

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA
HESPERİDİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Dr. Hasan Ali AYDIN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Şanser GÜL

ZONGULDAK

2014

T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA
HESPERİDİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ

Dr. Hasan Ali AYDIN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Şanser GÜL

ZONGULDAK

2014

TEZ ONAY TUTANAĞI

Tezin Teslim Edildiği Üniversite/Fakülte: Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tez Başlığı : Ratlarda Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Hesperidin'in Nöroprotektif Etkisi

Tez Yazarı : Arş. Gör. Dr. Hasan Ali AYDIN

Tez Savunma Tarihi: 07/07/2014

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Şanser GÜL

Prof. Dr. Bektaş AÇIKGÖZ
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Şanser GÜL
Üye

Prof. Dr. Kadir KOTİL
Üye

UYGUNDUR
08/09/2014

Prof. Dr. Serçuk KEŞER

Dekan Vekili



ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimi sürecinde, ilk günden itibaren bana her türlü desteği sağlayan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, hoşgörü ve içtenliğini hiçbir zaman esirgemeyen başta değerli hocalarım; Prof. Dr. Bektaş AÇIKGÖZ, Prof. Dr. Murat KALAYCI, Doç. Dr. Şanser GÜL, Yrd. Doç. Dr. Nurullah EDEBALI' ye, asistan eğitimimin son bölümünde birlikte çalışma fırsatı bulduğum değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet Deniz BELEN, Yrd. Doç. Dr. Aydemir KALE, Yrd. Doç. Dr. Çetin AKYOL'a, tezimin tamamlanmasında emeği geçen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Murat CAN'a ve preperatların hazırlanması ve histopatolojik değerlendirmesinde katkıda bulunan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Burak BAHADIR'a, sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde emeği geçen Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Çağatay BÜYÜKUYSAL' a şükran ve teşekkürlerimi sunarım. Beraber çalıştığım asistan arkadaşlarım; Uzm. Dr. Mazhar Müfit ÜNAL, Uzm. Dr. Hasan Ocak, Uzm. Dr. Hakan PAZARLI, Uzm. Dr. Emrah KESKİN, Dr. Evren AYDOĞMUŞ'a, Dr. Eren Görkem GÜN'e, beraber çalışmaktan büyük mutluluk ve gurur duyduğum kliniğimizin tüm hemşire ve personel ekibine en içten teşekkürü bir borç bilirim. Her zaman sevgi ve sabır ile bana destek olan anneme, babama, ablalarım ve sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Bengü Gülhan AYDIN'a en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunmak isterim.

Dr. Hasan Ali AYDIN
ZONGULDAK, 2014

ÖZET

Aydın HA., Ratlarda Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Hesperidinin Nöroprotektif Etkisi, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Uzmanlık Tezi. Zonguldak, 2014.

Amaç: Ratlarda deneysel spinal kord travması oluşturup bu model üzerinden biyokimyasal ve elektronmikroskopik inceleme yaparak, hesperidin'in oksdiatif hasara karşı koruyucu etkisini doza bağımlı araştırmayı amaçladık.

Yöntem: Çalışma 4 grup ve her grupta 10 adet wistar Albino cinsi rat olacak şekilde planlandı.

G1: Sadece laminektomi

G2: Laminektomi +Ekstradural klip

G3: Laminektomi+Ekstradural klip+Düşük doz hesperidin (50 mg/kg)

G4: Laminektomi+Ekstradural klip+Yüksek doz hesperidin (100 mg/kg)

Laminektomiler torakal 7-10 seviyesinde yapıldı. Spinal kord travması, ekstradural klip 1 dakika süre ile uygulanarak oluşturuldu. G3 grubuna 50 mg /kg G4 grubuna ise 100 mg /kg hesperidin travmayı takiben intraperitoneal olarak uygulandı. Denekler 24. saatin sonunda sakrifiye edildi.

Bulgular: Lipid peroksidasyon son ürünü olan malonildialdehit (MDA) düzeylerinde ilaç gruplarında (G3,G4) istatistiki olarak anlamlı derecede azalma tespit edilemedi. Serum Total antioksidan seviyeleri (TAS) incelendiğinde de belirgin fark gözlenmedi. Deneysel spinal kord travma sonrasında alınan spinal kord örneklerinin morfolojik incelemesinde G2 ve G3 gruplarının nöron sayılarında belirgin azalma tespit edilmiştir. Yüksek doz hesperidin uygulanan G4 grubunun nöron sayısında kontrol grubuna benzerlik tespit edilmiştir.

Sonuç: Elde edilen bu bulgular hesperidinin spinal kord travması sonrasında oluşan nöronal kayıpta belirgin düzelme sağlanmasında etkili olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hesperidin, spinal kord yaralanması, nöroprotektif etki

ABSTRACT

Aydın H A., Neuroprotective Effect of Hesperidin on Experimental Spinal Cord Injury in Rats, Bülent Ecevit University Faculty of Medicine, Thesis of Neurosurgery, Zonguldak, 2014.

Objective: In this study we aimed to investigate the dose-dependent protective effect of hesperidin against to oxidative damage by using biochemical and electron-examination in experimental spinal cord injury in rats.

Method: This study was planned as 4 groups and In each group there were 10 Wistar albino rats. G1: laminectomy was performed; G2: laminectomy was performed and extradural clip was applied; G3: laminectomy was performed, extradural clip was applied and low dose hesperidin was given (50 mg/kg); G4: laminectomy was performed, extradural clip was applied and high dose hesperidin was given (100 mg/kg). Thoracal 7-10 laminectomy was performed. Spinal cord injury was created by applying the extradural clip for one minute. 50 mg/kg hesperidin was administered to G3 and 100 mg/kg hesperidin was administered to G4 intraperitoneally after trauma. Rats were sacrificed at the end of 24 hours.

Results: In the drug groups (G3, G4), It was no statistically significant decrease on plasma levels of malondialdehyde (MDA) which is the end product of lipid peroxidation and plasma levels of total antioxidant status (TAS) was examined, it was no significant differences was observed. When spinal cord samples which were taken after the experimental spinal cord trauma are examined morphologically, a significant reduction in the number of neurons was determined in G2 and G3 groups. High dose hesperidin treated group (G4) compared to control group, the neuron numbers were similar.

Conclusion: These findings suggest that Hesperidin can be effective to provide significant improvement on neuronal loss

Keywords: Hesperidin, spinal cord injury, neuroprotective effect

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
TABLO DİZİNİ	x
ŞEKİL DİZİNİ	xi
RESİM DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi	5
2.1.1. Primer Hasar	6
2.1.2. Sekonder Hasar.....	7
2.1.2.1. Sistemik Etkiler	11
2.1.2.2. Lokal Vasküler Etkiler	11
2.1.2.3. Eksitotoksitite.....	12
2.1.2.4. Kalsiyum ve Diğer Elektrolitler ile İlişkili Sekonder Hasar	16
2.1.2.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu.....	18
2.1.2.6. Apoptoz	23
2.1.2.7. Gen Ekspresyonu ve İmmünolojik Sekonder Hasar	25
2.1.2.8. Sekonder Hasarda Mitokondrinin Rolü	26
2.2. Nitrik Oksit	27
2.3. Spinal Kord Hasarının Patolojisi	29
2.3.1. Erken Dönem Patolojisi.....	30
2.3.2. Subakut Dönem Patolojisi	31
2.3.3. Kronik Dönem Patolojisi.....	31
2.4. Omurilik Travmasında Tanı.....	32
2.5. Flavonoiedler ve Hesperidin	37
2.5.1. Flavonoidlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri.....	38

2.6. Modern Farmakoterapi Çalışmaları	39
2.6.1. Kortikosteroidler	40
2.6.2. 21-Aminosteroidler (Lazoroidler)	41
2.6.3. Opioid Reseptör Antagonistleri	42
2.6.4. Gangliozidler	43
2.6.5. Tirotropin Salıcı Hormon (TRH) ve TRH Analogları.....	43
2.6.6. Antioksidanlar ve Serbest Radikal Yakalayıcılar	43
2.6.7. Kalsiyum Kanal Blokörleri	44
2.6.8. Magnezyum	45
2.6.9. Sodyum Kanal Blokörleri (TTX)	45
2.6.10. Araşidonik Asit Metabolizması Modülatörleri.....	46
2.6.11. Diğer Tedavi Denemeleri	46
3. MATERYAL VE METOD	48
3.1. Deney Grupları	48
3.2. Anestezi	48
3.3. Travma Aygıtı.....	48
3.4. Cerrahi Girişim	48
3.5. Fonksiyonel İyileşmenin Değerlendirilmesi	51
3.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler	52
3.7. Histopatolojik ve Morfometrik Değerlendirme	54
3.8. İstatistiksel Değerlendirme	54
4. BULGULAR	55
4.1. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	55
4.2. Morfometrik Sonuçlar.....	56
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇ	64
7. KAYNAKLAR	65
8. EKLER.....	81
Ek 1: Etik Kurul Onayı	81

KISALTMALAR DİZİNİ

5HT1	: Serotonin antagonisti
5HT2	: Serotonin antagonisti
AH	: Fenolik antioksidanlar
AMPA	: Amino-3-hidroksi-5-metil-4-isoxazole
ark.	: Arkadaşları
ATPaz	: Adenozintrifofataz
BCL-2	: B-hücreli lenfoma 2
BDNF	: Brain-derived neurotrophic factor
BT	: Bilgisayarlı tamagrafi
C3	: Kompleman 3
CAT	: Katalaz
CGRP	: Calcitonin gene related peptide
EGF	: Epidermal growth faktör
EPC-K1	: Vitamin C ve Vitamin E 'ye bir fosfat diester bağlanmış hali
GR	: Glutatyon Redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HOCL	: Hipoklorik asit
İL1	: İnterlökin 1
İL-6	: İnterlökin 6
iNOS	: Nitrik oksit sentaz
LOOO.	: Lipid peroksit
MDA	: Malondialdehit
MP	: Metil prednizolon
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
mRNA	: Messenger ribonükleik asit
MSS	: Merkezi sinir sistemi
NGF	: Nerve growth faktör
NMDA	: N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik Oksit
NO ₂	: Nitrojen dioksit

OH	: Hidroksil radikali
ONOO-	: Peroksinitrit
PARG	: (Poly(adenozin difosfatriboz)glikohidrolaz)
PARS	: Poly-ADP Riboz Sentetaz
PGI2	: Prostosiklin
PMNL	: Poli morfonükleer lökosit
PNL	: Poli nükleer lökosit
ROO-	: Peroksil
ROP	: Reaktif Oksijen Partikülleri
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
RT-PCR	: Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu
SCI	: Spinal kord injury
SKY	: Spinal Kord Yaralanması
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SSS	: Santral sinir sistemi
TAS	: Total Antioksidan Seviyesi
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TM	: Tirilazat mestilat (U74600F)
TNF	: Tümör nekroz faktör
TRH	: Tirotropin salıverici hormon
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon

TABLO DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Deneysel omurilik yaralanma modellerinin tarihçesi	4
Tablo 2: Deneysel omurilik yaralanma modelleri.....	5
Tablo 3: İnsan omurilik yaralanmasında primer mekanizmalar	6
Tablo 4: Sekonder yaralanma mekanizmaları.....	8
Tablo 5: Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma mekanizmaları	19
Tablo 6: Reaktif oksijen partikülleri	19
Tablo 7: Akut spinal kord hasarının patolojisi.....	29
Tablo 8: Spinal kord hasarının kronik dönem patolojisi.....	32
Tablo 9: Omurilik hasarında yol gösteren klinik veriler	33
Tablo 10: ASIA /IMSOP hasar skalası	35
Tablo 11: Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler.....	37
Tablo 12: TAS çalışma prosedürü.....	53
Tablo 13: MDA ve TAS değerleri	55
Tablo 14: Nöron sayıları ile ilgili değerler.....	56

ŞEKİL DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Travma sonrasında sekonder hasar mekanizmaları	9
Şekil 2: Sekonder hasarda lokal faktörlerin etkisi.....	10
Şekil 3: Malondialdehit (MDA).....	23
Şekil 4: Antioksidan mekanizmalar	23
Şekil 5: NO ve/veya peroksinitrit ilişkili nörotoksitite	28
Şekil 6: Flavonoid (2-fenil-1,4-benzo piron)	37
Şekil 7: İskelet yapılarına göre flavonoidler	38
Şekil 8: Laminektomi sonrası spinal kord.....	50
Şekil 9: Klip kompresyon uygulaması	50
Şekil 10: Inclined plane testi (yandan görünüş).....	51
Şekil 11: Inclined plane testi (üstten görünüş).....	52

RESİM DİZİNİ

<u>Resim</u>	<u>Sayfa</u>
Resim 1: G1 (laminektomi) grubunda nöronların düzenli dağılım gösterdiği normale yakın histolojik özelliklerin izlendiği spinal kordun mikroskopik görünümü (H&E; X100).	57
Resim 2: G2 (laminektomi+klip) grubunda ödem, hemoraji ve gri maddedebelirgin nöronal dejenerasyon (H&E; X100) – (sağ alt köşede nöron hücre kaybı kristal viyole boyası ile gösterilmiştir).	57
Resim 3: G3 (Düşük Doz) grubunda nöron dejenerasyonunda ve hücre kaybında G2 grubuna kıyasla görece azalma (H&E; X100).	58
Resim 4: G4 (yüksek doz) grubunda, dejeneratif değişikliklerde ve hücre kaybında belirgin azalma (H&E; X100) – (sağ alt köşede nöron hücre kaybı kristal viyole boyası ile gösterilmiştir).	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik, beyin ile vücut arasında duysal ve motor sinyallerin geçtiği bağlantı noktasıdır. Majör omurilik yaralanmaları sonrasında beyindeki inen ve çıkan nöral sistemlerin omurilikteki bağlantıları bozulur ve lezyon altında değişen derecelerde motor ve duyu kaybı gelişir. Akut travmatik omurilik yaralanmasının dünyadaki yıllık görülme sıklığı milyonda 15-40 olarak bildirilmiştir (1). Kuzey Amerika'da 2002 yılı verilerine göre, her yıl ortalama 10.00 yeni akut omurilik yaralanma olgusu, İngiltere'de 2004 yılı verilerine göre, yıllık 700 yeni akut omurilik olgusu bildirilmektedir. Türkiye'de ise yılda ortalama 1600-2000 ciddi akut omurilik yaralanması olgusu bildirilmektedir (2). Omurilik yaralanması hasta ve ailelerine ciddi fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik yıkım oluşturur. Toplumsal düzeyde de problem yaratır, çünkü sıklıkla sağlıklı 15-25 yaş arası gençlerde görülür. Erkek/kadın oranı 4/1 dir (3). 25 yaşında, yüksek servikal tetraplejik bir hastanın hayat boyu bakımının 3 milyon dolar olduğu tahmin edilmektedir (4). Omurilik yaralanmasının sebepleri arasında motorlu araç kazaları, düşme ve iş kazaları, şiddet suçları ve spor yaralanmaları yer almaktadır.

Travma sonrası medulla spinaliste oluşan iskemi patogenezi için Hall ve Walf'un hipotezleri halen geçerliliğini korumaktadır. Bu hipotezde medulla spinalis kan akımının azalmasında temel mediatör olarak mikrovasküler lipid peroksidasyonu görülmektedir. Posttravmatik dejenerasyona yol açan en önemli faktörün, spinal kordda serbest oksijen radikalleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonu olduğu tahmin edilmektedir. Serbest radikallerce indüklenen lipid peroksidasyonu ve nötrofillerden salınan oksijen radikalleri spinal kordun hasarlanmasında rol oynar. Bununla birlikte bu progresif hasarın mekanizması netlik kazanmamıştır.

Antioksidanlar ise etkilerini reaktif oksijen ürünleri (ROS) 'nin oluşumunu önleyerek ve/veya ROS'u temizleyerek gösterirler. Eksojen kaynaklı antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır (5).

Flavonoidler de bu bileşikler arasındadır. Flavonoidler yıllar önce araştırılmaya başlanmasına rağmen son yıllarda önem kazanan çalışmalar flavonoidlerin antioksidan özelliklerinin yanında antiinflamatuvar, antiviral, antiallerjik, antitrombotik ve diğer özelliklerinin de bulunduğunu göstermektedir.

Hesperidin turunçgillerde bol miktarda bulunan bir Flavanon glikozit olup bitki savunmasında rol oynadığına inanılmaktadır. Diğer çalışmalar, bu bileşimin, antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri ile ilişkili olarak önemli bir nöroprotektif özelliğe sahip olduğunu ileri sürmüşlerdir (6).

Sıçanlarda etkili bir spinal travma modeli uygulayarak, bu model üzerinde malondealdehit (MDA) ve total antioksidan seviye (TAS) ölçümlerini yaparak hesperidin oksidatif hasara karşı koruyucu etkilerini doza bağımlı incelemeyi amaçlamaktayız.

2. GENEL BİLGİLER

Travmatik omurilik hasarı kişisel, sosyal ve psikolojik etkileri, iş gücü kaybı, finansal sonuçları göz önüne alındığında ciddi bir halk sağlığı problemidir. Omurilik yaralanmaları sadece ölüm ve ciddi sakatlıklara yol açmaz, bunun dışında birçok organda (akciğer, gastrointestinal sistem, otonom sinir sistemi, cilt, üriner sistem) fonksiyon kaybına yol açabilir.

Spinal kordun hasarı ve diğer hastalıklarının tanı ve tedavisi hakkında çalışmalar antik döneme kadar uzanmaktadır (7). Bundan 4000 yıl önce Edwin Smith papirüslerinde servikal spinal yaralanmaya bağlı kuadriplejiyi tedavi edilemez hastalık olarak katagorize etmiştir (8).

Hipokrat omurganın segmentleri ve normal eğimleri, vertebra yapısı, tendonlar, kanlanması, hatta komşu damarların anatomik ilişkileri ile bilgiler vermiştir. Kolumna vertebralisin kırık ve çıkıkları ile ortaya çıkan paraliziler arasındaki ilişkiye dikkat çekmiş olsa da medulla spinalisin fonksiyonu hakkında net bir fikir belirtememiştir (9).

Galen, spinal kordun yarım kesisi sonrası hemiplejiyi tanımlamıştır. Bu bilgileri ışığında paralize adaleleri, duysal kayıp alanını, lezyon bölgesini inceleyerek yaralanma seviyesini tespit eder duruma gelmiştir (7).

