,00	4,00	2,2857	,95119
1. Gün D&M	7	,00	3,00	2,1429	1,06904
3. Gün IPT	7	5,00	6,00	5,5714	,53452
3. Gün BBB	7	2,00	4,00	3,1429	,89974
3. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	2,7143	,75593
3. Gün D&M	7	1,00	3,00	2,2857	,95119
5. Gün IPT	7	4,00	7,00	5,0000	1,00000
5. Gün BBB	7	1,00	5,00	3,1429	1,21499
5. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	2,5714	,78680
5. Gün D&M	7	1,00	3,00	2,4286	,78680
7. Gün IPT	7	6,00	7,00	6,4286	,53452
7. Gün BBB	7	3,00	4,00	3,4286	,53452
7. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	3,2857	,75593
7. Gün D&M	7	3,00	3,00	3,0000	,00000
Geçerli N	7				

Tablo 15: Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 4

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
1. Gün IPT	7	5,00	6,00	5,2857	,48795
1. Gün BBB	7	2,00	5,00	3,2857	,95119
1. Gün Tarlov	7	3,00	4,00	3,2857	,48795
1. Gün D&M	7	2,00	3,00	2,8571	,37796
3. Gün IPT	7	5,00	6,00	5,5714	,53452
3. Gün BBB	7	3,00	5,00	4,0000	1,00000
3. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	2,8571	1,06904
3. Gün D&M	7	2,00	4,00	2,5714	,78680
5. Gün IPT	7	4,00	6,00	5,1429	,69007
5. Gün BBB	7	2,00	6,00	3,5714	1,27242
5. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	2,5714	,97590
5. Gün D&M	7	2,00	3,00	2,5714	,53452
7. Gün IPT	7	6,00	8,00	6,7143	,75593
7. Gün BBB	7	3,00	5,00	4,1429	,89974
7. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	3,1429	,89974
7. Gün D&M	7	2,00	3,00	2,5714	,53452
Geçerli N	7				

Tablo 16: Davranış ve nörolojik değerlendirme testinin sonuçları Grup 5

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma
1. Gün IPT	7	5,00	6,00	5,2857	,48795
1. Gün BBB	7	3,00	4,00	3,5714	,53452
1. Gün Tarlov	7	2,00	3,00	2,4286	,53452
1. Gün D&M	7	2,00	3,00	2,5714	,53452
3. Gün IPT	7	6,00	7,00	6,1429	,37796
3. Gün BBB	7	4,00	6,00	4,8571	,89974
3. Gün Tarlov	7	4,00	4,00	4,0000	,00000
3. Gün D&M	7	2,00	3,00	2,8571	,37796
5. Gün IPT	7	5,00	7,00	6,1429	,69007
5. Gün BBB	7	4,00	5,00	4,4286	,53452
5. Gün Tarlov	7	2,00	4,00	3,4286	,78680
5. Gün D&M	7	3,00	3,00	3,0000	,00000
7. Gün IPT	7	7,00	8,00	7,8571	,37796
7. Gün BBB	7	5,00	6,00	5,8571	,37796
7. Gün Tarlov	7	4,00	5,00	4,5714	,53452
7. Gün D&M	7	3,00	4,00	3,7143	,48795
Geçerli N	7				

3.1.1. Inclined Plane Test (IPT) sonuçları

Deneğin tabla üzerinde durabildiği en yüksek açı 9, en düşük açı 1 olarak kabul edilerek hesaplamalar yapıldı.

1. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 3 ile grup 5 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3. Gün: Grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

5. Gün: Grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

7. Gün: Grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3.1.2. Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) Skorlaması Sonuçları

1. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 3 ile grup 5 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

5. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

7. Gün: Grup 2 ile grup 3 arasında, grup 3 ile grup 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3.1.3. Modifiye Tarlov Skalası Sonuçları

1. Gün: Grup 3 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

5. Gün: Grup 2 ile 4 arasında, grup 3 ile 4 arasında, grup 3 ile 5 arasında, grup 4 ile 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

7. Gün: Grup 1 ile 5 arasında, grup 2 ile 4 arasında, grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3.1.4. Drummond and Moore Kriterlerine Göre Sonuçlar

1. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 3 ile grup 5 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

3. Gün: Grup 2 ile grup 3 arasında, grup 3 ile grup 4 arasında, grup 3 ile grup 5 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

5. Gün: Grup 3 ile grup 4 arasında, grup 3 ile grup 5 arasında, grup 4 ile grup 5 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

7. Gün: Grup 1 ile 5 arasında, grup 2 ile 4 arasında, grup 3 ile 4 arasında anlamlı fark saptanmamıştır ($p > 0,05$).

1. Grup için;

1., 3., 5., 7. Günlerde yapılan IPT, BBB skorlaması, modifiye Tarlov skalası ve Drummond and Moore testi için günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 1$).

2. Grup için;

Tablo 17: 2. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme

	1-3. Gün	1-5. Gün	1-7. Gün	3-5. Gün	3-7. Gün	5-7. Gün
IPT	-	-	0.046	-	0.014	0.046
BBB	0.039	-	0.014	-	0.014	0.014
Modifiye Tarlov	0.046	0.046	0.023	-	0.046	0.046
Drummond and Moore	-	-	0.014	-	0.046	-

3. Grup için;

Tablo 18: 3. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme

	1-3. Gün	1-5. Gün	1-7. Gün	3-5. Gün	3-7. Gün	5-7. Gün
IPT	0.008	-	-	-	0.014	0.02
BBB	-	-	-	-	-	-
Modifiye Tarlov	-	-	0.02	-	0.046	0.025
Drummond and Moore	-	-	-	-	-	-

4. Grup için;

Tablo 19: 4. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme

	1-3. Gün	1-5. Gün	1-7. Gün	3-5. Gün	3-7. Gün	5-7. Gün
IPT	-	-	0.015	-	0.011	0.015
BBB	-	-	0.034	-	-	-
Modifiye Tarlov	-	0.025	-	-	-	-
Drummond and Moore	-	-	-	-	-	-

5. Grup için;

Tablo 20: 5. Grup için nörolojik muayenelerde günler arası gelişme

	1-3. Gün	1-5. Gün	1-7. Gün	3-5. Gün	3-7. Gün	5-7. Gün
IPT	0.014	0.014	0.015	-	0.014	0.014
BBB	0.014	0.014	0.014	-	0.038	0.015
Modifiye Tarlov	0.015	-	0.011	-	0.046	0.038
Drummond and Moore	-	-	0.011	-	0.034	0.025

3.2. Biyokimyasal Analizlerin Sonuçları

Tablo 21: Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 1

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
TAS	3	2,24	2,33	2,2743	,04631
TOS	3	,17	,23	,1967	,03055
TOS/TAS	3	,07	,10	,0833	,01528
TNF- α	3	10,02	10,40	10,2679	,21334
IL-1 β	3	41,04	41,40	41,2236	,17972
IL-6	3	4,10	4,19	4,1506	,04751
Geçerli N	3				

Tablo 22: Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 2

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
TAS	7	1,86	2,00	1,9487	,05340
TOS	7	5,00	29,00	19,7143	9,84402
TOS/TAS	7	2,50	14,50	10,1000	5,06590
TNF- α	7	17,63	44,77	27,1218	10,96517
IL-1 β	7	60,20	131,55	87,7905	30,38506
IL-6	7	13,00	17,00	15,0000	1,41421
Geçerli N	7				

Tablo 23: Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 3

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
TAS	7	1,77	2,22	2,0403	,17211
TOS	7	3,99	7,91	5,4733	1,71869
TOS/TAS	7	1,70	4,00	2,6600	,91170
TNF- α	7	3,86	23,69	11,9464	8,15792
IL-1 β	7	46,36	101,89	66,6624	19,64777
IL-6	7	4,00	8,00	5,9286	1,30475
Geçerli N	7				

Tablo 24: Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 4

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
TAS	7	1,83	2,10	1,9714	,11894
TOS	7	1,93	5,08	3,1750	1,27240
TOS/TAS	7	,90	2,50	1,5929	,65982
TNF- α	7	11,55	26,71	17,1852	6,87457
IL-1 β	7	35,45	84,49	51,2429	17,72349
IL-6	7	5,00	9,00	7,0714	1,30475
Geçerli N	7				

Tablo 25: Biyokimyasal analiz sonuçları Grup 5

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart sapma
TAS	7	1,95	2,20	2,0943	,09486
TOS	7	1,10	8,18	2,5169	2,51592
TOS/TAS	7	,50	4,00	1,2071	1,24044
TNF- α	7	2,30	23,69	12,1678	7,48084
IL-1 β	7	41,18	89,70	57,7504	18,39260
IL-6	7	4,00	6,00	5,0000	,86603
Geçerli N	7				

Grup 1 ile Grup 2 nin biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TAS, TOS, TOS/TAS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. p değerleri sırası ile;

Tablo 26: Grup 1 ile Grup 2 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016

Grup 1 ile Grup 3 ün biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TAS, TOS, TOS/TAS, IL-1 β düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. TNF- α ile IL-6 arasında anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 27: Grup 1 ile Grup 3 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.017	0.016	0.017	0.81	0.016	0.086

Grup 1 ile Grup 4 ün biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TAS, TOS, TOS/TAS, TNF- α , IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. IL-1 β için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 28: Grup 1 ile Grup 4arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.017	0.017	0.016	0.015	0.073	0.016

Grup 1 ile Grup 5 in biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TAS, TOS, TOS/TAS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. TNF- α , IL-1 β , IL-6 için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 29: Grup 1 ile Grup 5arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.017	0.017	0.016	0.64	0.052	0.30

Grup 2 ile Grup 3 ün biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TOS, TOS/TAS, TNF- α , IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. TAS, IL-1 β için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 30: Grup 2 ile Grup 3arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.33	0.006	0.007	0.021	0.10	0.002

Grup 2 ile Grup 4 ün biyokimyasal verileri kıyaslandığında;

TOS, TOS/TAS, IL-1 β , IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. TAS, TNF- α için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 31: Grup 2 ile Grup 4arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.94	0.003	0.002	0.081	0.018	0.002

Grup 2 ile Grup 5 in biyokimyasal verileri kıyaslandığında;
TAS, TOS, TOS/TAS, TNF- α , IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. IL-1 β için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 32: Grup 2 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.013	0.004	0.003	0.007	0.063	0.002

Grup 3 ile Grup 4 ün biyokimyasal verileri kıyaslandığında;
TOS, TOS/TAS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.
TAS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 33: Grup 3 ile Grup 4 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.33	0.03	0.047	0.19	0.17	0.13

Grup 3 ile Grup 5 in biyokimyasal verileri kıyaslandığında;
TOS, TOS/TAS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.
TAS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 34: Grup 3 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.84	0.02	0.02	0.84	0.3	0.17

Grup 4 ile Grup 5 in biyokimyasal verileri kıyaslandığında;
TAS, TOS/TAS, IL-6 düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. TOS, TNF- α , IL-1 β için anlamlı fark saptanmadı. p değerleri sırası ile;

Tablo 35: Grup 4 ile Grup 5 arasındaki biyokimyasal istatistik

TAS	TOS	TOS/TAS	TNF- α	IL-1 β	IL-6
0.04	0.06	0.04	0.27	0.33	0.01

3.3. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

3.3.1. Grup 1 - Laminektomi Grubu

Torakal 9 seviyesinden alınan kesitlerde; H harfi şeklinde gri cevher içeren her iki kolu kommissura grisea ile birbirine birleşmiş olduğu görüldü. H'nin posterior kolları arka boynuz (kolumna posterior), anterior kolları daha büyük yapıda olan ön boynuz (kolumna anterior) yapıları saptandı. H harfinin tam ortasında lokalize olan kanalis sentralisin tek katlı izoprizmatik şeklindeki ependim hücreleriyle döşenmiş olduğu saptandı. Substansiya grisea adı verilen gri cevher yapısı içinde nöron gövdelerine, dendritlere, akson başlangıçları, gliya hücreleri ve kapiller damarlar saptandı. Substantia grisea içerisinde yerleşen nöronların tüm gri cevher alanlarında yerleştiği fakat bu dağılışın eşit olmadığı görüldü. Griseanın ön ve yan boynuzlarında motor (radiküler) nöronlar, arka boynuzda ise duyuşal (funiküler) nöronların yerleştiği görüldü. Substantia Griseayı çepeçevre saran yapıdaki substantia albanın miyelinli sinir liflerine, nörogliya ve kapillerlerden oluştuğu saptandı. Bu grupta medulla spinalise ait histolojik görünümün normal olduğu saptandı (Resim 6-7 A B).