Yedinci yüzyılda ilk kez Egeli Paulus dekompresif laminektomi yapmıştır. Fransız cerrah Pare 16. yüzyılda spinal dislokasyonları redükte etmek için odundan bir düzenek kurmuştur. Ayrıca bu amaçla insizyon yaparak vertebra ve sinirleri öne itmeyi önermiştir. Fabricius Hildanus 1646'da servikal fraktür dislokasyonlarda redüksiyon ve traksiyon amacı ile yumuşak dokular ve spinoz çıkıntılara bir çivi takarak klemp ile çekmeyi denemiştir. Bu manevranın başarısız olması durumunda fragmanların temizlenmesini önermiştir. Louis 1762'de lomber bölgeye giren ve paraplejiye yol açan metal bir fragmanı çıkarmış, komplikasyonsuz geçen operasyon sonrası tam iyileşme bildirmiştir (10,21,22). Omurilik travması ile ilgili ilk fizyopatolojik çalışma 1890'da Schamus tarafından tavşan omuriliğinde travma sonucu gelişen patolojik değişiklikleri inceleyerek yapılmıştır (10).

İnsan spinal kord yaralanmalarının (SKY) büyük çoğunluğunda primer yaralanma mekanizması spinal kordun kemik ya da disk materyalinin fraktür

dislokasyon ya da patlama kırığında spinal kordun akut kompresyonu ya da laserasyonu ile gerçekleşir. Akut kord travmasında bu kompresyonu stimüle etmek için birkaç eksperimental model geliştirilmiştir. 20. yy başlarında, köpeklerde ağırlık düşürme yöntemiyle deneysel meduller yaralanma deneyleri yapan Alfred Reginald Allen laminektomi sonrası omurilik üzerine ağırlık düşürerek kontüzyon tipi omurilik hasarı oluşturmuş ve uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin kaldırılmasının nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını ortaya koymuştur (12,13).

1978 yılında Tator ve Rivlin tarafından geliştirilen klip kompresyon modelinde omurilik çeşitli zaman aralıklarında anevrizma klipleri ile klibe edilmekte ve bu sayede değişik miktarlarda travma oluşturulabilmektedir. Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir (12,13).

Travma modelleri insanda spinal kord yaralanmasında deneysel dizaynlar olmaları nedeni ile gerçek etkiyi oluşturma konusunda şüphelidirler. Örneğin ağırlık düşürme metodu yalnızca travmanın başlangıç darbesini kapsar ve persistan kompresyon gücünü dışlar. Oysa gerçek insan spinal kord yaralanmalarında kapalı bir vertebral sistemde fraktür dislokasyonların yarattığı çevresel ve anterior kord kompresyonu sözkonusudur. Birçok hayvan modelinde açık bir laminektomi üzerinden posterior kompresyon oluşturulur (8).

Tablo 1: Deneysel omurilik yaralanma modellerinin tarihçesi

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

Tablo 2: Deneysel omurilik yaralanma modelleri

<p>A) Travmatik yaralanma</p> <ol style="list-style-type: none">1-Akut Kinetik Kompresyon – kaf, klip, balon, vertebral dislokasyon, impactor.2)Akut Statik Kompresyon –ağırlık uygulanması3)Ağırlık Düşürme4)Akselerasyon-Deselerasyon5)Distraksiyon6)Transeksiyon-parsiyal, komplet, lazer, bisturi <p>B) Non-tavmatik yaralanma</p> <ol style="list-style-type: none">1)İskemi-aort oklüzyonu, selektif arter veya ven oklüzyonu2)Tümör kompersyonu3)Kimyasal

2.1. Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi

Yüksekten düşmeler, trafik kazaları, iş kazaları, günlük yaşama ait kazalar, göçük altında kalmalar, spor yaralanmaları ve ateşli silah yaralanmaları omurilik yaralanmalarının başlıca sebepleridir. Ayrıca vertebrada primer bir patoloji (tümör, enfeksiyon, osteoporoz, metabolik ve kemik hastalıkları vb.) sonucunda basit travmalarla da patolojik kırıklar gelişebilir. Vertebra fraktürlerinin % 50'den fazlası (L1>T12>L2>T11) torakolomber bölgede görülür ve tüm omurilik yaralanmalarının % 40'ı T12-L1 bölgesindedir. Servikal vertebra yaralanmalarında nörolojik defisit %40 oranlarına ulaşmaktadır. Erişkinlerde torakolomber vertebra yaralanmalarında nörolojik defisit % 10-38 arasında değişen oranlarda görülmektedir (14).

Omurilik yaralanmasının patofizyolojisi akson, kan damarı ve hücre membranlarının hasarına neden olan primer mekanik hasar ile başlar. Bu primer mekanik yaralanma ikincil hasar fazı ile devam eder ki burada vasküler bozulma, ödem, iskemi eksitotoksisite elektrolit dengesizlikleri, serbest radikal üretimi, inflamasyon ve geç apoptotik hücre ölümü oluşur.

2.1.1. Primer Hasar

Medulla spinalise darbe olduğu ilk anda nöron ve aksonlarda oluşan mekanik hasar; primer yaralanma olarak adlandırılmaktadır. Primer yaralanma spinal kordun kendisine veya çevresindeki vertebral kolona ait çeşitli travma şekillerini takiben gelişebilir. Sonuçtaki hasarın boyutu çeşitli biyomekanik faktörlere dayanır ve kırılan kemik fragmanının derecesiyle ilişkili olmayabilir (8,15).

Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon veya rotasyon ile ilgili distraksiyonel kuvvetlerin hepsi nöral elemanların kendisinde veya omurilik damarlarında gerilme veya yırtılmaya sebep olur. Kemik kısımlardan ligamanlardan veya spinal kanal içindeki hematomlardan kaynaklanan kompresyonlar diğer olası mekanik etkilerdir. Mekanik darbenin yarattığı ezilme ve kontüzyon, omurilik için gerekli olan kan akımının azalmasına yol açar.

Tablo 3: İnsan omurilik yaralanmasında primer mekanizmalar

Mekanik güç	Hasar mekanizması
Darbe ve kalıcı kompresyon	Patlama fraktürü, fraktür-dislokasyon
Darbe ve geçici kompresyon	Hiperekstansiyon
Distraksiyon	Hiperfleksiyon
Laserasyon, transeksiyon	Patlama fraktürü, laminar fraktur, ateşli silah yaralanması

İlk ve en yaygın mekanizma kalıcı kompresyon ve darbedir (16). Bu özellikle akut disk rüptüründe, fraktür-dislokasyonda ve retropulse kemik fragmanında meydana gelmektedir. İkinci mekanizmada yalnızca darbenin geçici süre ile olduğu kompresyon mevcuttur ve altta yatan dejeneratif servikal omurga hastalığı ön plandadır. Spinal kolonun aksial planda kuvvetle gerilmesine yol açan distraksiyon tipi üçüncü mekanizmada; spinal kord ve/veya onun kan akımını sağlayan elemanlarının gerilmesi ve yırtılması söz konusudur. Bu tip hasarda özellikle çocuklarda kartilajenoz vertebra cismi, kas yapısının tam gelişmemiş olması ve ligaman esnekliğinin predispozan olduğu, radyolojik olarak patolojinin bulunmadığı spinal kord hasarı mevcuttur. Ayrıca bu tip hasarda erişkinlerde travmanın radyolojik

kanıtının olmadığı ve altta yatan dejeneratif omurga hastalığının sıklıkla eşlik ettiği bir durum olarak ortaya çıkmaktadır. En son primer hasar mekanizması laserasyon ve transeksiyondur. Laserasyon; mermi ile yaralanma, keskin kemik fragmanların dislokasyonu veya ciddi distraksiyon sonucu meydana gelir ve minor hasardan komplet transeksiyona kadar çeşitli derecelerde olabilir (16).

Medulla spinalis içindeki kanama başlangıcı mekanik hasar sonrası erken dönemde ortaya çıkarken, kan akımının kesintiye uğraması daha geç meydana gelir. Kan akımının kesilmesi hipoksi ve iskeminin neden olduğu lokal enfarkt sonucunu doğurur. Bu özellikle yüksek metabolik gereksinimi dolayısıyla gri cevherin hasarlanmasına yol açar. Hasarlanan alandan geçen nöronlar fiziksel olarak kesintiye uğrar ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Hasarlanan alandaki ödem ve makrofajlar, sinir iletilsinin bozulmasında diğer etkenlerdir (17). Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşsüz hasarının ilk saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat içerisinde geri dönüşsüz hasarlandığı düşünülmektedir (18).

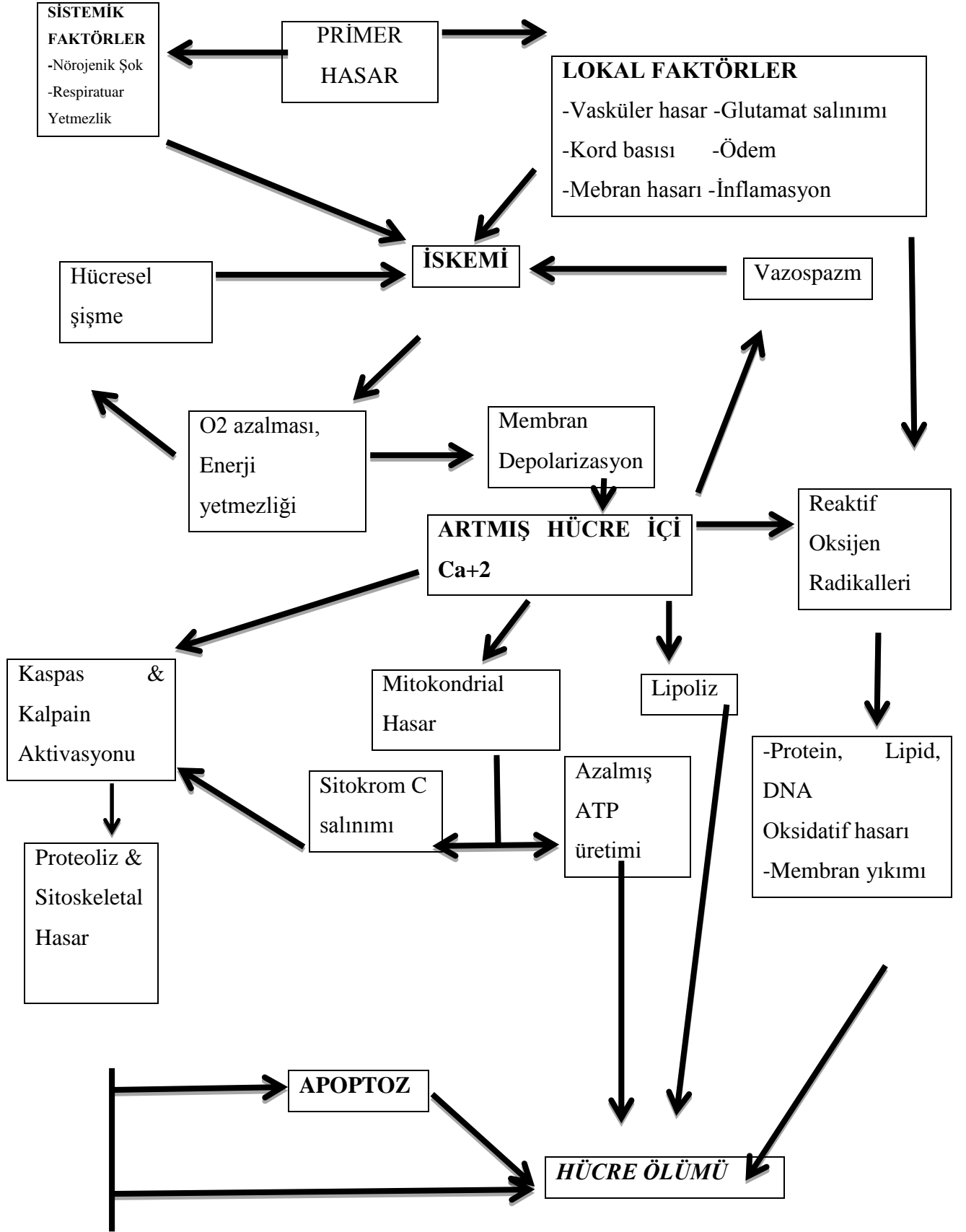
2.1.2. Sekonder Hasar

Primer mekanik hasar daha sonra haraplanmanın büyümesine neden olacak sekonder mekanizmaların oluşmasında bir nidus işlevi görür (16). Bu sekonder hasar mekanizmaları; nörojenik şok, hemoraji ve iskemi-reperfüzyonu içeren damarsal problemler, eksitotoksitite, kalsiyumla ilişkili sekonder hasar, sıvı elektrolit dengesizliği, immunolojik hasar, apoptoz ve mitokondrial disfonksiyonu içermektedir. Sekonder hasar meydana gelmesine neden olan mekanizmalar sistemik ve lokal etkiler olmak üzere iki kısımda incelenmektedir (16,19,20). (Tablo 4- Şekil 1 ve 2).

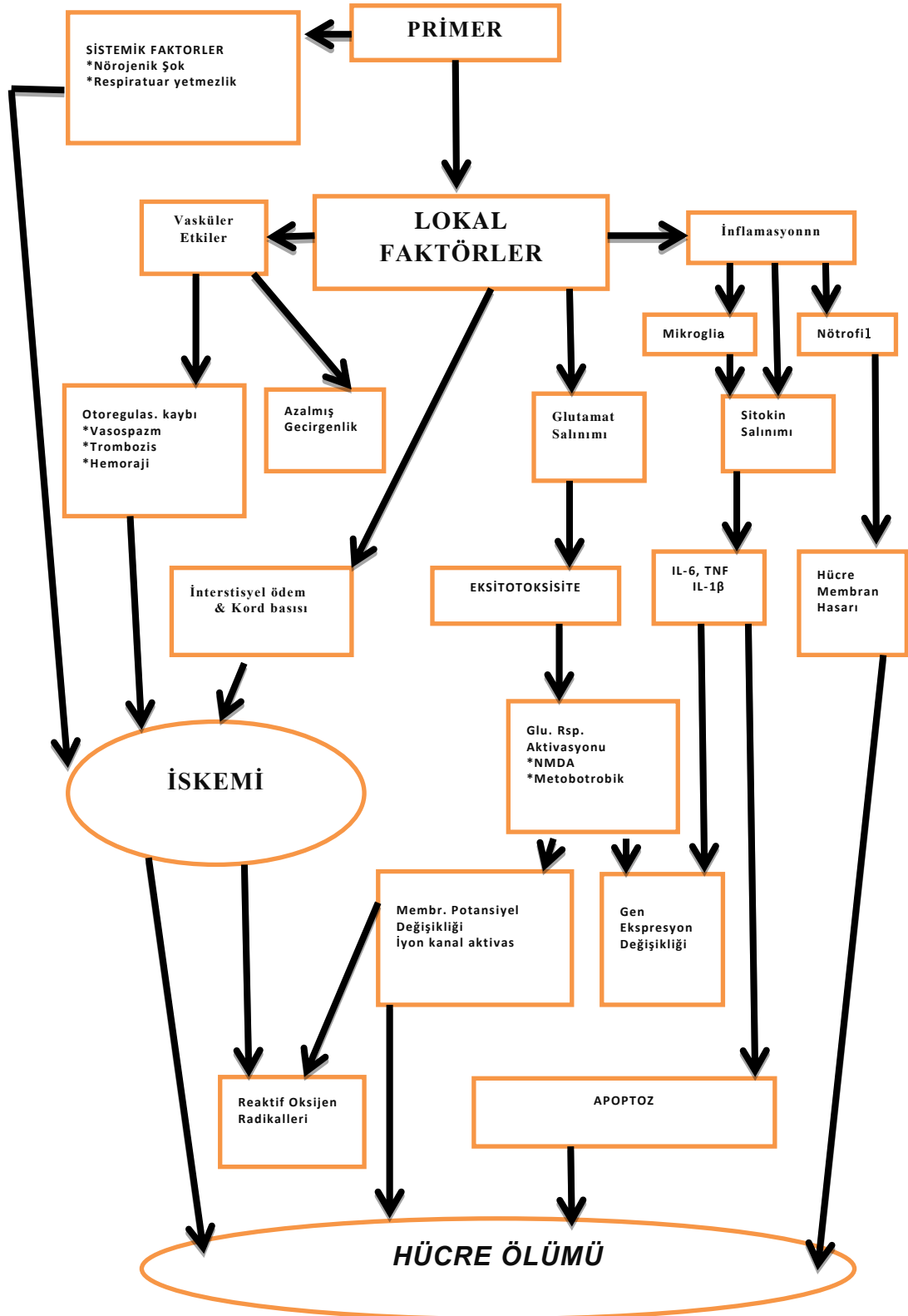
Tablo 4: Sekonder yaralanma mekanizmaları (19)

Sistemik etkiler (nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi
Kan basıncında kısa süreli artış, sonra uzun süreli hipotansiyon
Periferik dirençte azalma
Kardiak debide azalma
Omurilik dolaşımında lokal vasküler hasar
Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
Özellikle gri cevherde hemoraji
Mikrodolaşımda kayıp-mekanik, tromboz, vazospazm
Biyokimyasal değişiklikler
Eksitotoksitite-glutamat
Nörotransmitter birikimi
Ketakolaminler-nöradrenalin, dopamin
Araşidonik asit salınması
Serbest radikal üretimi
Eicosonoid üretimi
Prostaglandinler
Lipid peroksidasyonu
Endojen opioidler
Sitokinler
Elektrolit kaymaları
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
Oligodendritlerde sitotoksik etkiler
Wallerian dejenerasyon
Ödem
Apoptozis
Enerji metabolizmasında kayıp
ATP üretiminde azalma



Şekil 1: Travma sonrasında sekonder hasar mekanizmaları



Şekil 2: Sekonder hasarda lokal faktörlerin etkisi

2.1.2.1. Sistemik Etkiler

Akut omurilik yaralanması olası sistemik etkilerini nörojenik şok ve respiratuar yetmezlik olarak göstermektedir (16).