3.3.2. Grup 2 – Spinal kord hasarı grubu

Bu gruba deneklere ait medulla spinalis kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının bozulduğu, nöron sayısının Grup 1'e göre azaldığı, hücre yapısının net izlenemediği, gliya hücresi reaksiyonu, fibrozis, yaygın olarak demiyelinizasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile birlikte dural kalınlaşma, yer yer aksonal şişme ve seyrek aksonal sferoidler gözlemlendi (Resim 6-7 C D).

3.3.3. Grup 3 -Spinal kord hasarı ve metilprednizolon verilen grup

Bu gruba deneklere ait medulla spinalis kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısında dejeneratif etkilerin oluştuğu fakat grup 2 den ziyade grup 1 e yakın bir görünümde olduğu saptandı. Hücresel yapıların grup 1 e yakın görünümde

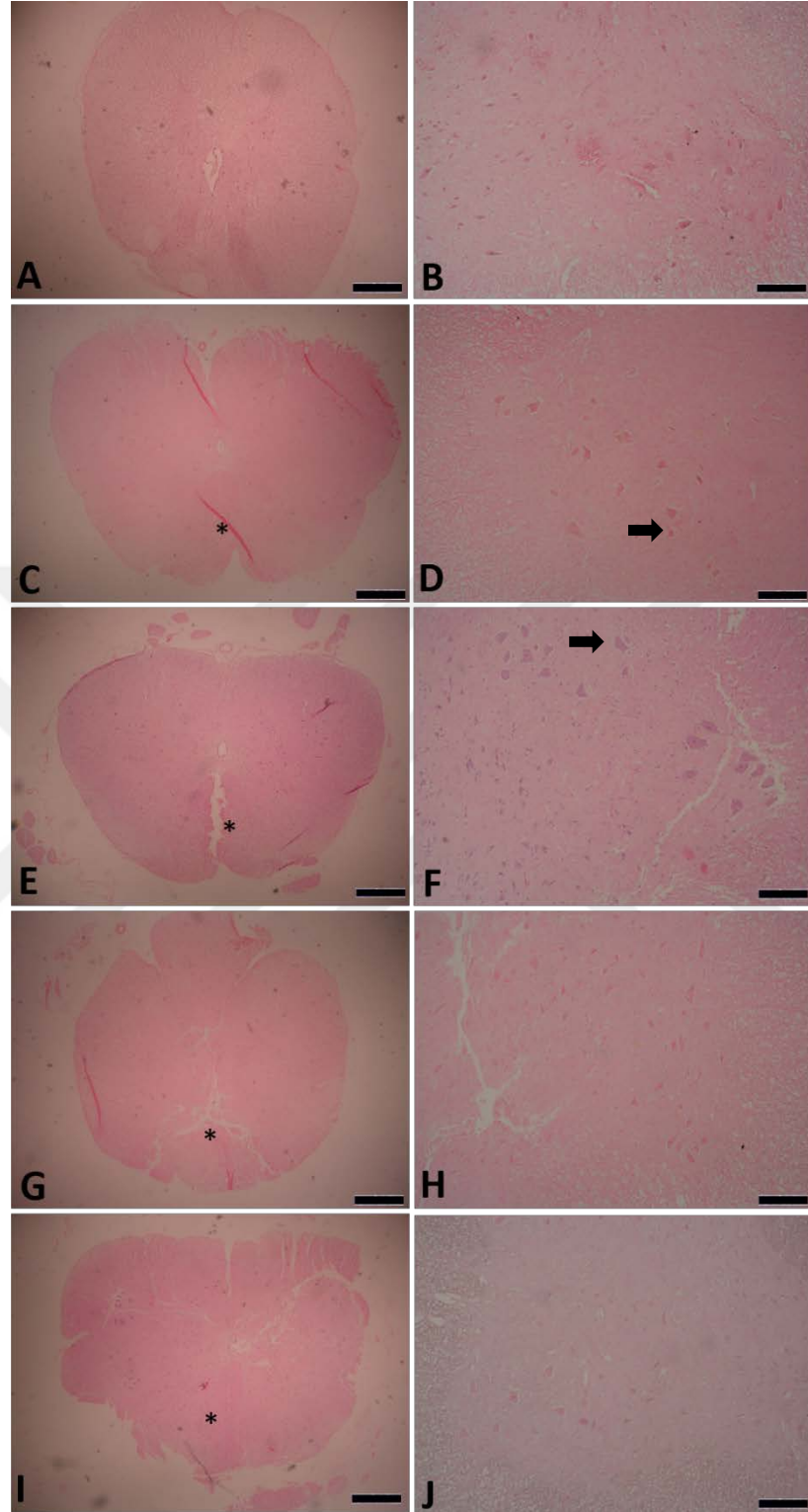
olduğu görülürken, glia hücre reaksiyonu derecesinin daha düşük ve yer yer olduğu, minimal fibrozis ve demiyelinizasyon, minimal infiltrasyongrld (Resim 6-7 E F).

3.3.4. Grup 4- Spinal kord hasarı ve ozon verilen grup

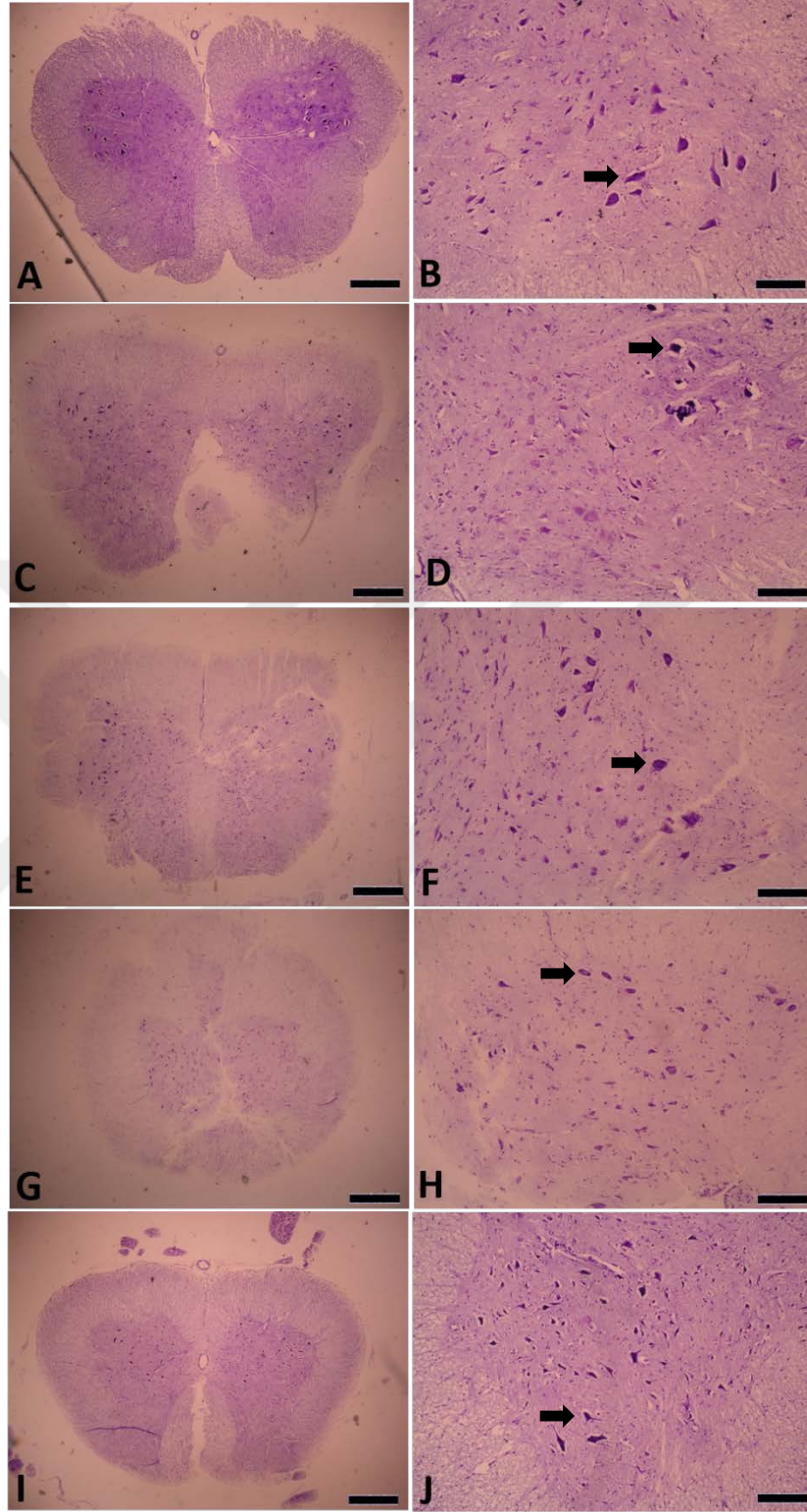
Bu gruba deneklere ait medulla spinalis kesitlerinininelenmesi sonucunda; gri cevher yapısında dejeneratif etkilerin olduğu fakat grup 2 ile grup 3 arasında bir görünüm olduğu saptandı. Hücrelerde silinme ve orta seviyede kromatoliz (Nissle cisimciklerindeki dağılmalar) varlığı saptandı, glia hücre reaksiyonu orta derecede ve tüm alanda hkim olduğu saptandı. Orta dereceli fibrozis, demiyelinizasyon ve infiltrasyonvarlığı görüldü (Resim 6-7 G H).

3.3.5. Grup 5 - Spinal kord hasarı sonrası metilprednizolon ve ozon verilen grup

Bu gruba deneklere ait medulla spinalis kesitlerinininelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının bozulduğu, nöron sayısının Grup 1'e göre azaldığı, hücre yapısının net izlendiğe, düşük dereceli glia hücre reaksiyonu, minimal dereceli fibrozis, demiyelinizasyon, ve inflamatuvar hücre infiltrasyon saptandı. Dural kalınlaşmanın kontrol grubuna benzer şekilde olduğu görüldü. Aksonal şişme ve aksonal sferoidlerin hemen hemen hiç görülmediği saptandı. Kontrol grubuna yakın bir histopatolojik görünümün hakim olduğu gözlendi (Resim 6-7 I J).



Resim 6. H&E boyaması genel görünümü. **A.**Grup14X, **B.** Grup 1 20X, **C.**Grup24X, **D.** Grup 2 20X, **E.**Grup34X, **F.** Grup 3 20X, **G.** Grup 44X, **H.** Grup 4 20X,**I.**Grup 54X, **J.** Grup 5 20X. *Cerrahi işleminden etkilenen alanlar. Nöral hücreler (siyah ok).