Nörojenik şok; vasomotor inputun ciddi paralizisinin neden olduğu yetersiz doku perfüzyonu olarak tarif edilmektedir. Bu tablo kardiyak outputun depresyonu ve periferik rezistanstaki azalma ile oluşan hipotansiyon ve bradikardi ile karakterizedir. Bu etkiler sempatik tonusun azalması ve artan vagal tonusa bağlı miyokardiyal fonksiyon bozulması ile ilişkilidir (20). Akut omurilik yaralanmasına bağlı gelişen spinal kord ve diğer organların iskemisine neden olan nörojenik şok tablosu, tedavi edilmezse nöral doku hasarını şiddetlendirir (16). Oluşan şokun derecesi meydana gelen omurilik yaralanmasının seviyesi ile ilişkilidir. Özellikle servikal düzeyde meydana gelen hasar çok ciddi bir nörojenik şok tablosu ortaya çıkarabilmektedir (23). Travmatik spinal kordun otoregülasyonu kaybetmesi nedeniyle oluşan sistemik hipotansiyon posttravmatik iskemiyi şiddetlendirmektedir ve bu yüzden hemen tedavi edilmelidir. Ancak intramedüller hiperemi ve hemorajiden kaçınmak amacıyla kan basıncı yalnızca normotansif seviyelerde tutulmalıdır (13).

2.1.2.2. Lokal Vasküler Etkiler

Akut spinal kord travmasının başlangıcında ve daha sonra bunu takip eden aşamalarda çeşitli mekanizmaların meydana getirdiği etkilerle, omurilik üzerinde vasküler hasara bağlı ciddi değişiklikler oluşmaktadır. Bu vasküler hasar hemorajik ve iskemik haraplanmayı beraberinde getirmektedir (16). Başlangıç mekanik travmaya bağlı olarak mikrosirkülasyonu oluşturan venüller ve kapillerlerdeki hasar özellikle travma bölgesinde oluşmakta ve rostral-kaudal olarak uzanım göstermektedir. Ayrıca nadiren direkt travmaya bağlı anterior spinal arter gibi geniş damarlarda hasar meydana gelmekte ve bu damarlar direkt mekanik travmadan genellikle kurtulmaktadır (13,24,25).

Mekanik travmaya bağlı hasarın bu ilk fazında medulla spinalis içerisinde özellikle gri cevherde peteşial hemorajiler ortaya çıkar. Bu mikrosirkülasyondaki

travmaya bağlı olarak damarlardan oluşan proteinoz sızıntı spinal kordda ödeme yol açarak korddaki basıncın artmasına ve kan akımının bozulmasına neden olur (26).

Progresif posttravmatik iskemi birçok yaralanma modelinde değişik kan akımı lum metodları kullanılarak gösterilmiştir (16).

Direk travmaya veya diğer tetikleyici ajanlara bağlı oluşan vasospazmında iskemide önemli rol oynadığı gösterilmiştir (16).

Ayrıca tromboksan A2 gibi bazı maddelerin salınması sonucunda oluşan intravasküler trombozda, postravmatik iskeminin şiddetlenmesine neden olmaktadır (16).Diğer yapılan çalışmalarda; spinal kord otoregülasyonu bozuk olduğundan, travma sonrası meydana gelen sistemik hipotansiyonun iskemiye şiddetlendirdiği gözlenmiştir (16). Hasar gören kapillerden serbestleşen endotelin de kord perfüzyonunun bozulmasına yol açar (8).

Süperoksid, hidroksil radikalleri, nitrik oksit (NO) ve diğer yüksek enerji oksidanları gibi oksijen derivesi serbest radikaller iskemi süresince ortaya çıkmakta ve erken reperfüzyon periyodunda ciddi oranda artarak sekonder hasardaki patoloji mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar (16). Özellikle bu moleküller mitokondrial respiratuar enzim, Glyseraldehit 3-Fosfat, sodyum (Na⁺) membran kanal inaktivasyonu, sodyum potasyum adenzin 5' trifosfataz (Na⁺-K⁺ ATP'az) inhibisyonu yaparlar ve lipid peroksidasyonuna neden olurlar (8).

Posttravmatik iskemi ATP üretimini deprese ederek hceresel homeostaziste önemli rol oynayan Na⁺-K⁺ pompası gibi enerji bağımlı mekanizmaların disfonksiyonuna yol açar (8).

Sekonder hasarda önemli rol oynadığı düşünülen posttravmatik iskemi konsepti, geri dönüşlü ve tedavi edilebilir olması nedeniyle önem taşımaktadır (16).

2.1.2.3. Eksitotoksitite

Memeli santral sinir sisteminde bazı aminoasitlerin, metabolik fonksiyonlarının yanında nörotransmitter görevlerinde olduğu bilinmektedir. Elektrofizyolojik alışmalar nörotransmitter olarak işlev yapan aminoasit ileticilerin iki grupta toplanabileceğini göstermiştir. Eksitator aminoasitler iki karboksilik asit grubu

içerirler (L-Glutamik asit ve L-Aspartik asit), inhibitor aminoasitler ise monokarboksiliktir (Gamaaminobütirik asit, Glisin, Taurin, Prolin, B-Alanin) (27).

Glutamat santral sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteridir (16). Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek duyuşsal enformasyonun iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok fonksiyonda önemli rol oynar (27,28).

Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun nöronal hasara yol açtığı Olney ve ark. tarafından tanımlanmış ve eksitotoksitite olarak isimlendirilmiştir (16,29). Bu eksitotoksitenin epilepsi, nörodejeneratif hastalıklar, travma, serebral iskemi gibi birçok nörolojik hastalıkta doku hasarını arttırdığı düşünülmektedir (29).

Eksitator aminoasitlerin nörotoksik etkilerini açıklamak amacıyla birçok mekanizma ileri sürülmüştür (29).

Eksitotoksinler tarafından tetiklenen hücre ölümü; akut nöronal şişmeye öncülük eden Na⁺ ve klor'un (Cl) ve daha sonra gecikmiş hasara neden olan Ca²⁺'nin hücre içine girmesini sağlayan spesifik reseptörler tarafından yönetilir (29).

Glutamat reseptör aktivasyonu erken evrede intrasellüler Na⁺ artışına bu ise sitotoksik ödem, intrasellüler asidoz ve lizise yol açar (16,29). Na⁺-K⁺ ATP'az mekanizmasındaki yetmezlik ise Na⁺ ve suyun hücre içi birikimini şiddetlendirir (16). Bir sonraki aşamada Ca²⁺ 'nın hücre içine akımı artar, bu ise Ca²⁺ bağımlı proteaz ve lipazların aktivasyonuna yol açarak hücre membranının ve nöroflamanların hasarına neden olur (30). Sonuçta; "***intrasellüler kalsiyum birikimi sanral sinir sistemindeki toksik hücre ölümünün son ortak yolu***" olarak belirtilmektedir (16).

Glutamat nörotoksitesi ayrıca lipid peroksidasyonunun başlaması, Na⁺- K⁺ ATP az aktivitesinin inhibisyonu, doğrudan membran Na kanal inaktivasyonu, mitokondrial solunum enzimlerinin inhibisyonu, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz inaktivasyonu gibi mekanizmarla nöronal ölümü şiddetlendiren, reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin meydana gelmesi ile sonuçlanan birtakım olaylar zincirini başlatır (16).

Travmatik spinal kord hasarı sonrası eksitotoksititeye neden olan aşırı glutamat birikimi; hücre membran polarizasyonuna bağılı olarak sinaptik

veziküllerden glutamat salınımının uyarılması ve enerji yetmezliğine bağlı glutamat geri alım mekanizmalarının yeterli çalışmamasıdır (31).

Deneysel spinal kord yaralanması sonrası medulla spinalis içerisinde ekstrasellüler eksitatuvar aminoasit konsantrasyonunun 15 dakika sonra toksik düzeye ulaştığı gösterilmiştir (8).

Glutamat farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik özelliklere sahip bir grup reseptör aracılığı ile aktivasyon gösterir (8). N-methyl-D- aspartate (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate (AMPA) ve kainat reseptörleri ligand kapılı iyon kanalları içerdiğinden "ionotropik" olarak adlandırılırlar. Diğer bir grup ise transmembran proteinlere bağlı ikincil haberci sistemi üzerinden etkili "metabotropik" reseptörlerdir (8).

A) Metabotropik reseptörler

Aktive edildiklerinde fosfolipaz C'yi aktif hale getirerek hücre içinde bağlı bulunan Ca^{+2} 'nin serbest hale geçmesini sağlarlar (8). G proteini ile ikincil haberci sistemi üzerinden de etkilidir ve hem glutaminerjik, hem de non-glutaminerjik sinapslarda iletiyi modüle ederler (8).

Omurilik yaralanmaları ekstrasellüler eksitatuvar aminoasit düzeylerini yükselten biyokimyasal süreçleri tetikler ve buna bağlı olarak glutamat reseptörleri aracılığı ile eksitotoksik hasar ortaya çıkar. Bu olaylarla ilgili 3 tip metabotropik reseptör olduğu düşünülmektedir. Grup 1 nöronal eksitabiliteyi arttıran hücre içi ileti yollarını tetikler, grup 2 ve 3 ise sinaptik iletiyi düzenleyen otoreseptörler gibi davranırlar (32).

B) İyonotropik reseptörler

Ligand kapılı iyon kanallarıdır. NMDA reseptörleri, AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri bu grup içerisinde yer alır. AMPA ve kainat reseptörleri arasında ayırım bazı durumlarda net olmadığı için bu iki reseptör tipine AMPA/KA veya non-NMDA adı verilmektedir. NMDA reseptörleri fizyolojik koşullarda ağırlıklı olarak öğrenme ve bellek fonksiyonunda rol alırken, non-NMDA reseptörleri yaygın olarak hızlı eksitator sinapslarda bulunurlar. AMPA/KA reseptörleri ve NMDA reseptörlerinin genetik özellikleride birbirinden farklıdır (33).

1) *NMDA reseptörleri: (N-methyl D -aspartate)*

Glutamik asit(glu) bağlanması sonrasında Na + ve Ca²⁺'nin hücre içine girişine, K⁺'nin ise hücre dışına çıkışına neden olurlar. Bu grup reseptörler Mg²⁺ ile bloke edilirler (33).

Spermin, spermidin gibi poliaminler için de bağlanma bölgesine sahiptirler ve bu moleküller reseptörlerin aktivasyonunu arttırmaları. NMDA reseptörünün özelliği, hem voltaj hemde ligand kapılı olmasıdır. NMDA reseptörleri tarafından oluşturulan eksitotoksititede, nöronal ölümü şiddetlendiren reaktif moleküllerin oluşması sonucu meydana gelen birtakım olaylar kaskadının başlaması söz konusudur (16).

NMDA reseptör aracılığı ile Ca²⁺ düzeyinin yükselmesi sonucu, serbest radikal oluşumu, mitokondrial hasar, PLA2 gibi Ca²⁺'ye bağımlı enzim düzeyindeki patolojik yükselmeler ve gen ekspresyon değişiklikleri gibi mekanizmalarla hücre hasar şiddetlenmektedir (16,34).

Sitozolik Ca²⁺ konsantrasyonundaki artış birçok doku tipinde hücre ölümünün son ortak yolu olarak gözükmektedir (8). Faden ve ark. yaptığı çalışmada spinal kord travması sonrası bu reseptör aktivasyonunun gecikmiş doku hasarını arttırdığı düşünülmüş ve reseptör blokajının tedavide yarar sağlayacağı belirtilmiştir (29).

2) *AMPA reseptörleri:(α-amino-3-hydroxy-5-methyl isoxazole propionate)*

Voltaj bağımsız olarak çalışırlar ve aktivasyonu sonucunda Na⁺ hücre içersine girer, K⁺ ise hücre dışına çıkar (8). Glu R1-4 (GluR A-D)olarak adlandırılan 4 subünitin ikişerli kombinasyonundan oluşurlar. Ouisqlat reseptörleri olarakta bilinirler (35). AMPA reseptör aktivasyonu ile erken dönemde, hücre içi Na⁺ biriktirerek sitotoksik ödem ve intrasellüler asidoz oluşmasına yol açar (16).

3) *Kainat reseptörleri:*

AMPA reseptörleri ile iyi ayırt edilemediğinden AMPA/KA veya Non-NMDA olarak adlandırılırlar.

NMDA reseptörlerinin spinal kordda eksitatör nörotransmisyonunda yönetici özelliği olduğu düşünülmektedir (29). Travmatik spinal kord hasarında NMDA reseptör aktivitesindeki artışın, intrasellüler Ca²⁺ artışı ve daha birçok mekanizma ile gecikmiş sekonder hasarda rol oynadığı bulunmuştur (29). Bununla bağlantılı

olarak NMDA reseptör blokajının travmatik ve iskemik modellerde sekonder hasara karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (37).

2-Amino-fosfonohepnoik asit, 2-Amino fosfovalerik asit ve kinureik asit gibi selektif ve non-selektif NMDA reseptör antagonisti moleküller geliştirilmiştir. Ancak bunların kan-beyin bariyerini geçememeleri ve protektif etkilerinin sıklıkla direk santral sinir sistemine uygulanma gerekliliği nedeniyle kullanımları geniş yer bulamamıştır (38).

Kompetitif NMDA antagonistleri, reseptörün glutamat tanıyan bölgesine bağlanarak inhibisyonuna neden olurlar. Non kompetitif antagonistler ise NMDA ilişkili iyon kanallarına bağlanarak reseptörü inhibe ederler (37).

MK 801 (Dizocilpine), selektif non-kompetitif NMDA blokörü, sistemik olarak uygulanabilir olması ve spinal kord hasarı sonrası eksitotoksik hasarı engellemesi nedeniyle önem kazanmıştır (29,30).

Dexanabiol (HU 211), yeni NMDA reseptör blokörünün faz 1 klinik çalışmaları sağlıklı insanlarda iyi tolere edildiği ve yan etkilerinin görülmediği ortaya konmuş ve spinal kord hasarlı hastalar üzerinde faz 2 çalışmaları yapılmaktadır (39). Gill ve ark. AMPA/KA reseptör antagonistlerinden olan NBOX'un rat fokal serebral iskemi modelinde nöroprotektif olduğunu gösterirken, Wrathall ve ark. ise NBOX'un intramedüller enjeksiyonunun spinal kord hasarı sonrası beyaz cevherin korunmasında ve lökomotor fonksiyonları iyileştirmede etkin rol oynadığını göstermişlerdir (36).

4-Aminobutyl guanidin'nin (*Agmatin*) glutamat reseptör alt grubu olan NMDA reseptörlerini selektif olarak bloke ettiği ve bu işlevinin guanidino grubu ve NMDA reseptör kanal porları ile olan ilişkisinden kaynaklandığı gösterilmiştir (40).

2.1.2.4. Kalsiyum ve Diğer Elektrolitler ile İlişkili Sekonder Hasar

Yüksek intrasellüler Ca²⁺ konsantrasyonu, birçok mekanizma ile sekonder hasarın şiddetlenmesine neden olur. Ca²⁺'nin aşırı miktarda hücre içine girişi, santral sinir sisteminde "*toksik hücre ölümünün son ortak yolu*" olarak ortaya çıkmaktadır (8,16).

Ca²⁺'nın travma sonrası hücre içine girmesi 3 yolla olmaktadır (15) :

- 1) *Hasar görmüş hücre membranından*
- 2) *Voltaja duyarlı Ca²⁺ kanallarından*
- 3) *Glutamat ile aktive olan Ca²⁺ kanallarından*

Hücre içinde aşırı kalsiyum birikimi sonucunda; serbest yağ asitlerinin salınımı, fosfolipaz A2 aktivasyonu, Ca²⁺ bağımlı ATPaz aktivasyonuna bağlı enerji rezervlerinin tükenmesi, toksik eikosonoid sentezi, serbest radikal oluşumu, reseptör proteinlerin kovalent modifikasyonu, hücre iskeletinin mikrotübüler ve nöroflament komponentlerinin modifikasyonu, mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması, aksonal dejenerasyon, proteaz, fosfotaz, endonüklaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu meydana gelir (8).

Özellikle Ca²⁺ iyonunun nükleaz sitümülasyonu DNA yapımını bozarak, mekanizması halen tam ortaya konmamış olan programlanmış hücre ölümü diye adlandırılan apoptozise neden olur. Ayrıca hücre içi proteaz aktivasyonu, hücredeki fonksiyonel protein yapıları yıkarken, ATP'az süperoksit dismutaz (SOD) ve diğer enzimleri haraplar (41-43).

Sekonder hasarın önlenmesine yönelik Ca²⁺ kanal blokörleri denenmiş ve spinal kord kan akımını arttırarak iyileşmeyi olumlu yönde etkilediğine dair çalışmalar yapılmıştır (37).

Ayrıca Na⁺ kanal blokörlerinin, NMDA ve AMPA/Kainat reseptör antagonistlerinin de intrasellüler Ca²⁺ birikiminden korunmada yardımcı rol oynadıkları gösterilmiştir (37).

Na⁺ -K⁺ ATP'az mekanizmasındaki yetersizlik, intrasellüler Na⁺ ve suyun artışına neden olurken, sitotoksik ödem ve intrasellüler asidoz ile hasarın şiddetlenmesine yol açar. Ayrıca artan ekstrasellüler K⁺ nöronların aşırı depolarizasyonu ve spinal şok oluşumunda kritik bir nedensel faktör olmaktadır (16).

İntrasellüler Mg²⁺'deki düşüş, Mg²⁺ iyonunu kofaktör olarak kullanan enzimatik reaksiyonlardaki bozulma, glikoliz, oksidatif fosforilasyon ve protein sentezi gibi metabolik olayların etkilenmesine neden olur. Mg²⁺ iyonu ayrıca NMDA reseptör blokajı ile nörotoksitede koruyucu rol oynadığından, seviyesindeki azalma nöronal hasarın şiddetlenmesinde rol oynamaktadır (16).

Bunlara ek olarak, Mg²⁺ 'nin düşüşü intrasellüler Ca²⁺ aktivasyonunun şiddetlenmesine neden olarak, sekonder hasarın büyümesine yol açar (44).

2.1.2.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikal dış yörüngesinde çiftlenmemiş serbest elektron bulunduran kimyasal bileşiktir. Başka moleküller ile çok kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere ‘‘oksidan moleküller’’ veya ‘‘reaktif oksijen partikülleri (ROP)’’ de denilmektedir. Bu elektron başka biyolojik moleküllere aktarılarak oksidasyona yol açar. Serbest radikallerin aşırı artışı hücre ölümüne neden olur (45). Mitokondrilerdeki oksijenli solunumda olduğu gibi birçok anabolik ve katabolik işlemler sırasındaki reaksiyonlarda moleküler düzeyde elektron kaçışları olur ve bu sırada ROP'lar oluşur. Canlı hücrelerdeki oksijen metabolizması, çevre kirleticileri, radyasyon, iskemi, hemoraji, travma, pestisitler, çeşitli tıbbi tedavi yolları ve kontamine sular gibi birçok etmen kaçınılmaz bir şekilde oksijen türevi serbest radikallerin oluşumuna yol açmaktadır. Bu radikallerin başlıcaları; tekli oksijen (1O₂), süperoksit anyonu ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroksi ($\cdot\text{OH}$), peroksi (ROO \cdot) ve alkoksi (RO \cdot) radikalleridir. Biyolojik dokularda serbest radikallerin en sık kaynağı oksijen radikalleridir (46).

Reaktif oksijen türlerinin zararlarına karşılık vücuttaki farklı doğal savunma sistemleri serbest radikalleri kontrol altında tutmaktadır. Bu sistemler farklı hücrelerde ve farklı serbest radikaller üzerinde rol oynadıkları için birbirlerini tamamlayıcı niteliktedir (47).

Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller enzimatik antioksidan mekanizmalar (sitokrom oksidaz sistemi, SOD'lar, katalazlar, glutatyon peroksidazlar) ya da nonenzimatik antioksidanlar (toko-ferol, karoten, glutatyon, askorbik asit, ürat, sistein, bilirubin, albümin), ya da metal bağlayıcılar (seruloplazmin, transferrin, laktoferrin) ile inaktive edilerek doku hasardan korunur (48,49).

Tablo 5: Oksidan kaynakları ve antioksidan savunma mekanizmaları (DİPLOK)

Oksidan	Antioksidan savunma
Sigara dumanı	Süperoksit Dismutaz
Egzersiz	Katalaz
Çevre kirleticiler	Glutasyon peroksidaz
Ateşli hastalıklar	Glutasyon
Radyasyon	Ubikinon
Çoklu yağ asitleri ile zengin bir diyet	Selenyum
İskemi	Ürik asit
Karsinojenler	E ve C vitamini
	β karoten ve diğer karotenoidler

Son yıllarda serbest radikallerin nöral doku iskemisini takiben meydana gelen patolojik değişikliklerden sorumlu olabildiği gösterilmiştir.

Tablo 6: Reaktif oksijen partikülleri

1-Radikaller	Süperoksit radikali(O ₂ ⁻)
	Hidroksil radikal (OH ⁻)
	Alkoksil radikal (LO ⁻)
	Peroksil radikal (LOO ⁻)
2-Radikal olmayanlar	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)
	Lipid hidroperoksit (LOOH)
	Hipoklorikasit (HOCl ⁻)
3-Singlet oksijen	

Hasara uğramış sinir sisteminde, travmadan birkaç dakika veya saatler sonra birçok sebepten dolayı süperoksit radikali oluşur. Bu mekanizmalar; araşidonik asit kaskadı, biyojenik amin nörotransmitterlerin otoenzimatik otooksidasyonu, mitokondrial ksantin oksidaz aktivasyonu ve ekstravaze hemoglobin oksidasyonudur. Hücrenin maruz kaldığı iskemik ve bunu takip eden reperfüzyon esnasındaki serbest oksijen radikali artışı karşısında, endojen antioksidanlar, serbest oksijen radikal temizleyicileri ve peroksidazlar yetersiz kalmaktadır (53). Süperoksit radikali (O₂⁻)

oksijen molekülünün bir elektron alarak redükte olması sonucu oluşur. SOD enzimi ile H_2O_2 'ye (Hidrojen peroksit) çevrilir, bu tepkime ‘‘dismutasyon tepkimesi’’ diye adlandırılır. H_2O_2 ise katalaz yardımı ile H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür. H_2O_2 genellikle iki süperoksit radikalinin birbiriyle reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Zayıf okidan ve zayıf redüktandır. Elektronları çiftlenmiş olduğu için serbest radikal olarak kabul edilmez. Demir (Fe^{+3}) varlığında hidroksil radikalinin olduğu reaksiyona prekürsörlük etmesi nedeniyle önemlidir (50,51). Hidroksil radikali (OH) hidrojen peroksit'e bir elektron ilavesi veya oksijen molekülüne 3 elektron verilmesiyle oluşur. Bilinen en güçlü oksidan radikaldir, küçük miktarlarda bile bulunduğu yerde aşırı hasar yapabilir (50). Nitrojen dioksit (NO_2) ve NO tek sayıda elektron içerirler ve radikal olarak kabul edilirler. NO; süperoksit radikali ile reaksiyona girerek bir ara basamak ürünü olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturur. $ONOO^-$ güçlü oksidan özelliği ile birçok biyolojik molekülde hasar meydana getirir (52). Aktive olmuş nötrofillerce oluşturulan hipoklorik asit ($HOCl$) güçlü bir oksidandır ve demir bağımlı veya bağımsız reaksiyonlarla OH oluşturulabilir (50). Endotel hücreler, nötrofiller, makrofajlar ve mikroglialar süperoksit ve NO olmak üzere iki şekilde radikal oluştururlar (54). Lipid, nükleik asit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik moleküllere okside edici bir radikalın etki etmesiyle karbon merkezli radikaller oluşur ve O_2 ile birleşerek peroksil radikalini ($ROO\cdot$) oluşturur ki bu radikal lipid peroksidasyonun başlamasına neden olur (50). Serbest demir veya demir şelatları iki seviyede serbest radikal oluşumunda etkili olur. Bunlardan birincisi süperoksit iyonu oluşumunda Fe^{+2} nin otooksiadsyonu olup, ikincisi ise Fe^{+2} 'nin (H_2O_2) varlığında okside olup hidroksil iyonu oluşumuna sebep olmasıdır (54). Metal iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarındaki asıl önemi lipid peroksidasyonundaki etkileriyle ilgilidir. Geçiş metalleri lipid peroksidasyonunu başlatmaktan çok, sentezlenmiş olan lipid hidroperoksitlerinin ($LOOH$) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederler. Böylece daha az zararlı olan radikalleri daha zararlı hale getirirler (50).

Serbest yağ asitlerinin serbest radikal ile oksidasyonu "*lipid peroksidasyonu*" olarak adlandırılır ve kısaca hücrelerdeki zar fosfolipidlerinin yükseltgenerek peroksit türevlerine dönüşmesi olayı şeklinde tanımlanmaktadır. Bu olayda etkili

olan oksijen metaboliti süperoksit grubu (sonuçta hidroksil grubuna dönüşerek etkili olur) ve hidroksil grubudur (55-57).

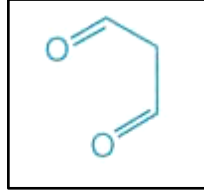
Lipid peroksidasyonu, radikallerin ortaya çıkması ve doymamış yağ asitlerinin bir hidrojen atomu alması ile başlar. O₂ ile birleşerek ROO.[•] yu oluşturur. ROO.[•] yağ asidinden bir hidrojen daha kopararak reaksiyonun zincir şeklinde devamına neden olur. Hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ve yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açarak, anormal iyon girişiyle birlikte hücre ölümüne neden olur. Bu olayın kontrol edilememesi halinde oluşan zincir reaksiyon ile hücre ölümün yayılması ortaya çıkar (54). Ayrıca oluşan lipid peroksidasyonu ile birlikte mikrovasküler endotel hasarı oluşarak kan beyin bariyerinin bozulduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (58). Yüksek oranda poliansatüre yağ asitleri içeren hücre membranının yıkılması, serbest radikallere bağlı nöronal hasar oluşmasının en önemli aşamasıdır (59). Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L[•]) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO[•]) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "**nonenzimatik lipid peroksidasyonu**" denir.

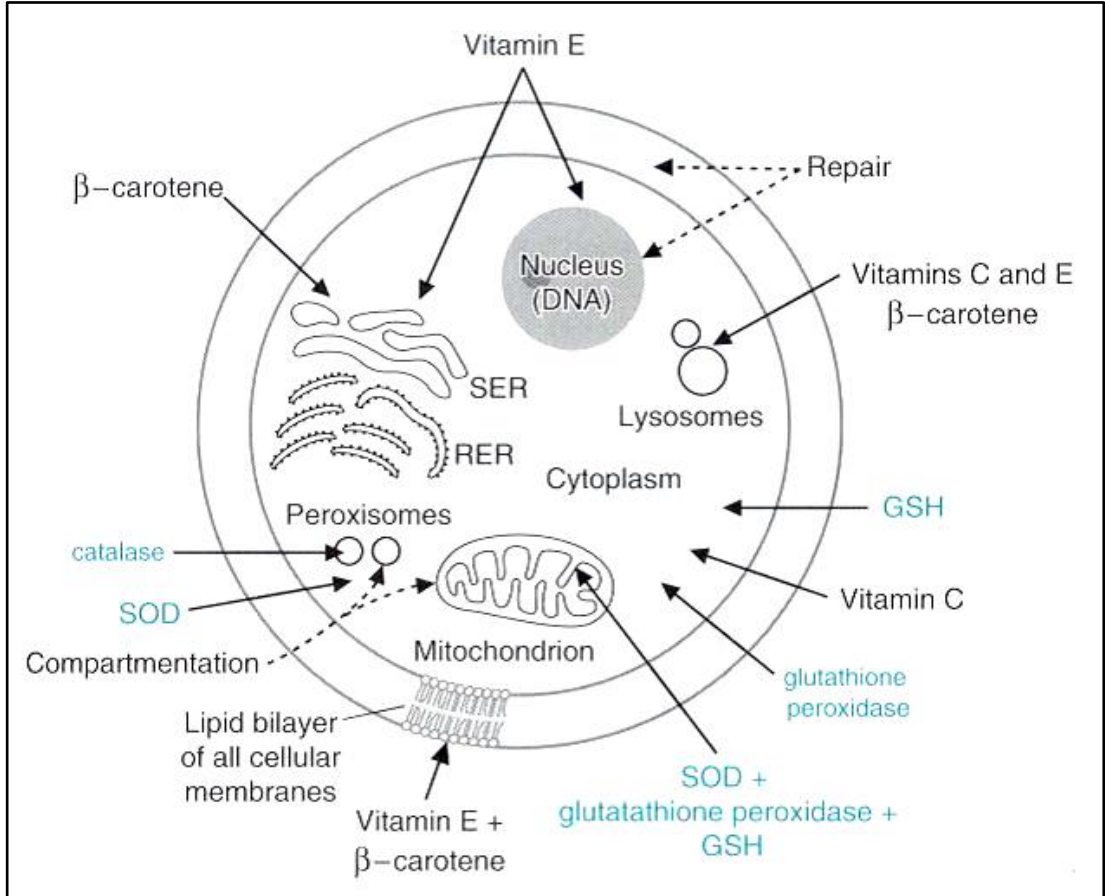
Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali (L[•]) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L[•]) O₂ ile etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO[•]) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO[•]), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder.

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallere varlığında artar. H₂O₂'den Fenton reaksiyonu sonucu OH• oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. LOOH yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir (54,60,61).

MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi LOOH seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır. Nonenzimatik lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Böylece doku hasarına ve birçok hastalığa neden olur. Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan MDA ve diğer ara ürünler aracılığı ile lipid peroksidasyon düzeyi tayin edilmektedir (52,62). MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından TBA ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir.



Şekil 3: Malondialdehit (MDA)



Şekil 4: Antioksidan mekanizmalar

2.1.2.6. Apoptoz

Son yıllarda spinal kord hasarı dahil bir çok nörolojik hastalığın patobiyolojisinin programlı nöronal ölümü etkilediği düşünülmektedir. Apoptoz sitokinlerin salınımı, inflamatuvar hasar, serbest radikal hasarı ve eksitotoksitete bağlı olarak tetiklenebilir. İnsanlarda travmatik spinal kord hasarı sonrası apoptozun varlığı gösterilmiştir. Buna ek olarak deneysel çalışmalardan gelen bilgiler, spinal kord injury (SCI)'nin özellikle kaspaz aktivasyonunu anlamlı derecede kötüleştirdiği

yönündedir (16). Spinal kord hasarında apoptotik kaskat nöronlarda, oligodendrositlerde, mikroglia ve belki de astrositlerde aktive olmaktadır. Mikroglia'daki apoptoz inflamatuvar sekonder hasarı kötüleştirir (63).

Deneyel çalışmalar; oligodendrositlerdeki apoptozun, SCI sonrası ilk birkaç hafta içerisindeki demiyelinizasyon oluşumunu şiddetlendirdiğini düşündürmektedir. Ayrıca apoptozun nöronal kaybı artırarak sonuçları olumsuz yönde etkilediği tahmin edilmektedir (16). SCI sonrası nöronda ortaya çıkan apoptoz; hem faz ligant-faz reseptörleri ile yönetilen ve/veya makrofajlar tarafından İNOS üretiminin artışı ile ekstrinsik yoldan, hemde direk kaspaz 3 proenzim aktivasyonu ve/veya mitokondrial hasar, sitokrom c salınımı ve kaspaz doku aktivasyonu ile intrinsik kaspaz ile yönetilen apoptotik ölüm yoluyla meydana gelmektedir (16,64). Buna bağlı olarak kaspaz inhibitörlerinin SCI'ya bağlı sekonder hasardan korunmada yeni bir hedef olabileceği düşünülmektedir (64). Apoptozun iki anayolu olan ekstrinsik (reseptör bağımlı) ve intrinsik (reseptör bağımsız) mekanizmalarının ikisinin de SCI'de aktive oldukları düşünülmektedir. Reseptör bağımlı apoptoz hücre dışı sinyallerle, özellikle de tümör nekroz faktör (TNF) ile uyarılmaktadır. Spinal kord hasarı ile TNF hasarlı alanda hızla birikir. Nöronların, mikroglia ve oligodendrositlerin fas reseptör aktivasyonu bir takım programlı ardışık kaspaz aktivasyonuna neden olur. Bunlar kaspaz 8 ve etkileyici kaspaz olarak bilinen kaspaz 3 ve kaspaz 6'dır. Bu kaspaz'ların aktivasyonu etkilenen hücrelerin ölümü ile sonuçlanır (16). Ekstrinsik yolun alternatif mekanizmasında, İNOS'un kaspaz 3 aktivasyonu ile programlı hücre ölümünün oluşmasıdır (65). Reseptör bağımsız yol, hücre içi sinyallerle aktive edilir ve bu yüzden intrinsik yol olarak adlandırılır. Reseptör bağımsız yolun aktivasyonu, SCI sonrası nöronlarda tanımlanmış ve artan intranöronal Ca²⁺ konsantrasyonunun mitokondrial hasarını, sitokrom c salınımını ve alternatif programlı kaspaz aktivasyonunu teşvik ettiği düşünülmüştür. Bu aşamada kaspaz-9 aktivasyonu için sitokrom c ile apoptoz aktive edici faktör birleşir. Ekstrinsik yoldaki gibi kaspaz 6 ve kaspaz 3 aktive edilir (16). Apoptotik sekonder hasar henüz tam aydınlatılabilmemiş değildir ve spinal kord hasarındaki apoptozun kötüleşme nedenleri ve teröpatik korunma çabaları için çalışmalar sürdürülmektedir (16).

2.1.2.7. Gen Ekspresyonu ve İmmünolojik Sekonder Hasar

Sekonder hasarın otodestruktif süreçleri aksonal hasar ve hücre kaybı ile sonuçlanan fizyolojik, metabolik, biyolojik değişiklikleri içerir. Ek olarak sinir sisteminin travmaya cevap olarak nöroprotektif ve rejeneratif reaktif süreçleri de başlattığı anlaşılmıştır. SKY'ye bütün bu cevaplar gen ekspresyonunda değişiklikler olarak yansır (66). Birçok çalışmada SKY sonrası RNA ve protein seviyelerinde değişiklikler saptanmıştır. Travma sonrası erken dönemde transkripsiyonel değişiklikler yaralanmayı takiben 6 saat içinde kompleman-3' ün ve kompleman 3 reseptörlerinin upregülasyonu izlenmiştir. SKY'yi takiben 12-72 saatler arasında proinflamatuvar sitokinler; İL-1, İL-3 ve İL-6 genetik ekspresyon seviyelerinin ve reseptörlerinin üç ile altı kat oranda arttığı gözden kaçmamıştır. Yarı kantitatif RT-PCR ve western blot analiz sonuçları NGF, BDNF, TNF, EGF, İL-6 m-RNA ve yaralanmış spinal kord proteinlerinin ekspresyonlarının belirgin arttığı gösterilmiştir. Buna rağmen bu sitokin m-RNA'ları kontrol grubu hayvanlarında ve cerrahi sonrası hemen öldürülen hayvanlarda ya hiç saptanmamış ya da düşük oranda eksprese olmuştur (67). Yetişkin sıçan spinal kordunun dorsal hemiseksiyonu sonrası spontan doku onarımı çalışmasında, büyük oranda rostrale ve kaudal spinal dokulara doğru lezyonda hızlı bir sinir lifi gelişimi gösterilmiştir. Operasyonun 5. gününden başlayarak artan sayıda aksonların net olarak gösterilen lezyon ve komşu intakt spinal kord arasında geçiş yaptığı görülmüştür. Lezyonu penetre ederken aksonlar NGFr (+) nöronal olmayan hücrelerle (schwan hücreleri ve leptomeningial hücreler) ile ilişkide olmuştur. Şaşırtıcı olarak bu aksonların bir kısmı CGRP- ya da SP-immünreaktif dorsal kök ganglion nöronlarından gelişmiştir. Bu reorganizasyonel işlemler için doku onarımı sırasında hangi tanıma moleküllerinin önemli olduğu araştırıldığında sonuçlar adhezyon moleküllerinden (CAM) L1 ve N-CAM'ın yoğun ekspresyonunu göstermiştir. Çift immünofloresan, schwan ve leptomeningial hücrelerinin CAM ekspresyon paternini desteklediğini göstermiştir (68). Yaralanmış MSS bölgesine gelmiş olan immün sistem hücreleri birçok protein sistemini harekete geçirir. Bu medyatörlerden birisi İCAM-1'dir. Bu, nötrofillerin dokuya infiltrasyonuna yardımcı olur. Akut SKY'dan sonraki rolü tam açıklanamamıştır. SKY sonrasında İCAM-1'e karşı spesifik antikorlarla yapılan çalışmalar

myeloperoksidaz aktivitesinde ve ödemde azalmaya ayrıca spinal kord kan akımında artmaya yol açtığını göstermiştir (16). Birçok çalışma SSS hasarını takiben BDNF'nin nöroprotektif bir ajan olarak rol alabileceğini savunmaktadır. Hipokampal nöron kültürleri artmış glutamat seviyelerine ulaştığında BDNF glutasyon redüktaz ve SOD'u içeren antioksidan defans sistemlerinin aktivasyonu ile glutamatın eksitotoksik etkilerine karşı koruyucu bir rol oynar. Aynı zamanda nitrit oksit sentetaz (NOS) üretimini azaltarak primer kültürde sıçan motor nöron sağ kalımına öncülük eder. BDNF; in vivo iskemiye maruz kalmış hipokampal nöronlara nöroprotektif etki sergiler ve serebral enfarktten ve SKY' den kaynaklanan nekrotik zon hacmini azaltır (69). PARG [Poly (ADP-Ribose) Glycohydrolase] inhibitörlerinin eksperimental SKY'yi belirgin azalttığı gösterilmiştir. PARG aktivasyonu SKY de histolojik ve motor hasar, nötrofil infiltrasyonu, İL-1 beta, TNF-alfa, artmış apoptoz, BCL-2 down regülasyonu ile karakterize major bir rol oynar. PARG geni tahribatı ve enzimatik inhibisyonu yukarıdaki bulguları tersine çevirir (70).