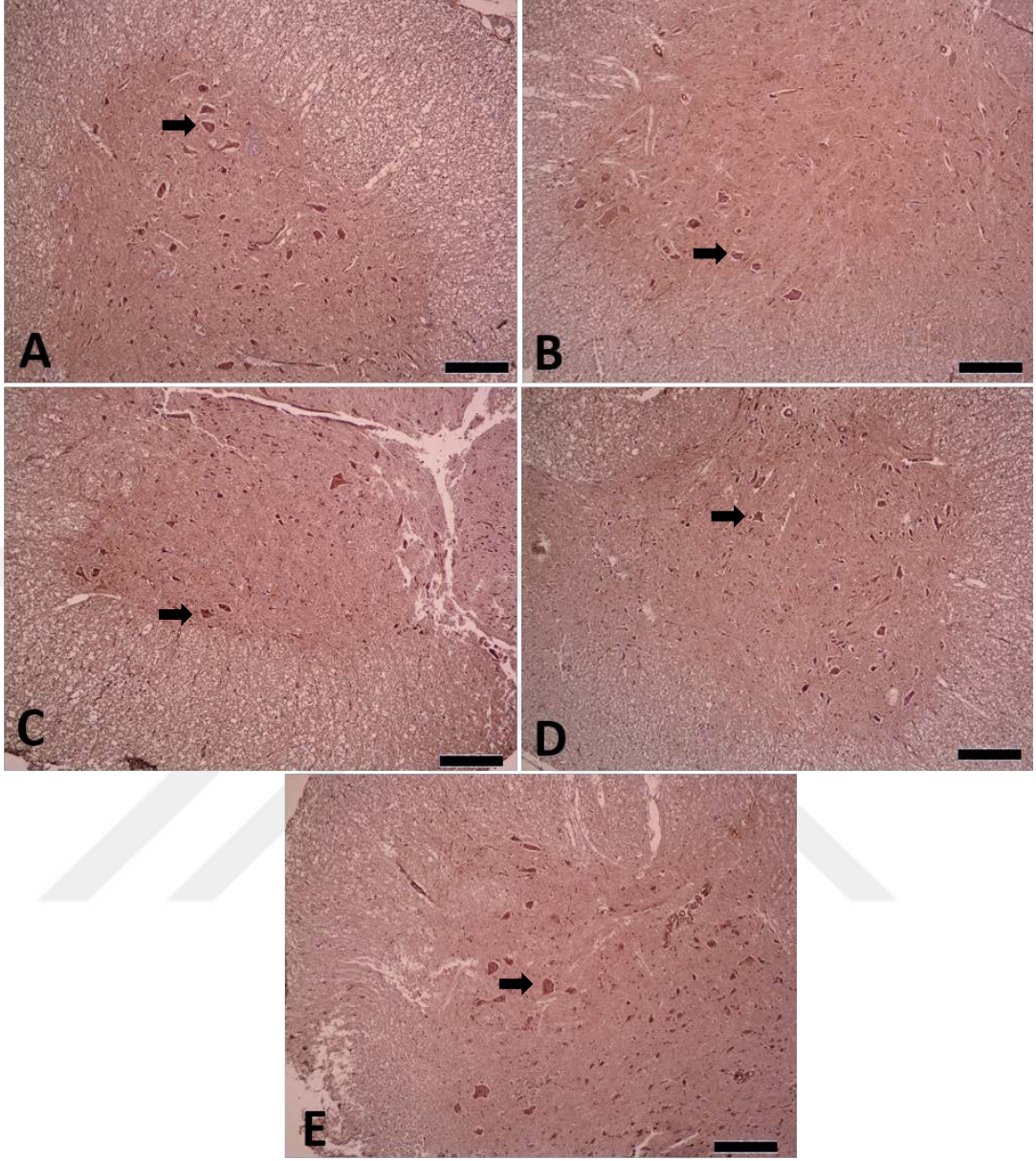
Resim 7. Crystal violet boyaması genel görünümü. **A.**Grup14X, **B.** Grup 1 20X, **C.**Grup24X, **D.** Grup 2 20X, **E.**Grup34X, **F.** Grup 3 20X, **G.** Grup 44X, **H.** Grup 4 20X, **I.**Grup 54X, **J.** Grup 5 20X. Nöral hücreler (siyah ok).

3.4. Anti-konneksin 43 Boyama

Anti-konneksin 43 boyamanın medulla spinalis dokusunda motor nöronlar, fibröz ve protoplazmik astrositler ve ependim hücrelerinde immunpozitif reaksiyon gösterdikleri saptanmıştır. Grup 1 de yukarıda bahsedilen tüm yapılarda immunpozitif reaksiyon hâkimdir. Grup 2 de ise motor nöronlarda kayıp ile bağlantılı olarak immunreaksiyonun bu hücrelerde düşük seviyede olduğu görülmektedir. Hücresel olarak da bu gruba ait örneklerdeki motor nöron perikaryonunda bazı kısımlarda noktasal reaksiyon vermektedir. Ayrıca glia reaksiyonuna bağlı olarak substatia alba fibröz astrositlerinde grup 1'e göre daha zayıf reaksiyon bulguları hâkimdir.

Grup 3, 4 ve 5'e bakıldığında Grup 3 ve 4 'ün Grup 1'e yakın olduğu; Grup 5'in ise daha iyi bulgular göstermek üzere grup 1'e daha yakın histopatolojik yapıda olduğu görülmektedir.

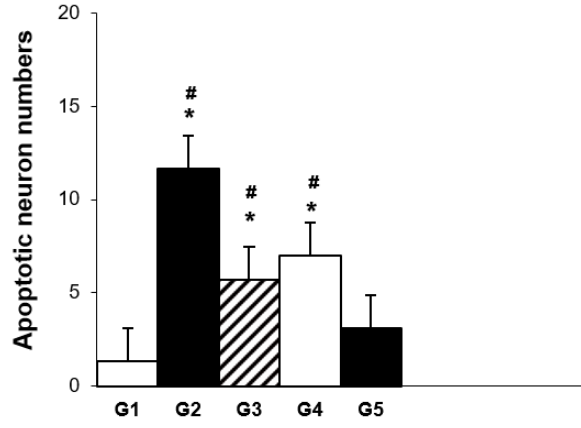
Yukarıdaki histopatolojik bulgular ışığında; Grup 5 te grup1'e benzer şekilde motor nöronlar, fibröz ve protoplazmik astrositler ve ependim hücrelerinde orta/yüksek dereceli immunpozitif reaksiyon gösterdikleri saptanmıştır (Resim 8).



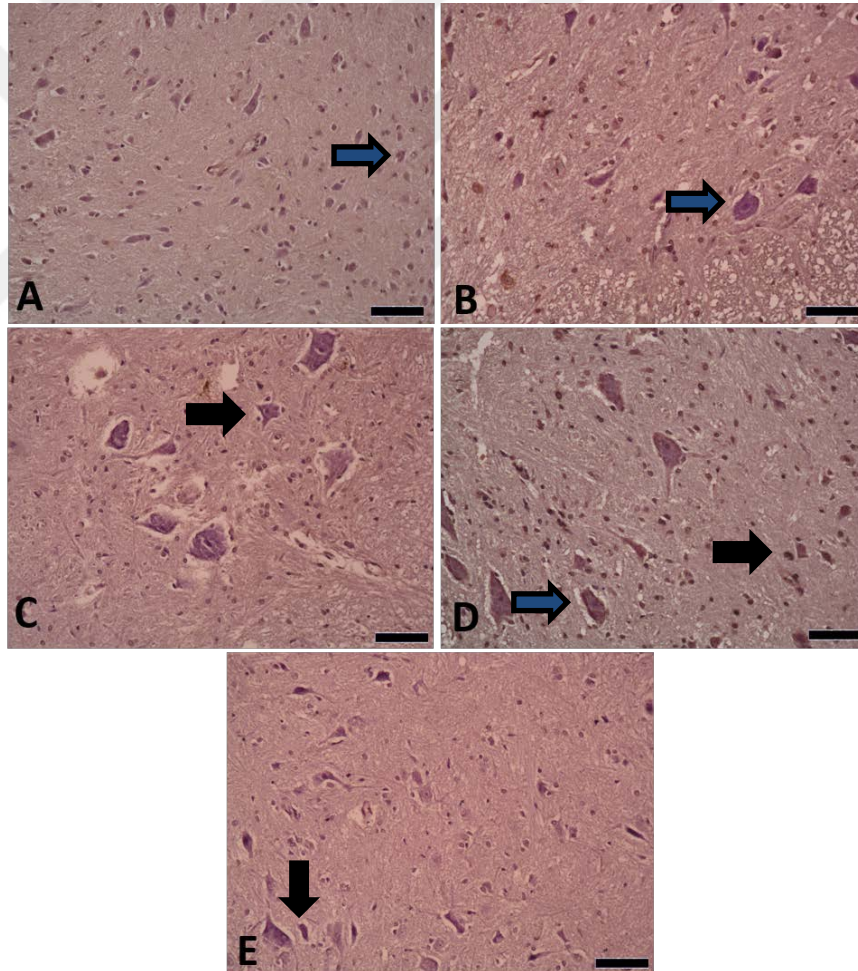
Resim 8. Anti-Konneksin 43 immün boyaması. **A.**Grup120X, **B.** Grup 2 20X, **C.**Grup 320X, **D.** Grup 4 20X, **E.**Grup520X. Nöral hücreler (siyah ok).

3.5. TUNEL boyama

Grup 2, 3 ve 4'te TUNEL pozitif hücre sayısı en yüksek iken, grup 5'teki pozitif hücre sayısı grup 1'e yakın olarak saptanmıştır (Grafik 1). Histopatolojik görüntüler resim 9 de verilmiştir.



Grafik 1. Gruplara ait TUNEL pozitif nöron sayısının istatistiksel değerlendirilmesi.
* $p < 0.001$, grup 1 ile kıyaslandığında; # $p < 0.001$, grup 5 ile kıyaslandığında.



Resim 9. TUNEL boyaması. A. Grup 1 40X, B. Grup 2 40X, C. Grup 3 40X, D. Grup 4 40X, E. Grup 5 40X. Multipolar nöral hücre (siyah ok). Astrofit (mavi ok).

3.6. Yarı niceliksel Derecelendirme Skalası

Histolojik olarak dokuların spinal kord hasarı sonrası ödem, doku nekrozu, kanama ve inflamasyon seviyeleri yarı niceliksel derecelendirme skalası kullanılarak puanlandı. Toplam puanlar istatistiksel olarak değerlendirilmeye alındı.