2.1.2.8. Sekonder Hasarda Mitokondrinin Rolü

Mitokondri spinal kord hasarı sonrası hücre ölümünde merkezi bir rol oynar. Serebral metabolizmanın oluşmasında, hücrel Ca²⁺ hemostazının sağlanmasında, oksidasyon–redüksiyon reaksiyonlarında hücrel metabolik akımın orkestrasyonunda kritik değere sahiptir (71). Hücrel stresin arttığı durumlarda azalan tolerans mitokondri tarafından sağlanan bu fonksiyonlardaki bozulma ile birlikte direk veya indirek olarak hücrel ölüme yol acar. SSS'nin maruz kaldığı travma hücrel respirasyonun ve oksidatif fosforilasyonun bozulması ile mitokondrial fonksiyonları alt üst eder. Ayrıca meydana gelen hasar, mitokondrial Ca²⁺ transportunu inhibe ederek intrasellüler Ca²⁺ hemostazını bozar (16). Mitokondri iç membranın Ca²⁺ tarafından tetiklenen permabilite değişiklikleri hücrel ölüme gözlenmektedir. Bu değişiklikler mitokondrial membran potansiyelini azaltarak osmotik şişme ve mitokondrial lizisi şiddetlendirir (72). Ca²⁺ permabilitesindeki bu değişiklikler terapötik hedef olarak gözükmektedir. Örneğin Ca²⁺ tarafından tetiklenen mitokondrial permabilite değişikliklerinin bir inhibitörü

olan Siklosporin A'nın nöroprotektif olduğu düşünülmektedir (16). Travmatik hasar sonrası eksitatuvar nörotransmitterlerin birikiminden meydana gelen hücrel hasarda mitokondri önem taşımaktadır. Eksitotoksik hücre ölümünde; büyük miktarlarda artan mitokondrial Ca²⁺ birikimine karşın daha az yükselen sitozolik Ca²⁺ miktarı ana nedeni oluşturmaktadır (16). Eksitotoksititeye ek olarak travma sonrası artan mekanik stres, inflamatuvar reaksiyonlar mitokondrial hasarı arttırmaktadır. Ayrıca mitokondri dışı membranın artan permabilitesiyle apoptogenik proteinlerin sitozole salınması, apoptoz ve hücre ölümünde anahtar mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır. Mitokondri travmatik nöral hasarın integral mediatörü olarak görev almaktadır.

2.2. Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından L-Arjinin'den sentezlenen yarı ömrü kısa potent serbest radikal yapıda bir moleküldür (73,74). Vasküler tonusun düzenlenmesi, platelet fonksiyonların düzenlenmesi, inflamasyona immunolojik cevap, otonomik tonus ve duysal iletinin regülasyonu gibi birçok fizyolojik olayda rol oynarken aynı zamanda önemli bir nörotransmitter-nöromodülatördür (75).

3 tip Nitrik oksit sentaz isoformu mevcuttur (74-76):

1-cNOS –Kalsiyuma bağımlı--- ncNOS -Nöronal Tip 1

2-ecNOS- Endotelial Tip 3

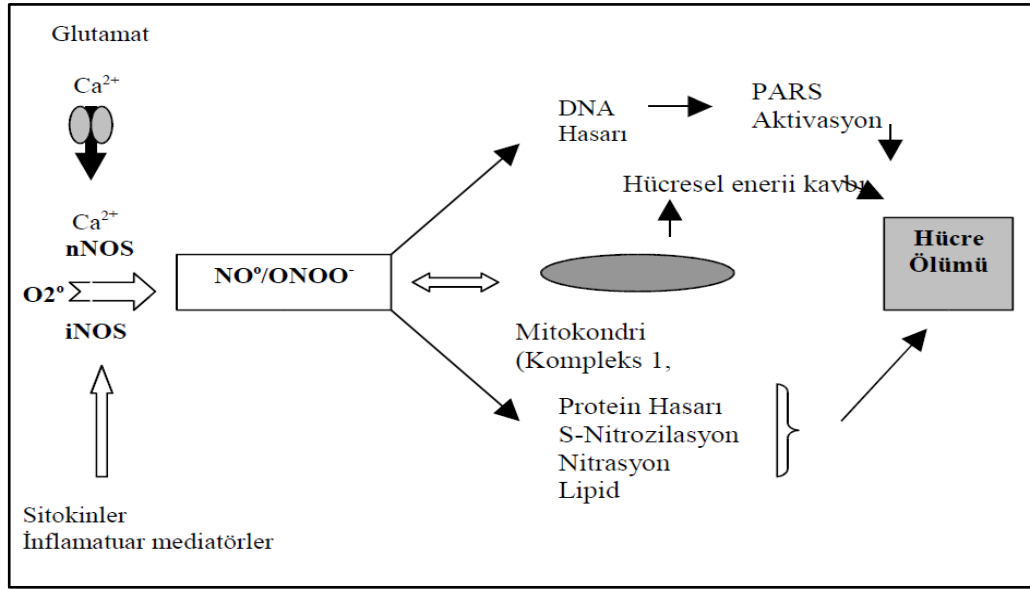
3-iNOS-Kalsiyum bağımsız---Tip 2 (uyarılabilir)

Bu fizyolojik fonksiyonların yanı sıra patolojik durumlarda yüksek miktarlardaki üretimi sonucu NO nörotoksik hale dönüşür ve bir serbest radikal olarak sekonder hasarın ilerlemesinde sitotoksik molekül olarak rol oynar (73,76,77).

İNOS sağlıklı dokularda bulunmazken patolojik süreçlerde inflamatuvar mediatörler ve sitokinler tarafından stimülasyonu sonucu makrofajlar ve glial hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar, nöronlar ve vasküler düz kas hücreleri tarafından üretilir (73,76).

Özellikle patolojik koşullarda İNOS'a bağlı NO aşırı üretimi ve peroksinitrit oluşumu; protein hasarı, lipid peroksidasyonunun artışı, DNA hasarıyla birlikte PARS(Poly-ADP riboz sentetaz) aktivasyonu ile hücrel enerji kaybı, mitokondrial

elektron transport zinciri enzimleri olan kompleks 1-2 ve akonitaz'ın demirsülfür merkezlerine etki ederek inhibisyonu ile mitokondrial respirasyonun durması, DNA replikasyonunun inhibisyonu ile hücre ölümüne neden olur (76).



Şekil 5: NO ve/veya peroksinitrit ilişkili nörotoksitite

Suzuki ve ark. yaptığı bir çalışmada travma uygulanan farelerde, İNOS kaynaklı NO aşırı üretiminin geç evre nöronal hasara katkıda bulunduğu ve akut fazda NOS inhibisyonunun kronik fazda daha iyi fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını göstermişlerdir (75).

Travmatik beyin hasarında; platelet agregasyonu ve lökosit adezyonunun azaltılması ve vazodilatatör etkisi nedeniyle, kan akımının artmasını sağlayan eNOS aktivasyonunun korunarak, selektif iNOS inhibisyonunun, hasarın azaltılmasında önemli olduğu gösterilmiştir (76). Santral sinir sisteminde NMDA reseptör aktivasyonunun intrasellüler Ca²⁺ artışına bağlı olarak NOS oluşumuna öncülük ettiği düşünülmektedir (78). NO, spinal kord hasarına cevap olarak artış göstermekte ve NOS'un farklı kaynaklardan oluşumuna bağlı olarak travma sonrası değişik zamanlarda yükselmektedir. cNOS aktivitesi travma sonrası 4-8 saat içinde ortaya çıkarken, iNOS aktivitesi 72 saat gibi sürede ortaya çıkan geç bir olaydır (73). İadekola ve ark. serebral iskemi çalışmasında İNOS aktivitesindeki artışın oklüzyondan 12 saat sonra başladığını 96.saatte pik yaptığını 7. günde düştüğünü

gösterirken, Agrawal ve ark. ise travmatik beyin hasarı sonrası İNOS aktivasyonun 1.gün sonunda ortaya çıktığını 7.günde maksimuma ulaştığını ve 14.günde kaybolduğunu ortaya koymuşlardır (75,79).

Liu ve ark. gen ekspresyonuna yönelik yaptıkları çalışmada iNOS'un normal spinal kord metabolizmasında yer almadığını ve travma sonrası transkripsiyonel düzeyde eksprese edildiğini göstermiştir (74).

2.3. Spinal Kord Hasarının Patolojisi

Omurilikte travmayı takiben başlayan ikincil hasar süreci akut, subakut ve geç faz olarak sınıflanabilir. Hemoraji ve hızlı nekrozu takiben, astrositler ve mikroglia reaktif hale gelir, lezyon bölgesine inflamatuvar hücreler göç eder. Yaralanmadan haftalar sonra skar dokusu ve kavite oluşur, beyaz cevherde Wallerian dejenerasyonun değişik evreleri gözlenir (80). (Tablo 7) Medulla spinalis yaralanmalarında nöropatolojik bulgular yaralanmayı oluşturan etkenin şiddetine, süresine ve yaralanmadan sonra geçen zamana bağlı olarak değişiklikler göstermektedir (81).

Tablo 7: Akut spinal kord hasarının patolojisi (19)

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">*Santral hemoraji: kapiller, venüller ve arteriollerden özellikle gri cevher içine*Hematomyeli*Uzak kanamalar (özellikle venöz)*Santral hemorajik nekroz*Post travmatik infarkt*Subaraknoid kanama*Subdural veya ekstradural kanamalar: (nadir)*Ödem: lokal, genişleyen*Aksonal hasar: transeksiyon, aksolemma rüptürü, şişme, dev aksonlar, organel kümelenmesi*Myelin kılıf hasarı: rüptür, veziküler ayrılma, periaksonal boşluklar*İnflamasyon: makrofajlar, mikroglia |
|--|

2.3.1. Erken Dönem Patolojisi

Akut hasarın en erken makroskopik bulguları zedelenmenin şiddetine bağlı olarak kordda yumuşama, yuvarlaklaşma ve pembe-kırmızı renk değişikliği oluşmasıdır (82).

Bu renk değişikliği mikrokanamalara ve venöz staza bağlıdır (81).

Erken döneme ait morfolojik değişiklikler travmayı takiben 4. saatte başlar, 8 ila 24 saat arasında nekroz ışık mikroskobu ile görülebilir düzeydedir. İlk belirtiler gri cevherde peteşial kanamalar, beyaz cevherde ödemdir. Beyaz cevherde oluşan ödem nötrofilde vakuoler şişme olarak izlenir. Travmayı takiben 12-18 saatte maksimuma ulaşır ve 3-5 günde şiddetini kaybeder ancak yaklaşık 15 gün özellikle beyaz cevherde belirgin kalabilir (81).

Ayrıca travma sonrası eritrosit ve lökositler damar dışına çıkarlar. Eritrositlerin ekstrasvaze olmasıyla peteşial kanamalar oluşur ve kanın diğer şekilli elemanlarından öncelikle PNL'ler travma sonrası ortama hakimdir. Daha sonra ise lenfosit ve makrofaj hakimiyeti oluşur (83).

Medulla spinalis parankimine ait travmatik değişiklikler olarak nöronlarda akson ve myelin kılıfının şişmesi ve bütünlüğünün kaybı gözlenir (84).

Ultrastrüktürel düzeyde aksonlarda mikrotübül ve nöroflamanlarda kesilme ve parçalanma izlenir. Akson membranındaki hasara bağlı olarak iyon kanallarında fonksiyonel bozukluk ve vasküler endotelial hasar ortaya çıkar. Akson hafif şiddette hasarlandığında şişmiş, boğumlanmış ve kıvrımlanmış dejenerasyon gösterirken, daha ağır hasarda kesintili damlacıklar şeklinde görülür. Aksonun tamamen yırtıldığı veya koptuğu noktada "terminal tanecik" adı verilen terminal şişme görülür. Miyelin kılıf da hafif hasarda vakuoler dejenerasyon gösterirken, ağır hasarda miyelin ve aksonun birlikte parçalanmaları ile serbest yağ tanecikleri belirir (81,84,85).

Nöron hücresi öldüğünde 1-4 saat içinde hücre ve stoplazması üçgen şeklinde büzülür. Nüvede kromatin yapısının kabalaşmış parçalanarak dağılması, stoplazmada nissl cisimciklerinin kaybı ve koyu eozinofilik boyanma şeklindeki "Kırmızı nöron" olarak adlandırılan değişikliğe uğrar. Ölen nöronlar makrofajlar ve mikroglialar tarafından fagosite edilirler ve bu olay travmadan 10-12 saat sonra ışık mikroskopunda saptanabilir (81,86).

2.3.2. Subakut Dönem Patolojisi

Aktive olmuş mikroglia ve astrositler reaktif gliozis oluşturmaya başlarlar. Mikroglia, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Bu hücreler lezyon merkezinde çalışırlar ve nadiren yayılırlar. Myofibroblastların kollajen üreten fibrositlere dönüşümü ile nedbe dokusu oluşur. Travmayı takiben 2-3 hafta sonra akut dönemdeki değişiklikler azalmaya başlamıştır. Ödem azalmış ve küçük kanamalar rezorbe olmuştur. Büyük kanamalar ise organizasyon ile giderilmeye çalışılır ve rekanalizasyon izlenir. Damarların çoğunun lümeninde fibrin trombüsleri vardır. Ortamda lipid ve hemosiderin yüklü makrofajlar mevcuttur. Fagositik hücreler hasarın olduğu alanda özellikle damarlar çevresinde rozetler halinde gruplar oluşturur (81,87).

Eğer santral hemorajik nekroz oluşmuşsa, onarım boru şeklinde kistik boşluk olarak gerçekleşir. Aksonal bağlantısı kesilmiş nöronda "santral kromatolizis" olarak adlandırılan sitoplazmanın belirgin homojenizasyona uğradığı ve şiştiği, çekirdeğin ise kenara itildiği değişiklikler görülür. Nöron hücrelerinin aksonunda kesi olduğunda aksonun distal kısmında wallerian dejenerasyon meydana gelir. Travmanın başında şişmiş olan spinal kord onarım sonuna doğru incelmış ve atrofik görünüm almıştır. Deneysel çalışmalarda rejenerasyonun üç yıla kadar yavaş hızla devam ettiği gösterilmiştir (81,87).

2.3.3. Kronik Dönem Patolojisi

Travma sonrasında 6 ay ve daha geç dönemde izlenen değişikliklerdir (12) (Tablo 8). Travma bölgesinde medulla spinalis üzerinde dura mater ve araknoid membran kalınlaşmıştır. Meningial zar, adeziv araknoidit olarak isimlendirilen korda veya duraya yapışıklık gösterir. Mikroskobik olarak fibrozis ve meningeal hücre proliferasyonu görülür. Medulla spinalis makroskopik olarak büzülerek küçülmüştür, gri ve sert kıvamlıdır. Skar dokusunun yanı sıra bazı nöronlarda aksonal rejenerasyon, schwann hücrelerinde remiyelinizasyon görülebilir (81).

Tablo 8: Spinal kord hasarının kronik dönem patolojisi (12)

Santral kaviteasyon
Aksonların devamlı subpial rimi
Posttravmatik infarkt
Posttravmatik syringomyeli
Kistik myelomalezi
Uzak nekrotik odak
Demiyelinizasyon
İnflamasyon
Wallerian dejenerasyon
Skar ve gliozis
Araknoidit
Atrofi
Rejeneratif süreçler: aksonlar, schwan hücreleri, ependim

2.4. Omurilik Travmasında Tanı

Aksi ispat edilene kadar her multitravma hastasında spinal bir yaralanma olabileceği düşünülmelidir. Yüksek enerjili travma kurbanları öncelikle primer bir değerlendirmeden geçirilerek ileri yaşamsal destek sağlanmalıdır. Yapılması gereken ilk iş hastanın havayolunun açık olmasını sağlamak, solunum ve dolaşım parametrelerini düzeltmek olmalıdır. İkinci bir hayatı tehdit edici yaralanma olasılığı ortadan kaldırılmalıdır. Spinal yaralanmadan şüphe edilen hastalar yeterli servikal immobilizasyon sağlanarak sırt tahtaları ile transport sağlanmalıdır (88,89).

Klinisyenin böyle olası spinal yaralanma durumu olabilecek hastada birinci sorumluluğu seri muayenelerle duysal ve motor fonksiyonu değerlendirmektir. Çok sayıda klinisyen tarafından değerlendirildiğinde nörolojik defisiti kaçırma olasılığı azalacaktır (88,89). Fizik muayene özellikle şuuru kapalı hastalarda omurilik yaralanmasına ait spesifik bir sonuca götürebilir (90).

Tablo 9: Omurilik hasarında yol gösteren klinik veriler

Omurilik hasarında yol gösteren klinik veriler (özellikle bilinci kapalı ve kooperasyonu yoksa)
1-Spinal şokta hipotansiyon ve bradikardi
2-Paradoks solunum
3-Düşük vücut ısısı ve yüksek cilt ısısı
4-Priapizm
5-Bilateral kol ve bacak paralizisi, özellikle gevşek
6-Bilateral ya da yalnızca kollarda ya da kollarda bacaklardan daha fazla olan paralizisi, özellikle gevşek
7-Bilateral bacaklarda paralizisi
8-Ağrılı uyarana cevapsızlık
9-Ağrılı uyarana yanıt yardımı ile anatomik bir seviyenin tespit edilememesi
10-Ağrılı uyarana ile yalnızca baş hareketi veya yüzde mimik oluşması
11-Terleme seviyesi
12- Horner Sendromu
13-Brown Sequard Sendromu

Tüm spinal kolon yeterli ön-arka ve yan grafilere değerlendirilene kadar spinal önlemler alınmalıdır. Röntgenogramlar C2'nin odontoid süreci için servikal bölgede ağız açık grafiyi de içermelidir (91). Direkt radyolojik muayenelerden sonra yararlı araştırma yöntemleri BT ve MR'dır (88,89).

Bilgisayarlı tomografi; orta kolonu, kanal ilişkisini ve yan grafilere görülemeyen arka elemanların kırıklarını göstermede başarılıdır (88,89).

Manyetik rezonans görüntüleme; yumuşak doku hasarını ve posteriora yer değiştiren disk dokusunu göstermede başarılıdır. Akut SKY'de ilk 24 saatteki görüntülerde T2 imajlarda azalmış sinyal intensitesi kanama olarak değerlendirilir. Ödem ve kord kontüzyonu yüksek sinyal intensitesinde görülür. Yine paraspinal kanamaların T2 görüntüleri yüksek sinyal intensitesi yaratırlar. Belirgin kemik yaralanma olmaması durumunda okkült ligamantöz instabiliteyi teşhis etmede avantajlıdır (88,89).

Radyolojik belirti olmaksızın nörolojik belirtilerin bulunduğu hastalar için SCIWORA terimi kullanılır (92).

Spodilozlu hastada hasar mekanizmaları en azından bazı açılardan spondilozu olmayan hastalara göre fark arzeder. Birçok çalışmadaki gibi bu hastalar daha yaşlı gruptadırlar. Spondilozsuz hastalarda olduğu gibi spondilozluların birçoğunda da maksimum kord kompresyonunun olduğu seviyede T2 görüntülerde intramedüller sinyal değişiklikleri vardır. Bu hastaların kaçında hasar öncesinde myelopati olduğu ve bunun nörolojik hasarı ne kadar etkilediği belirsizdir (93).

SKY'nin nörolojik ve fonksiyonel sınıflamaları için uluslararası standartların ilki 1982 yılında ASIA tarafından yapıldı. Spinal kord motor ve duysal bilginin beyin ve vücut arasında dolaşımını sağlayan ana iletim yoludur. Santral alanları (gri madde) çevreleyen longitüdinale yerleşimli spinal traktusları (beyaz madde) içerir. Gri madde duysal ve motor nöronları barındıran segmentlere ayrılır. Spinal duysal nöron aksonları spinal korda girerken motor nöronların aksonları segmental sinir ya da kökler üzerinde kordu terk eder. Kökler vertebral kolondan girip çıktıkları foramenlere göre adlandırılır. Her kök dermatom denilen deri alanlarından duysal bilgi alır. Aynı şekilde her kök miyotom denen adale gruplarını innerve eder. SKY, lezyon alanlarında duysal ve motor sinyallerin iletimini etkiler. Dermatome ve miyotomların sistematik muayenesi ile SKY'den etkilenmiş kord segmentleri belirlenebilir (13)

Tetrapleji (kuadropleji): Bu terim spinal kordun servikal segmentlerinde nöral elemanların spinal kanal boyunca hasarına bağlı motor ve/veya duysal fonksiyonun bozulmasını tanımlar. Tetrapleji, gövdenin olduğu kadar kollarda, bacaklarda ve pelvikorganlarda fonksiyonların bozulması ile sonuçlanır. Nöral kanal dışında brakial pleksus lezyonları ya da periferik sinir yaralanmalarını içermez (13).

Parapleji: Bu terim spinal kordun torasik, lomber ya da sakral segmentlerinde nöral elemanların spinal kanal boyunca hasarına sekonder motor ve/veya duysal fonksiyon kaybını tanımlar. Paraplejide kolların fonksiyonu korunur fakat yaralanma seviyesine bağlı olarak gövde bacaklar veya pelvik organları içine alabilir. Terim kauda equina ve konus medüllaris lezyonları için kullanılabilir fakat lumbosakral pleksüs lezyonları ve nöral kanal dışında periferik sinir lezyonlarını içermez (13).

Nörolojik seviye: Vücudun her iki tarafında normal duysal ve motor fonksiyonun korunduğu en kaudal spinal kord segmentini tanımlar. Duysal seviye terimi vücudun her iki tarafında normal duysal fonksiyon gösteren en kaudal spinal

kord segmentini tanımlar. Motor seviye ise benzer olarak en kaudal normal motor fonksiyon gösteren segmenti tanımlar

Bu seviyeler;

- 1.Vücutun sağ ve sol tarafında 28 duysal anahtar noktası olan dermatomun muayenesi ile,
- 2.Vücutun sağ ve sol tarafında 10 anahtar adale olan 10 myotomun muayenesi ile belirlenir.

İskelet seviyesi: Bu terim radyografik incelemede en büyük vertebral hasarın olduğu seviyeyi tanımlar (13).

İnkomplet yaralanma: Eğer nörolojik seviyenin altında duysal ve/veya motor fonksiyonlarda parsiyel bir korunma varsa ve en alt sakral segmenti içeriyorsa yaralanma inkomplet olarak tanımlanır. Sakral duyu derin anal duyu kadar anal mukokutanöz bileşkedeki duyuyu içerir. Motor fonksiyon testi dijital muayenede eksternal anal sfinkterin kontraksiyonunu araştırır (13).

Komplet yaralanma: Bu terim en alt sakral segmentte motor ve duysal fonksiyon yokluğunu tanımlar (13).

Tablo 10: ASIA /IMSOP hasar skalası

ASIA / IMSOP Hasar skalası
Grade A Komplet Sakral S 4-5 segmentlerinde hiçbir motor veya duyu fonksiyonu korunmamıştır.
Grade B İnkomplet Nörolojik seviyenin altında duyu fonksiyonu korunmuş, ancak motor fonksiyon yok.
Grade C İnkomplet Nörolojik seviyenin altında motor fonksiyon korunmuş ve nörolojik seviye altındaki anahtar kasların çoğunda kas gücü üçün altında
Grade D İnkomplet Nörolojik seviyenin altında motor fonksiyon korunmuş ve nörolojik seviye altındaki anahtar kasların çoğunda kas gücü üç veya üzeri
Grade E Normal Normal duyu ve motor fonksiyon

Eğer nörolojik bozukluk ortaya çıkmışsa, omurilik yaralanması tanısı konması kolaydır. Ancak spinal kolonda nörolojik defisit olmaksızın da anstabil yaralanma olmuş olma olasılığı unutulmamalıdır (90).

Solunum travmanın etkilediği spinal segmentin yüksekliği ile doğru orantılı olarak bozular. Yalnızca motor ve duyu fonksiyonları etkilenmeyip otonomik liflerin de etkilenmesiyle spinal şok denilen durum ortaya çıkar. Kan basıncının düşmesine bradikardi ve periferik vazodilatasyonun eşlik eder. Genellikle T6 düzeyinin altındaki travmalarda ortaya çıkmaz. Lezyon bu seviyenin altında olupta şokta olan hastalarda öncelikle hemorajik bir neden aranmalıdır. Muayenede perine bölgesinin incelenmesi önemlidir. Omurilik travmalarında ortaya çıkan tablolar tam lezyonlar ve kısmi lezyonlar şeklinde görülürler (90).

Tam Lezyon: Lezyon altında kalan vücut kısmında tüm motor ve duysal fonksiyonlar yitirilmiştir. Alt servikal bölge yaralanmalarında solunum da bozular. Lezyon seviyesine bağlı olarak nörojenik şok görülür. Sfinkter kontrolü yapılamaz, iç organlarda retansiyon ve ileus ortaya çıkar. Yüksek seviyede Horner sendromu da görülebilir. Başta görülen gevşek paralizi 3-4 hafta içerisinde spastik paraliziye dönüşür. Prognozu kötüdür (90).

Kısmi Lezyonlar: Santral kord sendromu, Anterior kord sendromu, Posterior kord sendromu, Brown-Sequard sendromu, Konus medullaris ve kauda ekina sendromlarıdır.

-Santral kord sendromu: Üst ekstremitelerde daha belirgin olmak üzere motor kayıp olur. En fazla ağrı ve ısı duyuları etkilenmiştir. Baştaki görülen kuadripleji kısa sürede bacaklarda düzelmeye başlar. En sık rastlanan kısmi yaralanma şekli budur (94).

-Anterior kord sendromu: Tipik olarak anterior spinal arter oklüzyonuyla oluşur. Lezyon seviyesi altında paralizi, ağrı ve ısı duyusu kaybı olur. Dokunma, titreşim ve pozisyon duyuları sağlamdır. Kısmi lezyonlar içinde prognozu en kötü olanıdır (94).

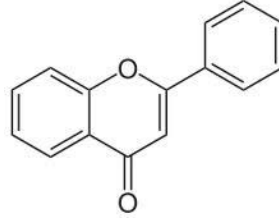
-Posterior kord sendromu: Nadir görülen bir tipidir. Spinotalamik fonksiyonlar korunurken, kordun posterior yarısının kortikospinal yollar ve posterior kolonuda içerecek biçimde hasarına bağlı olarak hareket ve propriyosepsiyon kaybı görülür (90).

-Brown-Sequard sendromu (yarı kesi): Daha çok penetran travmalarda görülür ve lezyon seviyesi altında aynı tarafta motor ve proprioepsiyon kaybı, karşı tarafta ağrı ve ısı duyusu kaybı olur. Hafif dokunma duyusu korunur. Klinikte tüm bulguların bir arada görülmesi durumu nadirdir. Kord travmaları içinde prognozu en iyi olan gruptur (94).

-Kauda equina ve konus medullaris sendromları: Ağrılı poliradikülopati ön plandadır. Asimetrik alt motor nöron tipi pareziler ve sfinkter kusurları ortaya çıkar. Yalnızca konus medullaris etkilendiğinde sfinkter bozuklukları ön plandadır (94). Geri dönebilen sendromlardan kord konküzyonunda ise motor ve duysal fonksiyonların geçici olarak kaybı meydana gelir. Fonksiyonların geri dönmesi genellikle dakikalar, hemen her zaman saatler içinde olur (90).

2.5. Flavonoiedler ve Hesperidin

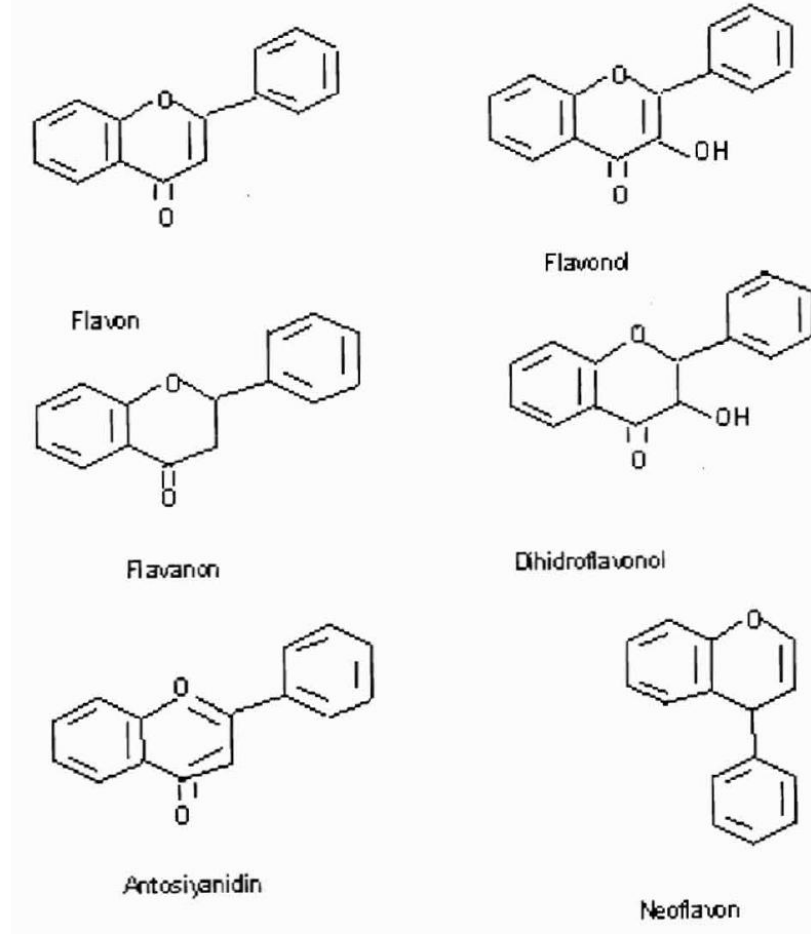
Sarı renkli olmaları nedeniyle latince 'sarı ' anlamına gelen 'flavus' sözcüğünden türetilerek 'flavonoid' adını almışlardır. 15 C atomlu 2-fenil benzopiron (difenil propan) yapısı (C6-C3-C6) gösterirler. İskelet yapılarının farklı olmasına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavonoid ve kalkon gibi türleri vardır (95).



Şekil 6: Flavonoid (2-fenil-1,4-benzo piron)

Tablo 11: Farklı iskelet yapılarına göre flavonoidler

Flavonler	Flavonoller	Flavanonlar
Chrysin	Quercetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Eriodiktol
Luteolin	Kaempferol	Hesperidin
	Rhamnetin	
Flavanoller	Dihidroflavonoller	Biflavonoidler
Catechin	Taksifolin	Amentoflavon
Epicatechin	Slibin	



Şekil 7: İskelet yapılarına göre flavonoidler

2.5.1. Flavonoidlerin Canlılar Üzerindeki Etkileri

Flavonoidler ve diğer bitki fenoliklerinin süperoksit (O₂⁻), lipid alkoksil (ROO⁻) ve peroksil (ROO⁻), nitrik oksit (NO) radikal temizleme, demir ve bakır şelasyonu, α tokoferol rejenerasyonu gibi antioksidan özellik görür. Flavonoidler bu fonksiyonlara ek olarak; Antitümör, antiviral, antitrombotik, fosfolipaz A₂, siklooksijenaz, lipooksijenaz enzimlerinin inhibisyonu ile antiinflamatuvar, antialerjik, vazodilatasyon, immünstimulan özellik gösterir.

Literatürde flavonoidlerin faydalı özellikleri yanında prooksidan özellikleri olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Bu özellikler tümör promotörü olarak etkisi, glutatyon redüktaz (GR) enzimini inhibe etkisi, monooksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerini aktive etkisi gösterir (5,96,97).

Hesperidin ilk kez 1827 yılında Lebreton tarafından keşfedildi, ancak saf halde değildi ve o zamandan beri araştırılmaktadır (98).

Turunçgillerde bol miktarda bulunan bir Flavanon glikozit olan hesperidinin, bitki savunmasında rol oynadığına inanılmaktadır. Hesperidin (3,5,7-trihidroksi Flavanon-7-rhamnoglucoside) farmakolojik olarak aktif bir bioflavonoiddir (99).

Hesperidin glikozid halinde ya da glikozid bağları kırılarak absorbe edilir. Hesperidin diyetle alınan hesperidinin absorpsiyonu için deglikozile olmuş halidir (100).

Hesperidin ve onun sentetik derivesi olan diosmin, ilaç olan Daflon® 'un komponentleridir. Daflon® 'un kan akımını arttırarak variköz venlerde yararlı etkilere sahip olduğu buna ek olarak destek tedavi olarak bacaklardaki ödemi veya aşırı şişmeyi azalttığı gösterilmiş (101).

Hesperidinin biyolojik aktiviteleri antikanser ve antibakteriyel aktiviteden kemik reabsorpsiyon inhibisyonunu ve nöroprotektif etkiye kadar geniş bir spektrumu kapsar (102).

Ayrıca Youdim hesperidinin kan beyin bariyerini geçebildiğini göstermiştir (103).

2.6. Modern Farmakoterapi Çalışmaları

Günümüzde akut omurilik yaralanmasının modern anlamda tedavisine yönelik çalışmalar, hasarın sekonder mekanizmalarla olan şiddetlenmesine odaklanmıştır (104,37). Geçen yıllar akut omurilik yaralanmasının patofizyolojisi hakkında geniş bir bilgiye sahip olmayı sağlamasına rağmen, kalıcı ve ciddi derecede etkili aynı zamanda evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün bulunamamış olması nedeniyle, özellikle nöral hasarın azaltılmasına yönelik moleküler ve hücresel düzeyde laboratuvar ve klinik çalışmalar halen devam etmektedir (38). Denenen birçok ajanın tedavide ümit verici etkilerine rağmen, yalnızca Metilprednizolon'un (MP) geniş klinik çalışmalarda kabul gören tedavi şekli olmaya devam etmesi söz konusudur (37). Birçok tıbbi acil durumda olduğu gibi hastanın kardiyopulmoner stabilizasyonu kritik öneme sahiptir.

Spinal kord travmasına uğramış kişiler, sempatik tonus kaybına bağlı olarak, vasküler tonusta azalma ve kanın periferde göllenmesi ile birlikte hipotansiyon, bradikardi ve soğuk ekstremitelerden oluşan triad tablosu ile karşımıza nörojenik şok

tablosu ile çıkabilirler (104). Bu aşamada etkili tedavi, iskemik hasarın şiddetlenmesine neden olabilecek sistemik hipotansiyon ve hipoperfüzyondan korunmaya yönelik olmalıdır (104,37).