Tablo 36: Yarı niceliksel derecelendirme skalası(92)

Histolojik Tanım	Puan
Ödem	
• Ödemli doku yok	0
• Minimal ödem	1
• Orta derecede ödem	2
• Ağır ödem	3
Doku Nekrozu	
• Nekrotik doku yok	0
• %1-%10 nekroz	1
• %1-%25 nekroz	2
• %25 ten fazla nekroz	3
Kanama	
• Kanama yok	0
• Minimal kanama	1
• Orta derecede kanama	2
• Şiddetli kanama	3
İnflamasyon	
• İnflamatuar hücre yok	0
• Birkaç fokal hücre	1
• Fazla sayıda hücre	2
• Abse formasyonu	3

Tablo 37:Tüm grupların yarı niceliksel değerlendirme skalası sonuçları

Grup	Ödem	Kanama	Nekroz	İnflamasyon	Total
Ortalama	,0429	,0143	,0286	,0286	,1143
1,00 N	3	3	3	3	3
Standart sapma	,11339	,03780	,04880	,07559	,16762
Ortalama	2,3143	2,3143	1,6714	2,4857	8,7857
2,00 N	7	7	7	7	7
Standart sapma	,38048	,32367	,30394	,27946	,76470
Ortalama	1,9714	1,8286	1,4286	1,7429	6,9714
3,00 N	7	7	7	7	7
Standart sapma	,22147	,18898	,42314	,65027	1,14705
Ortalama	2,0286	1,7571	1,5286	1,6571	6,9714
4,00 N	7	7	7	7	7
Standart sapma	,23604	,34572	,49905	,82433	,91963
Ortalama	1,4000	1,2429	1,2286	1,2857	5,1571
5,00 N	7	7	7	7	7
Standart sapma	,44347	,55934	,44240	,42984	1,37581
Ortalama	1,5514	1,4314	1,1771	1,4400	5,6000
Total N	35	35	35	35	35
Standart sapma	,87022	,85844	,69835	,95431	3,15016

Histolojik olarak ödem, kanama, nekroz ve inflamasyonun değerlendirildiği skora göre toplam skorlara bakıldığında;

1. grup ile diğer gruplar arasında anlamlı derecede fark saptandı.

Tablo 38: Grup 1 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel sonuçlar

0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
------	------	------	------	------

Histolojik olarak ödem, kanama, nekroz ve inflamasyonun değerlendirildiği skora göre toplam skorlara bakıldığında;

2. grup ile 3,4,5. gruplar arasında anlamlı derecede fark saptandı.

Tablo 39:Grup 2 ile Grup 3,4, 5 karşılaştırıldığında istatistiksel sonuçlar

0.007	0.005	0.003
-------	-------	-------

Histolojik olarak ödem, kanama, nekroz ve inflamasyonun değerlendirildiği skora göre toplam skorlara bakıldığında;

3. grup ile 4. grup arasında anlamlı derecede fark saptanmadı. $p=0.89$

Histolojik olarak ödem, kanama, nekroz ve inflamasyonun değerlendirildiği skora göre toplam skorlara bakıldığında;

3. grup ile 5. gruplar arasında anlamlı derecede fark saptandı. $p=0.018$

Histolojik olarak ödem, kanama, nekroz ve inflamasyonun değerlendirildiği skora göre toplam skorlara bakıldığında;

4. grup ile 5. gruplar arasında anlamlı derecede fark saptandı. $p=0.018$



4. TARTIŞMA

Omurilik travmaları özellikle genç ve üretken toplumda görülme sıklığının yüksekliğe, fiziksel, psikososyal ve ekonomik açıdan oluşturduğu hasarın büyüklüğü nedeni ile günümüzde halen önemini sürdüren bir sağlık sorunudur. Literatürde kabul edilmiş bir tedavi protokolünün olmaması nedeni ile güncel araştırmalar halen devam etmektedir. Gerek fizyopatolojik çalışmalarda kaydedilmiş ilerlemelere gerekse güncel medikal tedavi yöntemlerine rağmen şu ana kadar yüksek doz metilprednizolon dışında klinik olarak etkinliği kanıtlanmış başka bir farmakolojik ajan bulunmamaktadır.

Omurilik travmaları kalıcı ve geri dönüşsüz motor defisitlere sebep olduğundan hastaların yaşam kalitesi olumsuz bir şekilde azalmıştır (103). Yüksek doz kortikosteroidler nörolojik yararlarının yanında ciddi yan etkilere de sahiptirler. Patolojisi ve farmakolojik tedavisi ile ilgili soru işaretlerini çözmek amacıyla omurilik yaralanması ile ilgili çalışmalar günümüzde halen devam etmektedir.

Deneyisel omurilik travması sonrası farmakolojik ajanlar tek başlarına veya metilprednizolon ile kombine bir şekilde gruplar oluşturularak uygulanmıştır. Bazı çalışmalarda kombine ilaç kullanımının tek başına metilprednizolon kullanımına üstünlüğü saptanmamıştır.

Mekanik etkiler ile ortaya çıkan primer hasarı takiben omurilikte gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri sekonder hasar olarak adlandırılır ve omuriliğin daha fazla zarar görmesine dolayısı ile hücre ölümünün devam etmesine neden olmaktadır. Primer hasarın medikal ve cerrahi tedavisi olmadığından kök hücre çalışmaları dışında yapılan diğer çalışmalar ikincil hasarı önlemeye yöneliktir (104).

Kortikosteroidler inflamasyon yanıtını azaltıcı ve lipit peroksidasyonunu önleyici etkiye sahiptirler(105). Omurilik hasarında en önemli etkisi lipit peroksidasyonunu önleyici olması ve diğer yardımcı etkileride sitokinler üzerine inhibitör etkisi, inflamatuvar hücrelerin inhibisyonu, hücreye kalsiyum girişinin engellenmesi ve de doku perfüzyonunu arttırıcı etkisidir (94). Metilprednizolonun etkileri prospektif, randomize, çift kör, çok merkezli klinik çalışmalar olan NASCIS (National Acute Spinal Cord Injury Study) ile ortaya konmuştur(70). NASCIS I

protokolünde metilprednizolon 1000 mg bolus ve sonrasında her 6 saatte bir 250 mg vererek 10 gün süre ile idame edilen dozlara kadar kullanılmış, fakat anlamlı sonuç elde edilememiştir. NASCIS II protokolünde ise çok daha yüksek dozda prednizolon kullanılmış ve travma sonrası ilk 8 saat içinde 30mg/kg bolus yapıp, 23 saat boyunca 5,4mg/kg/saat dozunda idame tedavisi uygulanan olgularda ilk 6 ay ve 12 ayda motor ve duyuşal skorlarda anlamlı fark görülmüştür. NASCIS III ise etkin olan metilprednizolonun idame süresi konusunda yapılmış olup, bir grupta idame süresi 48 saatte tamamlanmıştır. Bu durumda travmadan sonra 3 ila 8 saat arası metilprednizolon uygulanan olgularda eğer idame dozu 48 saate uzatılırsa motor ve duyuşal iyileşmenin 6. ve 12. ayda daha anlamlı bulunmuştur. Dolayısı ile şu an kortikosteroidler, omurilik hasarı için öngörülen ve en azından etkinliği klinik açıdan gösterilebilmiş en önemli ajandır(68).

Daha önceleri dezenfeksiyon ve sterilizasyon amacıyla kullanılan bir ajan olan ozon, günümüzde medikal tedavinin yetersiz kaldığı birçok hastalıkta kullanılmakta ve etkin sonuçlar gözlenmektedir(106). Medikal ozon tedavisi arterial dolaşım bozuklukları, dışsal ülserler ve deri lezyonları, kanser, patolojik barsak sorunlara, enfeksiyonlar ve viral kaynaklı hastalıklar, romatizmal hastalıklar (enflamatuvar, dejeneratif) gibi birçok hastalıkta tedavi veya var olan tedaviye ek tedavi olarak kullanılmaktadır. Medikal ozon tedavisinin majör ve minör otohemoterapi gibi sistemik uygulamalarının yanı sıra düşük basınçlı ozon uygulanması, intradiskal, intraartiküler, subkutanöz, paravertebral uygulama, vajinal insüflasyon, vezikoüretral insüflasyon, gibi lokal uygulamaları bulunmaktadır. Medikal ozon tedavisi ile dekonjesyonun hızlandığı ve ödem reabsorpsiyonun oluştuğu saptanmıştır(107).

Yamanel L. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada E.coli inokülasyonu ile oluşturulan sepsis modelinde 5 gün boyunca i.p yoldan verilen O2/O3 (0.7 mg/kg günlük) karışımının inflamasyonu ve septik ratların akciğerindeki hasarı azalttığı gösterilmiştir. Ozon tedavisi sistemik inflamatuvar süreçleri düzenleyerek dokulardaki oksidatif stresi azaltmıştır(108). Rasslan S. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada i.p ozon uygulamasının çekal ligasyon yapılan rat modelinde interlökin (IL-6, IL-10) ve sitokinle indüklenmiş nötrofil kemoatraktan-1 (CINC-1) serum seviyelerine, akut akciğer hasarı ve hayatta kalım süreleri üzerine etkisi incelenmiştir.

İ.p olarak (20 mL/kg, 102µg/mL) verilen ozon tedavisi inflamatuvar cevabı ve akut akciğer hasarını modüle etmekte fakat hayatta kalım süresini iyileştirmemektedir(109).

Ozonun antiinflamatuvar etkinliği ile ilgili pek çok çalışma vardır. Bu çalışmalarda ozonun etki mekanizmaları da araştırılmıştır. Uysal ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada deneysel uterin adezyon rat modelinde ozon tedavisinin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada adezyon indükledikten sonra 3 gün boyunca i.p olarak 0.7 mg/kg (günlük doz) dozda ozon/oksijen karışımı uygulanmış; bu tedavinin, TNF-alfa seviyeleri ve oksidatif/antioksidatif durumu modüle ederek postoperatif uterin adezyonlar önlediği gösterilmiştir(110).Daniluk ve arkadaşları 2000 yılında yapmış oldukları bir çalışmada vajinal enfeksiyonlara bağlı oluşan kronik üriner enfeksiyonlarında oksijen-ozon karışımını doğrudan uygulamışlardır. Uygulama ozonterapi tedavisinin antibiyotik tedavisine göre kronik inflamasyon tedavisinde istatistiksel olarak daha anlamlı ve düşük maliyette bulunmuştur. Ayrıca antibiyotiklerin sık kullanımına bağlı yan etkilerin de olmaması dikkati çekmektedir(111).Ceccherelli ve arkadaşlarının 1998 yılında yapmış oldukları bir çalışmada subcutan olarak uygulanan ozon oksijen karışımının antiinflamatuvar etkilerini göstermeye çalışmışlardır. Sıçanların pençelerinde inflamasyon oluşturmak için sağ pençelerine subkütan kapsaisin kullanmışlardır. Tedavi gruplarında farklı konsantrasyonlarda ozon oksijen karışımını uygulamışlardır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda ozon oksijen karışıma, inflamasyon uygulanan oluşturulan pençeye uygulanarak lokal etkisine bakılmış aynı zamanda yine ozon oksijen karışımının karşı pençedeki etkisini değerlendirmek için inflamasyon uygulanmayan pençeye farklı konsantrasyonlardaki ozon oksijen karışımının uygulandığı gruplar oluşturmuşlardır. Oluşturulan pençe ödemi pletismometre ile ölçmüşlerdir. Elde edilen bulgular ozonun farklı dozlarda farklı etkiler ortaya çıkarabildiğini desteklemiştir(112).