Efektif tedavi vazopressör desteğinde (efedrin, fenilefrin gibi) sıvı verilmesidir. Santral venöz basıncı ve arteriyel basıncı takip edebilmek için invaziv elektromonitörizasyon gerekir. Birçok hastada basınç desteğindenense volüm desteği güvenilirdir. Çünkü yoğun vazopressör verilmesi özellikle yetersiz volüm resüsitasyonunda organ perfüzyonunu azaltabilir. Kısaca nörojenik şok volüm ve pressör desteği ile tedavi edilir ve spinal kord dokusuna ek iskemik yaralanma önlenmeye çalışılır (37). Başlangıç resüsitasyon tedavisinin ardından omurilik travmasında patofizyolojik mekanizmalar göz önünde bulundurularak üzerinde çalışılmış ve çalışılmaya devam edilen farmakolojik tedavi yöntemleri değerlendirilmelidir. Akut omurilik yaralanmasına maruz kalmış hastalarda, cerrahi tedavinin zamanlaması ve endikasyonları konusunda çeşitli fikirler olmasına rağmen, birçok cerrah farmakolojik tedavi sürecinde nörolojik kötüleşme gösteren inkomplet hasarlı vakalarda erken cerrahi tedavi seçeneğini savunmaktadırlar (104). Geliştirilmeye çalışılan farmakolojik tedavi protokolleri ilerleyici nöral hasarın azaltılmasını hedeflemekte ve oluşan nörolojik sekelin en aza indirilmeye çalışılmasını amaçlamaktadır (37).

2.6.1. Kortikosteroidler

Akut omurilik yaralanmasının tedavisinde kortikosteroid tedavi geniş laboratuvar ve klinik çalışmalarda denenmiştir (37). Kortikosteroidlerin başlangıçta kullanımını spinal ödemi azaltıcı etkisine ve anti-inflamatuar özelliğine bağlanmıştı (105). İlk araştırmalarda sadece ılımlı yararı saptanmasına rağmen, yaygın olarak kullanılmaya başlandı. Geniş klinik çalışmalarda MP'nin nörolojik fonksiyonları anlamlı olarak düzelttiği belirtilse de, yapılan çalışmaların veri analizlerinin değerlendirilmesi ve çalışma şeklinin oluşturulmasına bağlı olarak çelişkili durumlar içermekteydi (37).

Klinik çalışmalarda MP diğer kortikosteroidler olan Dekametazon ve Hidrokortizon'a göre daha güçlü antioksidan özelliği ve hücre membranından daha kolay geçmesi nedeniyle ön plana çıktı (106). MP'nin spinal kord hasarını azaltıcı

etkisini oluřturmasının birçok mekanizmaya baėlı olduėu dűőnűlmektedir. Bunların; lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, doku kan akımının ve aerobik enerji metabolizmasının dűzenlenmesi ile ilerleyici posttravmatik iskemiden korunma, nűroflament degradasyonun inhibisyonu, intrasellűler Ca²⁺ birikiminin engellenmesi, vasoaktif prostoglandin F₂α ve tromboksan A₂ formasyonunun inhibisyonu, spinal nűron eksitabilitesinin azaltılması olduėu dűőnűlmektedir (104,37). Ancak hasar gűrműő dokunun yenilenmesinde veya fonksiyonunun geri kazanılması űzerine bir etkisi olmadıėı bildirilmiřtir. İntrasellűler-ekstrasellűler Ca²⁺ akımını stabilize eder. Hűcre asit-baz dengesinin yeniden oluřmasına yardım eder. Na-K ATPaz aktivitesinin tekrar oluřumunu saėlar. Lezyon yerinde Na⁺ ve su tutulumunu azaltır ve K⁺ kaybını űnler. Spinal kord hasarında MP tedavisinin incelendiėi ilk geniř klinik alıřma (The National Acut Spinal Cord Injury Study) NASCIS I'dir Yűksek doz MP'nin omurilik kan akımını ve perfűzyonunu arttırarak nűrolojik kayıpları azalttıėı bildirilmiřtir. NASCIS II protokoluna gűre; ilk 8 saat içinde 30 mg/kg/ 15 dakika, devamında 5.4 mg/kg/ 23 saat infűzyon halinde uygulanan MP'nin morbidite ve mortaliteyi azalttıėı bildirilmiřtir (38,8). NASCIS II tedavisi NASCIS III alıřması ile deėiřikliėe uėramıřtır. NASCIS III çalıřmasına gűre yaralanma sonrası ilk 3 saat içinde tedaviye alınan ve 48 saat sűrdűrűlen hastalarda sonuçlar daha iyi bulunmuřtur (107-111).

2.6.2. 21-Aminosteroidler (Lazoroidler)

Yűksek doz MP ile lipid peroksidasyonun inhibisyonu, glukokortikoid reseptűr iliřkili deėil daha çok antioksidan űzelliėine baėlı olduėunun dűőnűlmesi MP'den daha potent antioksidan olan 21-Aminosteroidlerin geliřtirilmesini saėlamıřtır. Bunun için U 74600 F (tirilazad mestilat) (TM) beyin ve spinal kord hasarı űzerinde denemiřtir (37,112, 113.) And ve ark. yaptıkları deneysel çalıřmada, TM verilen kedilerde plasebo grubuna gűre travma sonrası 4. haftada daha anlamlı dűzelme olduėu gűsterilmiřtir (37). Yine Hall ve ark. 10 mg/kg TM verilen kedilerde spinal kord kan akımının plasebo ve 3 mg/kg TM grubuna gűre ciddi derecede yűksek olduėu gűsterilmiřtir (113). Yapılan NASCIS III alıřmasında; TM verilen gurubun 24 saat MP uygulanan gruba benzer sonuçlar gűsterdiėi tespit edilmiř, ancak TM

grubuna da başlangıçta bolus MP verilmiş olması etkinin neye bağlı olduğu konusunda net sonuca ulaşılamamasına neden olmuştur. Bu nedenle TM ile ilgili ciddi planlanmış çalışmalara gereksinim olduğu bir gerçektir (37).

2.6.3. Opioid Reseptör Antagonistleri

Akut omurilik yaralanması sonrası endojen opioid seviyesinde artış ve opioid reseptör aktivasyonu, sekonder hasarın şiddetlenmesinde rol oynamaktadır (37).

Dinorfin kappa reseptörleri üzerinden etkilidir. Mikrosirkülatuar kan akımını azaltır, sekonder yaralanmayı arttır. Naloksan ve tirotropin releasing hormon (TRH) gibi endojen antagonistler bazı hayvan modellerinde spinal kord kan akımını artırıp nörolojik defisitleri azaltmışlardır. Bazı çalışmalarda ise nörolojik iyileşmeye katkıları olmamıştır. NASCİS faz II çalışmasında naloksan plasebodan daha iyi klinik gösterememiştir. Fakat toplanan verinin reanalizi yaralanma sonrası ilk 8 saatte fonksiyonel iyileşmeye katkısını göstermiştir (8). Ayrıca naloksanın paretik hastalarda daha etkili olduğu gösterilmiştir (114-116).

Çeşitli araştırmalarda naloksanın etkisi opioid benzeri maddelerin etkisini antagonize etmesine, Na^+ ve K^+ / Mg^{+2} ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltmasına, lizozomal membranı stabilize etmesine, cAMP'yi etkilemesine, proteolizisi inhibe etmesine, Ca^{+2} akımını değiştirmesine, antioksidan aktivitesine, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesine, travma sonrası omurilik kan akımını düzeltmesine bağlanmıştır (117-119).

Bir κ -reseptör antagonisti olan Norbinolterfimin'nin kedilerde oluşturulan akut spinal kord travması sonrası sonuçları anlamı derecede düzelttiği gösterilmiştir (120). Ayrıca yine κ - reseptör antagonistlerin kullanıldığı diğer deneysel spinal kord hasarı çalışmalarında sonuçlar olumlu gözükmektedir. Sonuç olarak opioid antagonistlerin ilaç doz programı ve tedavi zamanlamasının tespiti için başka çalışmalara ihtiyaç vardır (37).

2.6.4. Gangliozidler

Gangliozidler; santral sinir sistemi hücrelerinin membranlarının dış yaprağında yüksek konsantrasyonda bulunan kompleks asidik glikopeptidlerdir (37). Monosialotetraheksosilgangliozid (GM-1 Gangliozid) SSS'de nöronların aksonlarında, myelin kılıflarında ve beyaz cevher içerisindeki glial hücrelerde bulunur (121). Deneysel SSS travmalarında GM-1 gangliozid'in sinir rejenerasyonunu stimüle ettiği ve anterograd-retrograd dejenerasyona karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (37). Gangliozid'lerin öne sürülen etki mekanizmaları eksitator amino asitlerin salınımını azaltmaları, protein kinaz C regülasyonu ve NO oluşumunu engellemelerine bağlıdır (109). Protein kinaz C'nin inhibisyonu posttravmatik iskemiden korunmada önemli gözükmektedir (37).

2.6.5. Tirotropin Salıcı Hormon (TRH) ve TRH Analogları

Tirotropin salıverici hormon (TRH)' un hipofiz üzerinden tiroid stimüle edici hormon (TSH) salgılamasından başka görevleride vardır. TRH'in antagonize ettiği faktörler: endojen opiatlar, trombosit aktive edici faktör, lökotrienler ve eksitator aminoasitler olduğu düşünülmektedir. Faden ve ark. TRH'in omurilik kan akımının artmasında ve nörolojik fonksiyonu düzeltmede etkili olduğunu gösteren çalışmaları vardır (75). TRH'in çok kısa yarı ömrü olması nedeniyle daha stabil analogları geliştirilmiştir. TRH'in omurilik yaralanmasındaki spesifik etkisi iyi bilinmemekte ise de spinal refleksleri potansiyelize ettiği ve kolinerjik nöronlar üzerinde trofik etkileri olduğu saptanmıştır. Bu nedenle TRH, yaralanmanın gelişmesini önlemekten çok iyileşme fazında daha etkili olabileceği belirtilmiştir (45, 114).

2.6.6. Antioksidanlar ve Serbest Radikal Yakalayıcılar

Hayvanlarda SSS mekanik travması sonrasında reaktif oksijen türevlerindeki belirgin artış artık çok iyi bilinmektedir. Reaktif oksijen türevleri (ROS) inhibisyonu çeşitli yaralanma tipleri sonrasında davranışsal ve fonksiyonel iyileşme sağlayabilir. Dokunun oksidatif stresini azaltmanın, sekonder nöron hasarını azaltmada efektif bir

farmakolojik yaklaşım için potansiyel bir hedef olduğu düşünülmektedir. Askorbik asit, hipotermi ya da her ikisinin kombinasyonunun süperoksit ve lipid peroksidasyonunu belirgin suprese ettiği gösterilmiştir. Kombinasyon tedavisinin ayrı ayrı tedavi ile karşılaştırıldığında daha efektif olduğu saptanmıştır. Askorbik asit serbest radikal türevlerini sitozolde kurtarır ve alfatokoferoksil radikalini hücrel membranlar için alfa-tokoferole indirger. Hipotermi oksijen metabolizma hızını eksitotoksisteyi azaltır. Farklı mekanizmalarla olsa da askorbik asit ve hipotermi sinerjik etki ile ROS üretimini ve ilişkili hasarı azaltır (122). Yapılan bir çalışmada lipid peroksidasyonunun travmadan 15 dakika sonra arttığı, 1. saatte maksimum ve sonrasında düştüğü gösterilmiştir. Geç fazda hasarlı bölgede nörotropin gözlendi (123). Posttravmatik PMNL hücre infiltrasyonunun genişliğini gösteren myeloperoksidaz, yaralanmadan sonra 4. saatte max seviyesine ulaşmıştır. Nötrofilardan salınan O₂ metabolitleri hücre membranına toksiktir. EPC-K1; vitamin E ve vitamin C'nin bir fosfat diester bağlanmış halidir. Sonuçlar EPC-K1'in in vitro radikal kurtarıcı, protektif ve antioksidan aktivitesi olduğunu göstermektedir (124).

Akut omurilik yaralanması sonrası lipid peroksidasyonu endojen antioksidanlar tarafından azaltılmaktadır (125). Ancak travma sonrası α - tokoferol, retinoik asid, askorbik asid, selenyum, koenzim q gibi ubikinonlar benzeri antioksidanların seviyeleri hızla düşmektedir (112). Bu nedenle antioksidanların replasmanı lipid peroksidasyonuna bağlı hasarın azaltılmasında etkili olabilir (37). Deneysel spinal kord hasarı çalışmalarında Vit A ve Vit C tedavisinin faydalı olduğu gösterilmiştir (37). Yine yapılan birçok SSS yaralanma modelinde α -tokoferol tedavisinin doku hasarını azalttığı gösterilmiştir (109).

2.6.7. Kalsiyum Kanal Blokörleri

Yaralanma veya iskemi sonrası hücre membranının hasara uğraması sonucunda Ca⁺² kanallarının depolarize olması sonucunda Ca⁺² hücre içine akışı olur. Kalsiyum kanal blokörleri Ca⁺²'nin hücre içine girişini engelleyerek omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkili olabileceği düşünülmüştür. İntrasellüler Ca⁺² birikimi toksik nöral hücre ölümünün son ortak yolu olarak isimlendirilmekte ve spinal kord hasarının patofizyolojisinde integral rol oynamaktadır (37). Hücre içine Ca⁺² akışı

direk nörotoksik etkisine ek olarak, vasküler düz kas hücrelerinde vazospazma yol açar. Bununla ilişkili olarak kalsiyum kanal blokörlerinin yararlı etkilerinin travma sonrası mikrovasküler yapılarda oluşan vazospazma yönelik koruyucu özelliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir (126). Dihidropridin grubu kanal blokörlerinden Nimodipin üzerinde en çok çalışılmış ajandır. Yapılan deneysel çalışmalarda Nimodipin'in yararlı etkilerinin ancak travma öncesi başladığında ortaya çıktığının görülmesi, tedavinin klinik kullanımının öneminin ve pratikliğini sınırlandırmasına neden olmuştur (37).

2.6.8. Magnezyum

Magnezyum sülfat ($MgSO_4$) kontüzyon yaralanmasından sonra nöroprotektif özellik göstermiştir. NMDA reseptör blokajı ile nöral yapılarda glutamat toksisitesini önler. Serbest radikal düzenlenmesini azaltarak nöral yapılarda vazoproteksiyon sağlar. Ayrıca endotelial prostasiklin salınımını stimüle ederek spinal kord besleyen damarlarda dilatasyon sağlar (127). Spinal travma sonrası sekonder hasardan korunmada Mg^{+2} replasman tedavisine yönelik çalışmalar yapılmaktadır (37). Yüksek doz Mg^{+2} tedavisinin ($600mg/kg MgSO_4$) farelerde akut spinal kord hasarı sonrası aksonal fonksiyonlarda anlamlı gelişme sağladığı ve lipid peroksidasyonunda ciddi düşüş meydana getirdiği gösterilmiştir (128).

2.6.9. Sodyum Kanal Blokörleri (TTX)

Başlangıç travma sonrası hücre içi Na^+ miktarında ciddi bir artış söz konusudur. Bu nedenle sodyum kanal blokajının sekonder hasarın şiddetlenmesinin engellenmesinde önemli olabileceği düşünülmektedir (37). Bu konuda Tetradoksin'in lokal uygulaması ile yapılan bir çalışmada travma sonrası fonksiyonel defisit azaltılmasında önemli olduğu gösterilmiştir (129). Schwartz ve Fehlings yaptıkları deneysel bir çalışmada, bir sodyum kanal blokörü olan Riluzol'un sistemik uygulanmasında ciddi nöroprotektif etkileri olduğunu gösterdiler (130).

2.6.10. Araşidonik Asit Metabolizması Modülatörleri

Araşidonik asidin tromboksan, prostaglandinler ve lökotrienlere dönüşümünden sorumlu olan enzim inhibisyonunu hedef alan tedavi girişimleri akut omurilik yaralanması sonrası denemiştir (37). Prostaglandin (PGI₂) vasküler endotelden salınan güçlü vazodilatatör ve platelet agregasyon inhibisyon etkisi olan doğal bir arşidonik asit metabolitidir (131). Hallenbeck ve ark. yaptığı bir çalışmada PGI₂'nin bulunduğu kombine tedavinin travma sonrası nörolojik fonksiyonlarda plaseboya göre anlamlı iyileşme sağladığı gösterilmiştir. Siklooksijenaz inhibitörleri, tromboksan sentetaz inhibitörleri ve prostosiklin ile yapılan kombine tedavinin rat omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir (37, 109).

2.6.11. Diğer Tedavi Denemeleri

Akson içinde K⁺ fazlalığı aksiyon potansiyelinin blokajına yol açar. 4-aminopyridin (4-AP), internodal bölgelerdeki K⁺ kanallarının blokörüdür. 4-AP, aksiyon potansiyelinin süresini uzatarak demiyelinize alanlarda sinir iletisini artırır. K⁺ kanal blokörlerinin kronik dönemde nöronal fonksiyonun yeniden sağlanmasında olumlu etkilerinin olduğuna inanılmaktadır (110, 132).

Nörotropik büyüme faktörü'nün deneysel omurilik yaralanmaları sonrası nöronal dejenerasyondan korunmada etkin olabileceği gösterilmiştir (37). 5-HT₁ ve 5-HT₂ alt grup serotonin reseptör antagonistleri ile yapılan deneysel çalışmalarda travma sonrası faydalı olabilecekleri saptanmıştır. Günümüzde omurilik yaralanması sonrası hücre ölümünün apoptotik kaskadına yönelik terapötik korunma çabaları önem kazanmıştır (37). Bu yönde yapılan çalışmalarda zDEVD fmk ile yapılan kaspaz 3 inhibisyonunun ve anti-apoptotik protein olan Bcl-2'nin deneysel kord hasarı sonrası nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (133). Sitokinler, serbest radikal hasarı ve eksitotoksitite gibi sekonder hasar mekanizmaları ile tetiklenen apoptozda, bu etkene yönelik tedavinin programlı hücre ölümünden korunmada önemli olabileceği düşüncesini desteklenmektedir (37). Siklosporin A, Ca²⁺'nin tetiklediği mitokondri iç membranındaki permabilite değişikliklerinin inhibisyonu ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu etkisi ile hücre ölümünden korunmada önemli

olabileceği deneysel travmatik kord hasarında ortaya konmuş bir ajandır (37). Melatonin antioksidan ajan olarak nöroprotektif etki gösterir. Membran lipidleri üzerine anti oksidan etkisinden dolayı deneysel çalışmalarda lipid peroksidasyonunu azaltarak omuriliği ikincil doku hasarından koruduğu bildirilmiştir (134). Hipoterminin omurilik kan akımını önemli oranda azalttığı ve perfüzyonu etkilediği bilinmektedir. Etki mekanizması konusunda çeşitli görüşler vardır. Oksijen serbest radikallerini azalttığı, eksitatör amino asid nörotransmitter glutamatın serbestleşmesini baskıladığı, hücre içi Ca²⁺ birikmesini azalttığı, enflamatuar cevapları engellediği, polimorfonükleer lökosit birikmesini önemli oranda azalttığı bildirilmiştir (135). Hiperbarik oksijen tedavisi Omurilik yaralanmasının erken döneminde (ilk 6 saat) uygulandığında iskemiye önleyerek akson ve miyelin hasarını azaltarak nöronal rejenerasyonu sağladığı ve nörolojik iyileşme üzerine etkili olduğu yayınlanmıştır (136, 137). Akut omurilik yaralanmasının patofizyolojisine yönelik modern tedavi girişimlerinin devam etmesi, bu yıkıcı problemin çözülmesindeki umudun artmasını sağlamaktadır (37).