Çalışmamızda deneysel omurilik hasarı modeli oluşturulmuş sıçanlarda metilprednizolon, ozon, metilprednizolon ve ozonun birlikte kullanımının klinik, biyokimyasal ve histopatolojik belirteçlerle etkilerini inceledik. 7 gün süren çalışmanın ilk günü kontrol grubundaki 3 hayvan dışında kalan 28 hayvanda omurilik hasarı T9 seviyesinde oluşturuldu ve hayvanlar gruplara ayrıldı. 7 gün

boyunca tüm gruplar takip edildi. Motor güç ve davranış açısından Drummond and Moore, Modifiye Tarlov Skalası, Inclined Plane Test ve BBB skalalarıyla 1.3.5. ve 7.günde değerlendirildi. Bu izlem süresince genel olarak ikili tedavi alan grupta klinik iyileşmenin kontrol grubuna en yakın yani en iyi olduğu, bunu sırasıyla metilprednizolon tedavisi alan grup ve sonra ozon tedavisini alan grubun izlediği gözlemlendi. Klinik yanıt ikili tedavi grubunda en iyi saptandı. Hayvanların 7 günün sonunda kan örnekleri alınıp sakrifiye edildikten sonra histolojik inceleme için spinal kord doku örnekleri de alındı. Biyokimyasal olarak inflamasyon göstergesi olan IL-1 β , IL-6 ve Tnf- α düzeyleri çalışıldı. Metilprednizolon alan grupla ozon alan grup arasında bu belirteçler arasında anlamlı fark saptanmadı. Yalnız ozon alan grupla ikili tedavi alan grup kıyaslandığında IL-6 düzeyinin anlamlı olarak ikili tedavi grubunda daha düşük olduğu görüldü. Ozon'un yanına metilprednizolonun eklenmesinin anti inflamatuvar gücü arttırdığı yorumu yapıldı. Oksidan ve antioksidan durum açısından tüm gruplarda TOS ve TAS düzeyleri çalışıldı. Ozon tedavisi alan grupta TOS düzeyi metilprednizolon alan gruba kıyasla anlamlı derecede daha düşük saptanırken aynı fark TAS için saptanamadı. İkili tedavi alan grupta ise ozon alan gruba kıyasla anlamlı derecede TAS düzeyi yüksekti. Bu sonuca göre ozonun metilprednizolona kıyasla oksidan stresi daha iyi azalttığı, metilprednizolon ile birlikte verildiğinde ise TAS 1 arttırdığı yorumu yapıldı. Ancak bu oksidan ve antioksidan dengeye yararlı etkilerine rağmen ozon alan grupta klinik olarak metilprednizolon alan gruba bir üstünlük saptanamadığından birçok farklı mekanizmanın işin içine girdiği düşünüldü. Histopatolojik olarak hemotoksilen eozin boyama ile tüm gruplardan elde edilen dokularda kanama nekroz ödem ve inflamasyon bir skalaya göre puanlandı ve total skor oluşturuldu. Metilprednizolonun ve ozonun uzun zamandır anti inflamatuvar etkileri gösterilmiş olmakla birlikte ödem ve inflamasyonu azaltmakta metilprednizolon ozona kıyasla daha üstün bulundu. Ancak ikisinin birlikte verildiği grupta total skor diğer gruplara kıyasla daha iyi saptandı. Aditif etkiyle metilprednizolon ve ozonun klinikte omurilik hasarında birlikte kullanılmaları başarılı sonuçlara yol açabilir ancak bu konuda yapılmış bir insan çalışması henüz yoktur. Çalışmamıza başladığında literatürde omurilik hasarı deneysel modelinde ozonun etkilerini inceleyen başka bir çalışma henüz yoktu. Son zamanlarda ise nöropatik ağrı modeli oluşturulmuş sıçanlarda ozonun etkilerini

inceleyen bir çalışma (Lu ve ark) yapılmış ve ozonun etkili olduğu gösterilmiştir. Analjezik etkileri nedeniyle algoloji kliniklerinde önceden beri kullanılan ozon, ilk defa çalışmamızda omurilik hasarında sahip olduğu anti inflamatuvar etkileri nedeniyle etkili olacağı düşünülerek incelenmiş ve bugün tüm dünyada kabul görmüş olan omurilik hasarı tedavisinde en etkili tedavi yöntemi olan metilprednizolon tedavisiyle kıyaslanmaya çalışılmıştır. Histolojik incelemelerde ayrıca krezil viyole boyası ile tüm gruplardan elde edilen kesitlerde nöron sayısına bakıldı ve kontrol grubuna en yakın olan yani en iyi olan grubun ikili tedavi grubu olduğu görüldü. Ozon alan grupla metilprednizolon alan grup arasında anlamlı fark saptanamadı. TUNEL tekniğiyle apoptozisin değerlendirildiği çalışmamızda yine ikili tedavi de TUNEL pozitif hücre sayısının kontrol grubuna en yakın yani en az olduğu sırasıyla metilprednizolon ve ozon grubunu bunu izlediği saptanmış olup ikili tedavinin apoptozisi engellemede daha etkili olduğu gösterilmiştir. Anti konneksin 43 immün boyamada en çok anti konneksin-43 pozitif boyanan hücrenin olduğu grup ikili tedavi grubu olmuştur. Metilprednizolon ve ozon grupları arasında ise anlamlı bir fark saptanamamıştır.

Çelik ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada deneysel omurilik hasarı modeli oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla metilprednizolon ve adalimumab verilen gruplarda 3., 5. ve 7. günlerde yapılan eğik düzlem tırmanma testi açılarında anlamlı derecede artış saptanmış olup adalimumab ve/veya metilprednizolon verilmesi anlamlı fark yaratmamıştır. 5. ve 7. günde Tarlov testi ile yapılan motor değerlendirmede ise her iki ilacın birlikte verilmesinin ayrı ayrı verilmelerine kıyasla daha iyi sonuca yol açtığı gösterilmiştir (93).

Sayın ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde alfa-lipoik asitin doz bağımlı ve metilprednizolon ile karşılaştırmalı tedavinin etkilerini inceleyen bir çalışmada, travmadan 24 saat sonra yapılan eğik düzlem tırmanma testi sonuçlarına göre metilprednizolon ve alfa-lipoik asit verilen grupların travma grubuna göre tırmanma testi açılarının anlamlı derecede arttığı saptanmış olup; metilprednizolon ve alfa-lipoik asit grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır (113).

Bizim çalışmamızda da, 5.ve 7. günlerde yapılan eğik düzlem tırmanma testinde metilprednizolon ve ozon tedavisi alan gruplar karşılaştırıldığında sonuçta

anlamli fark saptanmamış olup($p=0,52$; $p=0,47$), her iki ilacın beraber uygulandığı grubun sonuçları ise hem metilprednizolon hem de ozon tedavisi alan gruba göre anlamli derecede iyi bulunmuştur. Sırasıyla $p=0,02$; $p=0,02$; $p=0,02$; $p=0,008$.

Yaman ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde hiperbarik oksijen tedavisinin etkilerini inceleyen bir çalışmada DM skalası ile deneklerin motor güçleri kıyaslanmış olup tedavi alan grupta omurilik hasarı ve sham grubuna kıyasla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir (92).

Bizim çalışmamızda, sadece metilprednizolon ve sadece ozon tedavisi alan gruplar arasında 7. gün DM skorları arasında anlamli fark saptanmadı. Her iki tedaviyi alan grubun DM skoru ise hem metilprednizolon hem de ozon tedavisi alan gruba kıyasla anlamli derecede daha yüksekti. Sırasıyla $p=0,6$; $p=0,007$; $p=0,005$.

Kahveci ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı oluşturulmuş sıçanlarda metilprednizolon ve rosuvastatinin etkilerini inceleyen çalışmada BBB testi ile yapılan davranış derecelendirmesinde her iki ilaç da sham grubuna üstün bulunmakla beraber birbirlerine üstünlük gösterememişlerdir (114).

Sayın ve ark.'nın yaptığı metilprednizolon ve alfa-lipoik asitin deneysel omurilik yaralanmasında etkilerini inceleyen çalışmada BBB testi ile yapılan değerlendirmeye göre her iki tedavi de travma grubuna göre faydalı bulunmuştur (113).

Bizim çalışmamızda omurilik hasarı grubuna kıyasla her üç tedavi grubunun BBB skoru anlamli derecede yüksek saptanmış olup metilprednizolon ve ozon tedavisi alan gruplar karşılaştırıldığında anlamli bir fark saptanamamıştır ($p=0,07$; $p=0,01$; $p=0,001$). Ancak her iki tedaviyi de alan grubun BBB skoru metilprednizolon ve ozon tedavisini tek başına alan gruplara kıyasla anlamli derecede yüksek saptanmıştır ($p=0,001$; $p=0,002$).

Kahveci ve ark.'nın yaptığı metilprednizolon ve rosuvastatinin deneysel omurilik hasarında etkilerini inceleyen bir çalışmada her iki ilacın da MDA düzeylerini spinal kord hasarı grubuna göre anlamli derecede azalttığı gösterilmiş olup antioksidan etkilerine atıfta bulunulmuştur (114).

Sayın ve ark.'nın metilprednizolon ve alfa-lipoik asitin omurilik hasarı üzerine doz bağımlı etkilerini inceleyen çalışmalarında her iki ilacın MDA düzeylerini omurilik hasarı grubuna göre anlamli düzeyde azalttığı gösterilmiş olup;

her iki ilacın kendi aralarındaki karşılaştırmalarında MDA düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmamış olup antioksidan etkilerinden bahsedilmiştir (113).

Çelik ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada deneysel omurilik hasarı modeli oluşturulan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla omurilik hasarı oluşturulan grupta MDA, IL-1 β , IL-6, Tnf- α düzeylerinde anlamlı derecede artış saptanmış. Adalimumab ve/veya metilprednizolon ile tedavi edilen her üç grupta da bu dört inflamatuvar molekül düzeyleri omurilik hasarı grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Bunun yanında adalimumab ve metilprednizolonun birlikte verildiği tedavi grubunda IL-1 β , IL-6, Tnf- α düzeyleri tekli tedavi alan gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük izlenmiş olup bu uygulamanın antiinflamatuvar gücü arttırdığını göstermiştir (93).

Bizim çalışmamızda ise sadece ozon tedavisi alan gruba kıyasla metilprednizolon ve ozon tedavisini birlikte alan grupta IL-6 düzeyi anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0,01). Ancak IL-1 β ve Tnf- α düzeyleri bu gruplar arasında farklı saptanmamıştır. Ayrıca metilprednizolon tedavisi alan gruba ozon tedavisi alan grup kıyaslandığında hiçbir inflamatuvar sitokin düzeyi anlamlı farklı saptanmamıştır. IL-1 β ve Tnf- α düzeylerinin her iki tedaviyi alan gruba sadece ozon tedavisi alan grup karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamasının nedeni olarak ozonun omurilik hasarında klinik iyileşmeden bağımsız olarak antioksidan etkisinin metilprednizolona yakın düzeyde olmasına bağlıyoruz. Yani ozon, histopatolojiyi ve kliniği düzeltme yeteneğinin az olması yanında bu etkilerinden bağımsız bir antioksidan özellik sergilemektedir.

Aras ve ark.'nın deneysel omurilik hasarında minosiklinin etkilerini incelediği bir çalışmada TAS ve TOS düzeyi, minosiklin verilen grupta omurilik hasarı grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu çalışmada omurilik hasarında TAS ve TOS düzeyleri birlikte yüksek bulunmuş olup travmaya verilen endojen kompensatuar bir mekanizma olarak TAS düzeyinin yükseldiği öngörülmüştür (115).

Kökoğlu ve ark.'nın deneysel omurilik hasarında eritropoetin ve tadalafilin etkilerini incelediği bir çalışmada, doku ve serum MDA ve TAS düzeyleri ölçülmüştür. En düşük serum ve doku MDA düzeyi eritropoetin tedavisi alan grupta

saptanırken, en yüksek serum TAS düzeyi tadalafil grubunda en yüksek doku TAS düzeyi ise eritropoetin grubunda saptanmıştır (116).

Bizim çalışmamızda ise serum TOS ve TAS düzeyleri ölçülmüştür. TAS düzeyi ozon tedavisi alan grupta en düşük, ozon ve metilprednizolon tedavisini beraber alan grupta ise en yüksek saptanmıştır. TOS düzeyi ise en yüksek metilprednizolon alan grupta, en düşük ise metilprednizolon ve ozon tedavisini birlikte alan grupta saptanmıştır. TAS açısından ikili tedavi alan gruptaki TAS düzeyi ozon grubuna göre anlamlı derecede yüksekken, metilprednizolon alan grupla arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,04$; $p=0,84$).

TOS düzeyi açısından metilprednizolon grubu ile ozon grubu ve ikili tedavi grubu kıyaslandığında ise metilprednizolon grubunda TOS düzeyi anlamlı derecede yüksekti ($p= 0,03$; $p=0,02$). İkili tedavi grubunda TOS düzeyinin en düşük olması ozon ve metilprednizolonun oksidan stresi azaltmakta birbirlerinin etkisini potansiyelize ettiğini göstermektedir. Ancak TAS düzeyi ikili tedavi grubunda ozon grubuna göre yüksekken metilprednizolon grubuna göre yüksek saptanmadı. Bu da antioksidan kapasiteyi esas arttıran bileşenin metilprednizolon olduğunu desteklemektedir. Ayrıca Aras ve ark.'nın yaptığı çalışmada da bahsedildiği gibi TAS düzeyleri endojen kompensatuar mekanizmalardan daha hızlı etkilenmekte olup birçok intrasellüler mekanizmadan etkileniyor gibi görünmektedir. Koç ve ark.'nın yaptığı deneysel spinal kord hasarında boraxın etkilerini inceleyen bir çalışmada da sham grubu ile spinal kord hasarı grubunda TAS düzeyleri yakın bulunup tedavi grubunda ise düşük bulunmuş olup tutarsız sonuçlar elde edilmiştir (117).

Yaman ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde hiperbarik oksijen tedavisinin etkilerini inceleyen bir çalışmada, histopatolojik incelemede bizim çalışmamızda da kullandığımız histolojik hasar derecelendirme skalası kullanılmıştır. Bu skalaya göre hiperbarik oksijen tedavisi alan grupta ödem nekroz ve kanama skorları ile toplam skor spinal kord hasarı grubuna kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuş olup hiperbarik oksijen tedavisinin omurilik hasarında yararlı olacağı görüşüne varılmıştır (92).

Bizim çalışmamızda hayvanlar sakrifiye edildikten sonra T9 seviyesinde omurilik hasarı oluşturulan bölgeyi ve 1 cm üstü ile 1 cm altını içine alacak şekilde doku örnekleme yapılmıştır. Ortalama total skor en düşük 0,11 ile sağlıklı kontrol

grubunda; en yüksek 8,78 ile omurilik hasarı grubunda saptanmıştır. Metilprednizolon alan grup ile ozon tedavisi alan grubun total skorları eşit olup 6,97 saptanmıştır. Her iki tedaviyi birlikte alan grupta ise skor sadece metilprednizolon veya ozon alan gruba kıyasla anlamlı derecede düşük saptanmış olup 5,15 tir $p=0,018$.

Çelik ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde adalimumab ve metilprednizolonun nöroprotektif etkilerini inceleyen çalışmada da bizim çalışmamızla benzer şekilde metilprednizolonla beraber adalimumab verilen grupta histolojik hasar total skoru ayrı ayrı metilprednizolon ve adalimumab alan gruplara kıyasla anlamlı derecede düşük saptanmıştır. Detaylı olarak incelendiğinde ise ödem ve kanama skorlarında tedavi gruplarına kıyasla anlamlı bir fark olmamasına karşın, nekroz ve inflamasyon tedavi gruplarının hepsinde anlamlı derecede düşük saptanmıştır (93).

Bizim çalışmamızda ise ödem, kanama, nekroz ve inflamasyon ayrı ayrı değerlendirildiğinde, en yüksek skor omurilik hasarı grubunda, en düşük skor ise ikili tedavi grubunda saptanmıştır. Özel olarak metilprednizolon verilen grup incelendiğinde ise ozona kıyasla ödemi ve nekrozu daha iyi azalttığı, kanama ve inflamasyon için ise ozona göre daha etkisiz olduğu görüldü.

Kahveci ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde rosuvastatin ve metilprednizolonun etkilerini inceleyen çalışmada, grupların total skorları kıyaslandığında metilprednizolon alan grupla rosuvastatin alan grup arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Omurilikteki nöron sayısı metilprednizolon alan grupla rosuvastatin alan grup arasında anlamlı derecede farklı bulunmamıştır ancak, her iki gruptaki nöron sayısı omurilik hasarı grubundaki nöron sayısından anlamlı derecede yüksek bulunmuş olup her iki tedavinin de nöroprotektif etkisinin olduğu yorumu yapılmıştır (114).

Bizim çalışmamızda da krezil viyole boyası ile tüm gruplarda nöron sayıları saptanmıştır. En çok nöron sayısı kontrol grubunda saptanmış olup sırasıyla ikili tedavi grubu, metilprednizolon grubu, ozon grubu ve omurilik hasarı grubu bunu izlemiştir. Metilprednizolonla beraber ozon verilmesinin nöron sayısındaki azalmayı önemli ölçüde önlediği görülmüştür. Her iki ilacın da nöroprotektif özellikleri olduğu düşünülmektedir.

Omurilik hasara, travmaya cevap olarak doğal immün sistemin inflamatuvar yanıtıyla sekonder olarak daha komplike hale gelir. Daha önceki çalışmalar peritravmatik bölgeden aşırı salınan ATP, düşük afiniteli P2X7 reseptörlerini aktive ederek omurilik hasarına inflamatuvar yanıtta katkıda bulunmaktadır. Ancak konneksin 43 bir sıkı bağlantı proteini de olduğundan doku bütünlüğünün korunmasında önemli göreve sahiptir.

Konnexin yarım kanalları astrositik ATP salınımı için önemli bir yol olduğundan Huang ve ark.nın yaptığı bir çalışmada astrositlerdeki konneksinlerin delesyonunun post travmatik ATP salınımına etkisi araştırılmıştır. Konneksin 43 delesyonu olan farelerde normal farelere kıyasla yüksekte düşme sonrası immunfloresan mikroskopta görülen ATP salınımında önemli derecede azalma saptanmıştır. Ayrıca konneksin 43 eksik olan farelerde astrogliazis ve mikroglia aktivasyonunun az olduğu ve motor iyileşmenin daha hızlı olduğu travmatik lezyonun daha küçük olduğu saptanmıştır. Bu gözlemlere dayanarak astrositik konneksin 43 yarım kanallarının post travmatik ATP salınımını artırarak sekonder hasarı şiddetlendirdiği yorumu yapılmıştır (118).

Bizim çalışmamızda da anti konneksin 43 boyası ile tüm gruplardan elde edilen histolojik kesitler boyandığında kontrol grubunda anti konneksin 43 yüksek derecede pozitif saptanmış olup bu düzeye en yakın immün pozitiflik ikili tedavi grubunda saptanmıştır. Metilprednizolon alan grupla ozon tedavisi alan grupta ise immün pozitif boyanma daha düşük saptanmış olup spinal kord hasarı grubundan daha iyidir. Bu sonuca bakılırsa histolojik iyileşmenin daha iyi olduğu ikili tedavi grubunda anti konneksin 43 düzeyinin sağlıklı gruba en yakın olmasa, histolojik olarak doku morfolojisinin değerlendirildiği skorlama sistemi ile uyumlu olarak doku çatısının ve hücre bütünlüğün daha iyi korunduğunu destekler niteliktedir.

Zhou ve ark.'nın yaptığı deneysel omurilik hasarı modelinde kalsitriolün etkisini inceleyen çalışmada, histolojik kesitlerde apoptozisi gösteren TUNEL tekniğiyle yapılan immünhistokimyasal çalışmada kontrol grubunu TUNEL negatif boyanmış olup omurilik hasarında TUNEL diffüz pozitif saptanmıştır. Kalsitriol tedavisi alan grupta ise TUNEL pozitiflik oranı azalmıştır (119).

Bizim çalışmamızda da tüm gruplardan alınan histolojik kesitlerde kontrol grubuna en yakın düzeyde en düşük TUNEL boyanması gösteren grup ikili tedavi

grubu olmuştur. Bunu metilprednizolon grubu ozon grubu ve omurilik hasarı grubu izlemiştir. Burada da her iki tedavinin birlikte verilmesi apoptozisa, ayrı verilmelerine kıyasla daha iyi engellediğini gösterilmiştir.

Tüm bu veriler ışığında ozonun metilprednizolona yakın düzeyde anti inflamatuvar etkisi olduğu gösterilmiştir. Ancak ozonun omurilik hasarı modelinde klinik izlemde ve histopatolojik değerlendirmede metilprednizolon tedavisine iyi bir alternatif olamayacağı saptanmıştır. Metilprednizolon tedavisine ek olarak ozon tedavisinin verilmesinin omurilik hasarında tek başına metilprednizolon tedavisine kıyasla antiinflamatuvar etkide artma, klinik düzelmede hızlanma ve histolojide iyileşmeye yol açtığı görülmüştür. Bu çalışma ikili tedavinin, omurilik hasarı tedavisinde tek başına metilprednizolona kıyasla daha yararlı olabileceğini göstermiştir. Yapılacak olan yeni çalışmaların sonuçlarımızı desteklemesi ile ikili tedavinin rutin kullanıma gireceğine inanmaktayız.

ÖZET

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA OZON UN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

GİRİŞ ve AMAÇ: Omurilik yaralanması patofizyolojisinde primer ve sekonder hasar mekanizmaları mevcuttur. Tedavi çalışmalarının büyük çoğunluğu akut dönemdeki sekonder nörotoksik oluşumları engellemeyi ya da bu sürecin ilerlemesini durdurmayı amaçlar.

Akut omurilik yaralanması tedavisinde evrensel bir tedavi protokolü geliştirilebilmiş değildir.

Tıbbi tedavide kullanılan ozonun güçlü anti-inflamatuar etkilerinin olduğu bulunmuştur. İmmun sistemi de aktive eden ozon antioksidan sistem üzerinde güçlü etkiye sahiptir.

Bu çalışmanın amacı deneysel omurilik hasarında ozonun nöroprotektif etkilerine, metilprednizolon etkileri ile karşılaştırmalı olarak biyokimyasal, histopatolojik ve nörolojik iyileşme açısından değerlendirmektir.

YÖNTEM: Çalışmamızda 31 adet Wistar Albino türü dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar sham grubunda 3 sıçan olmak üzere her biri 7 sıçan içeren rastgele 5 gruba ayrıldı.. Grup 1 (sham): Sadece laminektomi uygulanan grup, Grup 2 (kontrol): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra 0,5 cc serum fizyolojik uygulanan kontrol grubu, Grup 3 (ilaç): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Metilprednizolon 30 mg/kg IP uygulanan grup, Grup 4 (ilaç): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Ozon 60 µg/ml, 0,7 mg/kg IP uygulanan grup, Grup 5 (ilaç): Laminektomi ve travma uygulamasından 1 saat sonra Metilprednisolon 30 mg/kg IP + Ozon 60 µg/ml, 0,7 mg/kg IP uygulanan grup olarak düzenlendi. Cerrahi işlem sonrasında tüm sıçanlara nörodavranışsal testler uygulandı. 7 günlük takip süreci sonunda sıçanlar sakrifiye edildi ve travma alanından alınan örnekler Hematoksilen&Eosin, Cresyl Violet, İmmunohistokimya (antikonneksin-43) ve Tunel boyaları uygulanarak değerlendirmeye alındı. Alınan kan örneklerinde ise IL-1β, IL-6, TNF-α, Total Oksidan Status (TOS), Total Antioksidan Status (TAS) düzeyleri bakıldı.

BULGULAR: Nörodavranışsal, histopatolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerin sonuçları karşılaştırıldığında; ozon ve metilprednizolon tedavisini birlikte alan grupta nörodavranışsal iyileşmenin tek tedavi alan gruplara göre daha fazla olduğu gözlemlenmiş ve aralarında anlamlı fark bulundu. Biyokimyasal olarak inflamasyon göstergesi olan IL-1 β , IL-6, TNF- α düzeyleri incelendiğinde IL-6 düzeyinin ikili tedavi grubunda daha düşük olduğu yani antiinflamatuvar gücün arttığı görüldü(p=0,01). TAS ve TOS düzeyleri açısından bakıldığında ozonun metilprednizolona kıyasla oksidan stresi daha iyi azalttığı görüldü(p=0,03). Histopatolojik olarak, antiinflamatuvar etki açısından metilprednizolon ozona üstün bulunurken ikili tedavi grubunda bu etkinin daha fazla olduğu gözlemlendi. Yine ikili tedavi grubunda nöron sayısı kontrol grubuna yakın bulunurken, apoptotik hücre sayısı en az bu tedavi grubunda bulunmuştur(p<0,001).

TARTIŞMA ve SONUÇ: Akut omurilik yaralanmalarında metilprednizolon tedavisine ek olarak ozon tedavisinin verilmesinin omurilik hasarında tek başına metilprednizolon tedavisine kıyasla antiinflamatuvar etkide artma, klinik düzelmede hızlanma ve histolojide iyileşmeye yol açtığı görülmüştür. Bu çalışma ikili tedavinin, omurilik hasarı tedavisinde tek başına metilprednizolona kıyasla daha yararlı olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Metilprednizolon, Ozon, Spinal kord hasarı, IL-1 β , IL-6, TNF- α , TAS, TOS

ABSTRACT

EVALUATION OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECT OF OZONE IN EXPERIMENTAL SPINE INJURY MODEL

INTRODUCTION AND AIM: The pathophysiology of spine injury consists of primary and secondary damage mechanisms. The vast majority of the treatment trials aim to prevent the secondary neurotoxic formations in the acute period or at least stop the progression of it.

A universal treatment protocol for acute spinal cord injuries has not yet been developed.

It has been recently discovered that medical ozone therapy has powerful anti-inflammatory effects. Ozone, which also activates the immune system, has a strong effect on the antioxidant system.

The aim of this study is to evaluate neuroprotective effect of ozone in experimental spine injury model comparatively in terms of recovery in biochemical, histological and neurological parameters.

METHODS: 31 Wistar Albino female rats were included to study. Rats were divided into 5 groups randomly, 7 in each group except sham group which had 3 rats. Group 1 (sham): only laminectomy was performed; group 2 (control): laminectomy and trauma were performed and 1 hour after trauma 0,5 cc of saline isotonic was applied; group 3 (medicine): 1 hour after laminectomy and trauma were performed , methylprednisolone 30mg /kg IP was applied; group 4 (medicine): 1 hour after laminectomy and trauma were performed, ozone 60µg/ml, 0,7 mg/kg IP was applied; group 5 (medicine): 1 hour after laminectomy and trauma were performed , both methylprednisolone 30mg /kg IP and ozone 60µg/ml, 0,7 mg/kg IP were applied. After neurosurgery, neuro-behavioural tests were performed in all groups. At the end of 7 days of follow-up, all the rats were sacrificed. Biopsy specimens taken from trauma sites were examined by using Hematoksilen&Eosin, Cresyl Violet, immunohistochemical (anticonnexin -43) and Tunel dying processes. IL-1β, IL-6, TNF-α, Total Oxidant Status (TOS) and Total Antioxidant Status (TAS) levels were measured in blood samples.

FINDINGS: When the results of neurobehavioral, histopathological and biochemical evaluations are compared; neurobehavioral healing in the group which received both ozone and methylprednisolone treatments was better when compared to the groups with single treatment element, and the difference between the groups was significant. When biochemical inflammation indicators such as IL-1 β , IL-6, TNF- α levels were compared; IL-6 level was minimum at the combination therapy group, which proved that antiinflammatory power was better at this group. (p=0,01). Although when TAS and TOS levels were compared, it was seen that ozone reduced oxidant stress more than methylprednisolone (p=0,03), histopathological examination revealed that methylprednisolone had more powerful antiinflammatory effect compared to ozone. Nevertheless, combination therapy group had the most powerful antiinflammatory effect on histopathological examination. Also, combination therapy group had neuron numbers close to control group and apoptotic cell number was minimum at combination therapy group. (p<0,001).

DISCUSSION AND CONCLUSION: In acute spinal injury , combination therapy of methylprednisolone and ozone increases antiinflammatory effect, fastens clinical recovery and increases histological recovery when it is compared to methylprednisolone therapy alone. This study proves that combination therapy may have more beneficial effect in the spinal cord injury when it is compared to methylprednisolone therapy alone.

KEY WORDS: methylprednisolone, ozone, spinal cord injury, IL-1 β , IL-6, TNF- α , TAS, TOS

KAYNAKLAR

1. Çavdar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi OvOCEMZvAFÖ, 2.baskı s:15-17 Meta basım. 2002.
2. Impellizzeri D, Esposito E, Mazzon E, Paterniti İ, Di Paola R, Bramanti P, et al. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochemical pharmacology*. 2012;83(10):1413-26.
3. Yusuf SŞ, Ömer B, Sevil AV. Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimentally Induced Spinal Cord Trauma. *L Clin Anal Med*. 2012.
4. Ertuğrul U, Uğur F, Osman E, Harun A, Adnan T, Celal Y, Sinan D, Nebahat T. Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi. *Türk Nörol Derg*. 2011.
5. Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian RJ. Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Current opinion in neurology*. 2002;15(6):713-20.
6. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical neuropharmacology*. 2001;24(5):254-64.
7. Lifshutz J, Colohan A. A brief history of therapy for traumatic spinal cord injury. *Neurosurgical focus*. 2004;16(1):E5.
8. Ohnishi ST, Barr JK, Katagi C, Katsuoka M. Protection of rat spinal cord against contusion injury by new prostaglandin derivatives. *Arzneimittel-Forschung*. 1989;39(2):236-9.
9. Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates. The father of spine surgery. *Spine*. 1999;24(13):1381-7.
10. Sonntag VK. The development of spinal neurosurgery: a historical perspective. *Neurosurgery*. 2007;60(4):587-8.
11. Naderi S, Ture U, Pait TG. History of the spinal cord localization. *Neurosurgical focus*. 2004;16(1):E15.

12. Naderi S, Andalkar N, Benzel EC. History of spine biomechanics: part I--the pre-Greco-Roman, Greco-Roman, and medieval roots of spine biomechanics. *Neurosurgery*. 2007;60(2):382-90; discussion 90-1.
13. Dohrmann GJ. Experimental spinal cord trauma. A historical review. *Archives of neurology*. 1972;27(6):468-73.
14. Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *Journal of neurosurgery*. 1971;35(6):700-8.
15. Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*. 2002;27(14):1504-10.
16. Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Muia C, Meli R, et al. Effect of cyclopentanone prostaglandin 15-deoxy-delta12,14PGJ2 on early functional recovery from experimental spinal cord injury. *Shock*. 2008;30(2):142-52.
17. Zilela, M., Deneysel omurilik yaralanması, in Omurilik ve omurga cerrahisi, M. Zilela, Editor. . 2002.
18. Merih İ, Taner T, Hakan Y, Fevzullah A, Aylin A, Ferruh G, Mustafa U. The Use of Methylprednisolone, Vitamin E and Their Combination in Acute Spinal Cord Injury: An Experimental Study. *Turkish Neurosurgery*. 2006.
19. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Klosek M, Krol W. The beginnings of modern research on propolis in poland. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*. 2013;2013:983974.
20. Hosnuter M, Gurel A, Babuccu O, Armutcu F, Kargi E, Isikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*. 2004;30(2):121-5.
21. Teke Z, Bostanci EB, Yenisey C, Sacar M, Simsek NG, Akoglu M. Caffeic acid phenethyl ester alleviates mesenteric ischemia/reperfusion injury. *Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2012;25(6):354-65.
22. Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR journal*. 2007;48(4):385-95.

23. Hasturk A, Atalay B, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altinors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turkish neurosurgery*. 2009;19(4):353-9.
24. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology*. 1995;5(4):407-13.
25. Namiki J, Kojima A, Tator CH. Effect of brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, and neurotrophin-3 on functional recovery and regeneration after spinal cord injury in adult rats. *Journal of neurotrauma*. 2000;17(12):1219-31.
26. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Progress in neurobiology*. 1998;56(3):341-58.
27. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery*. 1991;75(1):15-26.
28. Nemecek S. Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Advances in neurology*. 1978;20:395-405.
29. Eaton MJ. Cell and molecular approaches to the attenuation of pain after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(3-4):549-59.
30. Naderi S, Zileli M, Özer A.F: Omurga Cerrahisinin Tarihçesi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed. Zileli M, Özer A.F, 2.baska, cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir. 2002.
31. Taylor CP, Vartanian MG, Andruszkiewicz R, Silverman RB. 3-alkyl GABA and 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents. *Epilepsy research*. 1992;11(2):103-10.
32. Petroff OA, Rothman DL, Behar KL, Lamoureux D, Mattson RH. The effect of gabapentin on brain gamma-aminobutyric acid in patients with epilepsy. *Annals of neurology*. 1996;39(1):95-9.
33. Vehbi Gülmen, M.Z., Omurilik yaralanmalarında farmakolojik tedavi, in Omurilik ve omurga cerrahisi, M. Zilela, Editor. 2002.
34. Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. *Science*. 2002;295(5557):1029-31.

35. Tator CH. Acute spinal cord injury: a review of recent studies of treatment and pathophysiology. Canadian Medical Association journal. 1972;107(2):143-5 passim.
36. Wallace MC, Tator CH, Frazee P. Relationship between posttraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. Neurosurgery. 1986;18(4):433-9.
37. Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends in neurosciences. 1988;11(10):465-9.
38. Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. Annals of neurology. 1988;23(6):623-6.
39. Meldrum B. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. Clinical science. 1985;68(2):113-22.
40. Pointillart V, Petitjean ME, Wiart L, Vital JM, Lassie P, Thicoipe M, et al. Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase. Spinal cord. 2000;38(2):71-6.
41. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurgery. 1999;44(5):1027-39; discussion 39-40.
42. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. Critical reviews in toxicology. 1993;23(1):21-48.
43. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. Biyokimya Dergisi. 1995.
44. Barut S, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, Cokneseli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. Neurosurgical review. 1993;16(1):53-9.
45. Sakamoto A, Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogawa R. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. Brain research. 1991;554(1-2):186-92.
46. Uzan M. Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatolojia, In Hancı M; Medulla spinalis yaralanmaları 2000.

47. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(14):5395-406.
48. Zhang F, Kong D, Chen L, Zhang X, Lian N, Zhu X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma interrupts angiogenic signal transduction by transrepression of platelet-derived growth factor-beta receptor in hepatic stellate cells. *Journal of cell science*. 2014;127(Pt 2):305-14.
49. Zhang Z, Krebs CJ, Guth L. Experimental analysis of progressive necrosis after spinal cord trauma in the rat: etiological role of the inflammatory response. *Experimental neurology*. 1997;143(1):141-52.
50. Bethea JR, Dietrich WD. Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Current opinion in neurology*. 2002;15(3):355-60.
51. Farmer SF, Harrison LM, Ingram DA, Stephens JA. Plasticity of central motor pathways in children with hemiplegic cerebral palsy. *Neurology*. 1991;41(9):1505-10.
52. Bjorklund A, Stenevi U. Regeneration of monoaminergic and cholinergic neurons in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*. 1979;59(1):62-100.
53. Ildan F, Polat S, Oner A, Isbir T, Cetinalp E, Kaya M, et al. The effect of the treatment of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K(+)/Mg(+2) ATPase activity and lipid peroxidation and ultrastructural findings following cerebral contusion in rat. *Surgical neurology*. 1995;44(6):573-80.
54. Yusuf S, Pais P, Sigamani A, Xavier D, Afzal R, Gao P, et al. Comparison of risk factor reduction and tolerability of a full-dose polypill (with potassium) versus low-dose polypill (polycap) in individuals at high risk of cardiovascular diseases: the Second Indian Polycap Study (TIPS-2) investigators. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes*. 2012;5(4):463-71.
55. Shi Y, Wu X, Gong Y, Qiu Y, Zhang H, Huang Z, et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Current eye research*. 2010;35(10):930-7.
56. Ellison D: *Neuropathology. A reference text of CNS pathology*. Mosby International ltd. Grafos SA. Barcelona. 1998.

57. Zhang Z, Guth L. Experimental spinal cord injury: Wallerian degeneration in the dorsal column is followed by revascularization, glial proliferation, and nerve regeneration. *Experimental neurology*. 1997;147(1):159-71.
58. Mautes AE, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. *Physical therapy*. 2000;80(7):673-87.
59. Rhoney DH, Luer MS, Hughes M, Hatton J. New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy*. 1996;16(3):382-92.
60. Polat E, Elvan Ö, Bağrıyanık A, Kuyumcu M, Atalay A. Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması. *Turk Anest Rean Der*. 2010.
61. Buss A, Brook GA, Kakulas B, Martin D, Franzen R, Schoenen J, et al. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain: a journal of neurology*. 2004;127(Pt 1):34-44.
62. Kaptanoğlu, E., Omurilik yaralanmaları sonrası nöral korunma stratejilere, in Omurilik ve omurga cerrahisi, M. Zilela, Editor. 2002.
63. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(3-4):264-80.
64. Grulova Ī, Slovinska L, Nagyova M, Cizek M, Cizkova D. The effect of hypothermia on sensory-motor function and tissue sparing after spinal cord injury. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 2013;13(12):1881-91.
65. Nakano N, Nakai Y, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, et al. Effects of bone marrow stromal cell transplantation through CSF on the subacute and chronic spinal cord injury in rats. *PloS one*. 2013;8(9):e73494.
66. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sorensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiology of disease*. 2014;62:338-53.
67. Avci CB, Gunduz C, Baran Y, Sahin F, Yilmaz S, Dogan ZO, et al. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2011;137(1):41-7.

68. Marion DW. Head and spinal cord injury. *Neurologic clinics*. 1998;16(2):485-502.
69. Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Experimental neurology*. 1997;148(2):464-74.
70. Nesathurai S. Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. *The Journal of trauma*. 1998;45(6):1088-93.
71. Geisler F, Coleman, W, Grieco G; The Role of GM-1 Ganglioside in Acute Spinal Cord Injury: Results of the Sygen(R) Multicenter Trial 15 December 2001.
72. Agrawal SK, Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 1996;16(2):545-52.
73. Tatlı, M., Guzel,A , Ökten,A , Çaylı, S, Omurilik Yaralanmalarının Medikal Tedavisi. *Cumhuriyet üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005.
74. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, et al. Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy. *Clinical neuropharmacology*. 2001;24(5):265-79.
75. Tator CH. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury. *Injury prevention: journal of the International Society for Child and Adolescent Injury Prevention*. 2002;8 Suppl 4:IV33-6.
76. Weir B. Calcium antagonists, cerebral ischemia and vasospasm. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 1984;11(2):239-46.
77. Xu RX, Nakamura T, Nagao S, et al: Specific inhibition of apoptosis after coldinduced brain injury by moderate postinjury hypothermia. *Neurosurg*. 1998.
78. Tüzgen S, Kaynar MY, Güner A, et al: The effect of epidural cooling on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1998.

79. Ikeda O, Murakami M, Ino H, Yamazaki M, Nemoto T, Koda M, et al. Acute up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. *Acta neuropathologica*. 2001;102(3):239-45.
80. Yılmaz,İ:Nöroprotektif tedavide yeni bir ilaçhedefi:İkinci jenerasyon tetrasiklinler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fak.Dergisi 2007.
81. Rajiv Saini. Ozonone therapy in dentistry: A strategic review. *J. Nat Sci Bioll Med*. 2011.
82. Rowland FS. Stratispheric ozone depletion. *Phil Trans R Soc B*. . 2006.
83. Viebahn-Haensler R. Genel Bilgi: Ozonun Tıpta Kullanımı Medikal Ozon Oksijen Derneği 2005.
84. Bocci V. Oxygen-ozon therapy: a vriyical evaluation. Springer. . 2002.
85. Stubinger S, Sader R, Filippi A. The use of ozone in dentistry and maxillofacial surgery: a review. *Quintessence international*. 2006;37(5):353-9.
86. Muto M, Ambrosanio G, Guarnieri G, Capobianco E, Piccolo G, Annunziata G, et al. Low back pain and sciatica: treatment with intradiscal-intraforaminal O(2)-O (3) injection. Our experience. *La Radiologia medica*. 2008;113(5):695-706.
87. Bocci V, Borrelli E, Travagli V, Zanardi I. The ozone paradox: ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. *Medicinal research reviews*. 2009;29(4):646-82.
88. Bocci V. Ozone as a bioregulator. *Pharmacology and toxicology of ozonetherapy today. Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 1996;10(2-3):31-53.
89. Viebahn-Hänsler R, León Fernández OS and Fahmy Z. *Ozone in Medicine: The Low-Dose Ozone Concept—Guidelines and Treatment Strategies*. Ozone: Science & Engineering. 2012.
90. Bocci V, Zanardi İ, Travagli V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical gas research*. 2011;1(1):6.
91. Lapchak PA, Araujo DM, Song D, Zivin JA. Neuroprotection by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 results in improvements in behavioral deficits induced by reversible spinal cord ischemia. *Stroke*. 2001;32(5):1220-5.

92. Yaman O, Yaman B, Aydin F, Var A, Temiz C. Hyperbaric oxygen treatment in the experimental spinal cord injury model. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 2014;14(9):2184-94.
93. Celik H, Karatay M, Erdem Y, Yildirim AE, Sertbas İ, Karatay E, et al. The Biochemical, Histopathological and Clinical Comparison of the Neuroprotective Effects of Subcutaneous Adalimumab and Intravenous Methylprednisolone in an Experimental Compressive Spinal Cord Trauma Model. *Turkish neurosurgery*. 2016;26(4):622-31.
94. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine journal: official journal of the North American Spine Society*. 2004;4(4):451-64.
95. Robertson J, Beaulieu JM, Doroudchi MM, Durham HD, Julien JP, Mushynski WE. Apoptotic death of neurons exhibiting peripherin aggregates is mediated by the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of cell biology*. 2001;155(2):217-26.
96. Taoka Y, Okajima K, Murakami K, Johno M, Naruo M. Role of neutrophil elastase in compression-induced spinal cord injury in rats. *Brain research*. 1998;799(2):264-9.
97. Gariballa SE, Hutchin TP, Sinclair AJ. Antioxidant capacity after acute ischaemic stroke. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 2002;95(10):685-90.
98. Rice-Evans C, Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods in enzymology*. 1994;234:279-93.
99. Deitch AD, Moses MJ. The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1957;3(3):449-56.
100. Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke*. 2009;40(3 Suppl):S8-12.
101. Korfalı E, Zileli M. *Temel Nöroşirürji*. Türk Nöroşirürji Derneği, Ankara. 2010.
102. Snell SR. *Klinik Nöroantomi*. Nobel Yayıneva, İstanbul. 2000.

103. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Green ES. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *Journal of neurosurgery*. 1982;56(1):106-13.
104. Ilhan A, Koltuksuz U, Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *European journal of cardio-thoracic surgery: official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 1999;16(4):458-63.
105. Espersen GT, Ernst E, Vestergaard M, Pedersen JO, Grunnet N. Changes in PMN leukocyte migration activity and complement C3d levels in RA patients with high disease activity during steroid treatment. *Scandinavian journal of rheumatology*. 1989;18(1):51-6.
106. Bocci V, Larini A, Micheli V. Restoration of normoxia by ozone therapy may control neoplastic growth: a review and a working hypothesis. *Journal of alternative and complementary medicine*. 2005;11(2):257-65.
107. Fahmy Z. Ozon-sauerstofftherapie in der rheumatologi . *Proceedings 5. Ozon-Weltkongress*. . 1981.
108. Yamanel L, Kaldirim U, Oztas Y, Coskun O, Poyrazoglu Y, Durusu M, et al. Ozone therapy and hyperbaric oxygen treatment in lung injury in septic rats. *International journal of medical sciences*. 2011;8(1):48-55.
109. Souza YM, Fontes B, Martins JO, Sannomiya P, Brito GS, Younes RN, et al. Evaluation of the effects of ozone therapy in the treatment of intra-abdominal infection in rats. *Clinics*. 2010;65(2):195-202.
110. Binda MM, Molinas CR, Koninckx PR. Reactive oxygen species and adhesion formation: clinical implications in adhesion prevention. *Human reproduction*. 2003;18(12):2503-7.
111. Daniluk M, Fryczkowski M, Wielicki Z. Application of ozonotherapy in chronic inflammation of the urinary bladder. *Ortopedia, traumatologia, rehabilitacja*. 2000;2(1):61-3.
112. Ceccherelli F, Gagliardi G, Faggian L, Loprete F, Giron G. Analgesic effect of subcutaneous administration of oxygen-ozone. A blind study in the rat on the modulation of the capsaicin-induced edema. *Acupuncture & electro-therapeutics research*. 1998;23(3-4):171-84.

- 113.Sayin M, Temiz P, Var A, Temiz C. The dose-dependent neuroprotective effect of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury. *Neurologia i neurochirurgia polska*. 2013;47(4):345-51.
- 114.Kahveci R, Gokce EC, Gurer B, Gokce A, Kisa U, Cemil DB, et al. Neuroprotective effects of rosuvastatin against traumatic spinal cord injury in rats. *European journal of pharmacology*. 2014;741:45-54.
- 115.Aras M, Urfali B, Serarslan Y, Ozgur T, Ulutas KT, Urfali S, et al. Protective effects of minocycline against short-term ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Pediatric neurosurgery*. 2013;49(3):172-8.
- 116.Kokoglu C, Delen E, Arslantas A, Arslantas D, Kokoglu B, Ozbek Z, et al. Therapeutic efficacy of tadalafil and erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*. 2016;22(6):521-5.
- 117.Koc ER, Gokce EC, Sonmez MA, Namuslu M, Gokce A, Bodur AS. Borax partially prevents neurologic disability and oxidative stress in experimental spinal cord ischemia/reperfusion injury. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*. 2015;24(1):83-90.
- 118.Huang C, Han X, Li X, Lam E, Peng W, Lou N, et al. Critical role of connexin 43 in secondary expansion of traumatic spinal cord injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(10):3333-8.
- 119.Zhou KL, Chen DH, Jin HM, Wu K, Wang XY, Xu HZ, et al. Effects of calcitriol on experimental spinal cord injury in rats. *Spinal cord*. 2016;54(7):510-6.