3. MATERYAL VE METOD

Bu deneysel çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alınarak Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı ve Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında üretilmiş 40 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta kullanılan ratların ağırlıkları 220-270 g arasında değişmekteydi ve ortalama ağırlık 230 gramdı.

3.1. Deney Grupları

Çalışma 4 grup olarak planlandı. Bunlar sırasıyla:

I.Grup: (G1; Kontrol) yalnızca laminektomi

II.Grup: (G2; Travma) laminektomi+spinal travma

III.Grup: (G3; Düşük doz İlaç) laminektomi+spinal travma+Hesperidin (50 mg/kg)

IV.Grup: (G4; Düşük doz İlaç) laminektomi+spinal travma+Hesperidin (100mg/kg)

3.2. Anestezi

Genel anestezi amaçlı 30 mg/kg dozunda ketamin intraperitoneal olarak uygulandı.

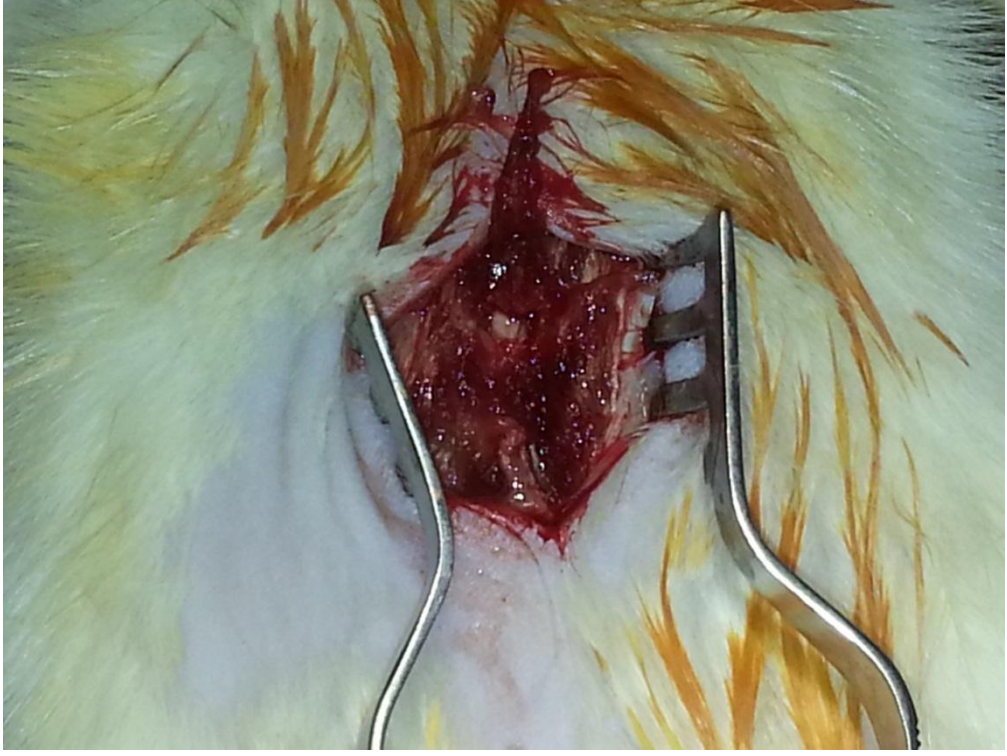
3.3. Travma Aygıtı

Standart travma oluşturmak amacı ile Yaşargil anevrizma klipi kullanıldı. Rivlin Tatorun klip yöntemi uygulandı (139).

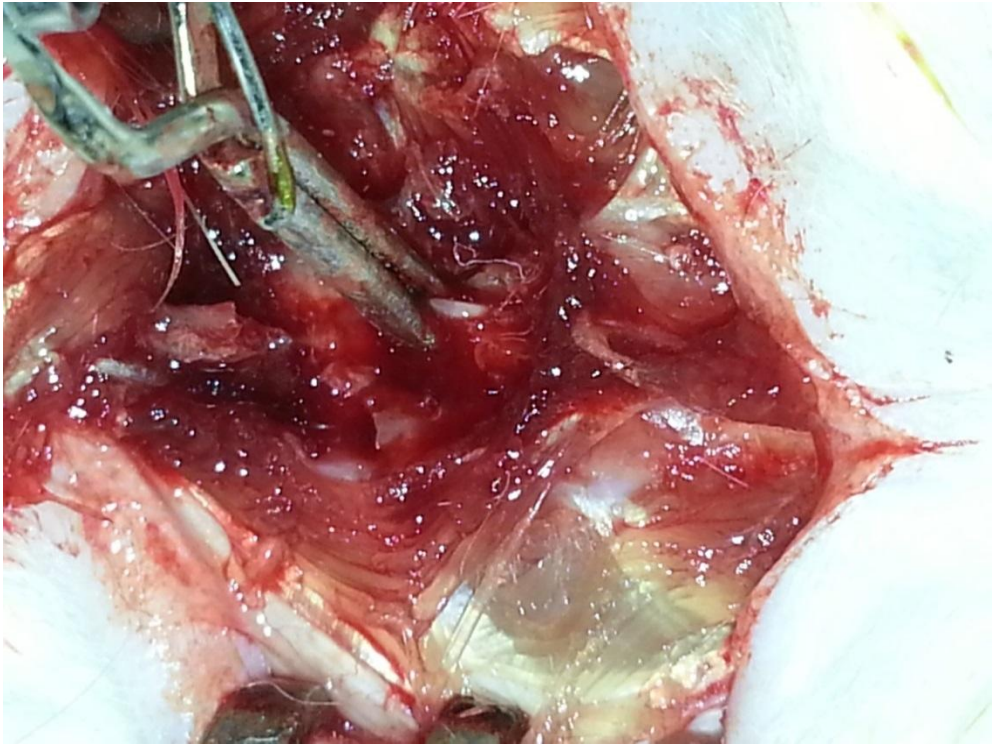
3.4. Cerrahi Girişim

Sıçanlar tespit tahtalarına prone pozisyonunda yerleştirildi. Torakal bölgesi önce PVD iyodin (Batticon st solüsyon) ile sterilize edildikten sonra traşlandı. Cilt traşından sonra tekrar PVD iyodin ile sterilizasyon sağlandı. Operasyon boyunca ve

anestezik etki sonlanana kadar ısıtıcı pedle vücut ısısı 37 C de tutuldu. İnterskapular mesafe referans alınarak T5-T12 seviyesinde 2 cm'lik insizyonla cilt, cilt altı geçilip paravertebral adaleler sıyrılıp, laminalar ortaya kondu.T7-10 laminaları mikroskop altında alındı. Klip ekstradural 1 dakika süre ile uygulandı. Klip çıkarıldı. Laminektomi veya klip kompresyonu sırasında durası zedelenen denekler çalışma dışında bırakıldı. Hemostazı takiben paravertebral adaleler ve cilt anatomik katlarına uygun olarak 3/0 vicryl ile primer suture edildi. Cilt suture edildikten sonra 3. grup deneklere 50 mg/kg dan hesperidin intraperitoneal olarak uygulandı. Aynı şekilde 4. Grup deneklere 100mg /kg dan hesperidin intraperitoneal olarak uygulandı. Cerrahi ve travmatik girişimi takiben sıçanlar normal oda ısısında, kafeslere alındı. 24.saat sonunda inclined plane testi uygulandı ve sonrasında sakrifiye edilen herbir denek öncelikle intraperitoneal enjeksiyon ile derin anestezi altında toraks duvarı processus xiphoideus'dan başlayıp costaların iki yanından parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve kranial yönde kaldırılıp sabitlendi. Diyafram ve peri kardium kesilerek intrakardiak olarak denekten kan örnekleri alındı. Sonrasında klip uygulanan omurilik kısmının 2 cm lik distal ve proksimal bölgeler doku örnekleme için eksize edildi. Vakumlu jelli tüplere alınan kanlar, 3500 devirde 5 dakika çevrildi ve elde edilen serumlardan MDA ve TAS çalışıldı. Dokular %0.1 (v/v) Tween 80 içeren 0.1 M Tris HCl tampon eklenerek homojenizatör (Ultra Turrax Type T25-B, IKA Labortechnik, Germany) ile buz üzerinde homojenize edildi. Daha sonra elde edilen homojenatlar 8000 g'de 4°C'de santrifuj edildi. Supernatanlarından protein konsantrasyonları Lowry metodu ile çalışıldı (138).



Şekil 8: Laminektomi sonrası spinal kord



Şekil 9: Klip kompresyon uygulaması

3.5. Fonksiyonel İyileşmenin Değerlendirilmesi

Inclined Plane Testi: Deneysel akut medulla spinalis yaralanmalarında sık kullanılan Rivliv ve Tator'un tarif ettiği eğimli alan yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde hayvan düz bir tabla üzerine konulur. Tabla ilk olarak yere paralel iken daha sonra eğimi artırılarak hayvanın besin ile motivasyonu sağlanarak tablanın üzerinde tırmanması sağlanır. Hayvanın tabla üzerinde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı hayvanın inclined plane açısı olarak kabul edilir. Çalışmamızda tüm gruptaki deneklere cerrahi işlemden 24 saat sonra denekler sakrifiye edilmeden önce Inclined Plane testi uygulandı.

Klinik Motor Muayene: Klinik motor muayenede Tarlow'un tarif ettiği skala kullanıldı (47).

Grade I: Flask paralizi

Grade II: Arka bacaklarda minimal istemli hareket mevcut.

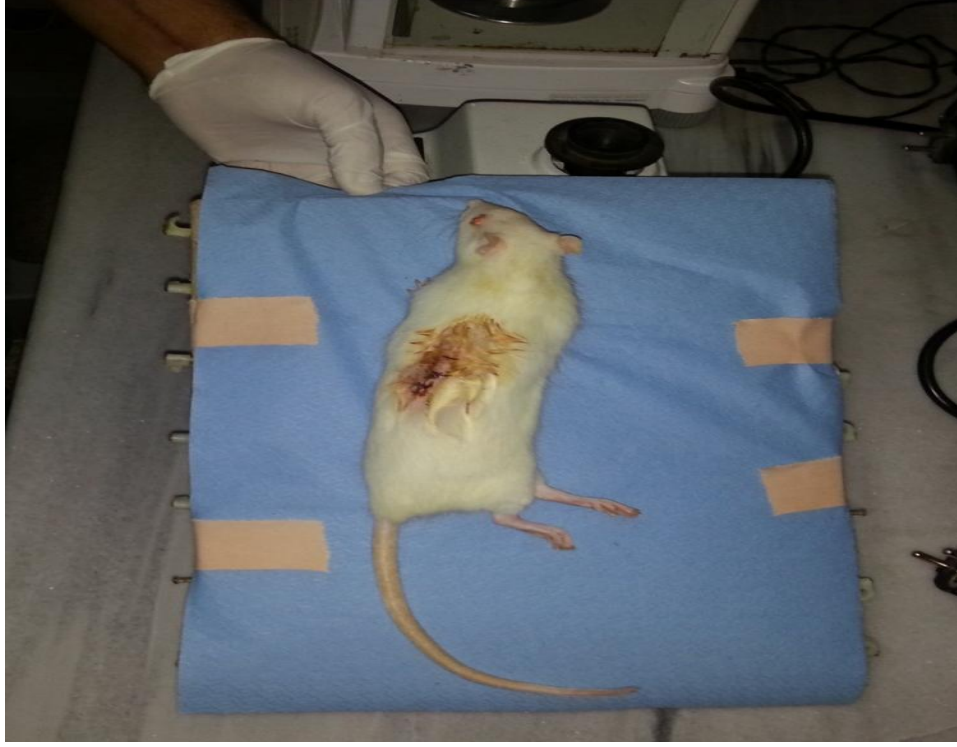
Grade III: Ayakta durabiliyor, gövdeye aktif destek var ancak yürüyemiyor.

Grade IV: Yürüme mevcut ancak inkoordinasyon ve spastite var.

Grade V: Normal yürüyüş



Şekil 10: Inclined plane testi (yandan görünüş)



Şekil 11: Inclined plane testi (üstten görünüş)

3.6. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Biyokimyasal veriler spinal kord dokusunun MDA düzeyleri ve TAS ölçülerek elde edildi.

MDA çalışması: Serum ve doku MDA düzeyleri yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle Agilent 1200 markalı HPLC (Münih, Almanya) cihazında Immundiagnostik markalı MDA'nın ticari kitleri (Bensheim, Almanya) kullanılarak çalışıldı. Çalışmanın prensibi derivasyon reaktifi ile yapılan örnek hazırlama işlemi sonucu MDA floresan bir ürüne çevrilmesine dayanır. Floresan ürüne çevrilen MDA içeren 20 µl reaksiyon karışımı 30°C'de reverse faz C18 kolon kullanılarak ayrıştırılması sonrası 515 nm eksitasyon ve 553 nm emisyonunda florometrik ölçümü yapılır. Yöntemin dedeksiyon limiti 0.15 µmol/L ve linearitesi 100 µmol/L'dir.

TAS çalışması: Serum ve doku total antioksidan seviyesi (TAS) Immun Diagnostic (Bensheim, Germany) firmasının ticari ImAnOx (TAS/TAC) kiti ile çalışıldı. Bu testin ölçüm prensibi bilinen miktarda ekzojen hidrojen peroksidin örneğe eklenmesi sonrası örnekteki antioksidanlar ile hidrojen peroksidin reaksiyonuna dayanır. Örnekteki antioksidanlar eklenen hidrojen peroksidin belirli bir kısmını uzaklaştırır, artan hidrojen peroksit enzimatik reaksiyon ile TMB'yi renkli bir bileşiğe dönüştürür. Oluşan renkli bileşik fotometrik yöntemle ölçülür.

Tablo 12: TAS çalışma prosedürü

	Örnek	Kalibratör	Kontrol
Örnek	10 µl		
Kalibratör		10 µl	
Kontrol			10 µl
Kuyucuklara pipetlenir.			
Reaktif 1	100 µl	100 µl	100 µl
37°C'de 10 dakika inkübe edilir.			
Reaktif 2a (Enzim İçerir)	100 µl	100 µl	100 µl
Reaktif 2b (Enzim İçermez)	100 µl	100 µl	100 µl
Oda ısısında 5 dakika inkübe edilir.			
Stop Solusyon	50 µl	50 µl	50 µl

ELISA okuyucu cihazında 450 nm'de enzim içeren örnekler ile enzim içermeyen örneklerin absorbanları alındı. Sonuçlar enzim içermeyen örneğin/kalibratörün optik dansitesinden enzim içeren örneğin/kalibratörün optik dansitesinin çıkarılması sonrası elde edilen delta optik dansite (ΔOD örnek/kalibratör) kullanılarak hesaplandı.

3.7. Histopatolojik ve Morfometrik Değerlendirme

Histolojik incelemeler amacıyla, spinal kord örnekleri nötral tamponlu %10'luk formalin solüsyonunda fikse edilerek 1 hafta buzdolabında 4°C'de saklandı ve daha sonra taze fiksatifte alındı. Fikse doku örnekleri parafine gömülerek, mikrotom ile horizontal düzlemde 5 mikron kalınlığında kesildi. Her örnekten hasarlı kord segmentinin ortası merkez alınarak üç düzeyde kesitler elde edildi: (i)hasarlı kord segmentinin tam ortası, (ii) 3 mm rostrali ve (iii) 3 mm kaudali. Lam üzerine alınan kesitler hematoksilin ve eozin (H&E) yardımıyla boyanarak ışık mikroskobunda ödem, konjesyon, hemoraji, nöronal dejenerasyon ve nöron kaybı açısından değerlendirildi. Hasarlı kord segmentinin orta kısmından elde edilen kesitler, ayrıca kristal viyole ile boyanarak, görüntü analizi programı ile (Leica QWINPlus v.3.1.0 ; Leica, Solms, Germany) nöron kaybı açısından incelendi. Her kesitte gri maddede rasgele 10 alan seçilerek X100'lük büyütmede nöron sayıları belirlendi.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 19.0 paket programında yapılmıştır. Veri setinde yer alan sürekli değişkenlere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleriyle; kategorik değişkenler frekans ve yüzde ile gösterilmiştir. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunlu Shapiro-Wilk testi ile incelenmiştir. Normal dağılım gösteren değişkenlerin 4 grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), anlamlı çıkan değişkenlerin 2'li alt grup karşılaştırmalarında Tukey testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen değişkenlerin 4 grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, 2 grup karşılaştırmalarında Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Çalışmadaki tüm istatistiksel karşılaştırmalarda p değeri 0,05'in altındaki karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hücre membranlarında hasar oluşturan reaktif oksijen türevlerinin aracılık ettiği lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA ve TAS değerleri Tablo 13 de karşılaştırılmıştır.

Tablo 13: MDA ve TAS değerleri

	G1	G2	G3	G4	P
Serum MDA	1,92 (1,36-3,32)	1,94 (1,52 – 2,84)	2,40 (1,61 – 4,35)	1,85 (1,58 – 2,78)	0,582
Serum TAS	272,29 ± 33,94	300,13 ± 24,58	148,13 ± 35,20	162,13 ± 27,88	<0,001*

4 grup arasında serum MDA bakımından fark yok (p=0,582)

4 grup arasında serum TAS bakımından fark var (p<0,001)

G3 ve G4 MDA ve TAS bakımından benzer

G1 ve G2 MDA ve TAS bakımından benzer

Ancak G1-G2 ile G3-G4 birbirinden farklı

	G3	G4	p
Doku MDA	0,125 (0,06 – 0,22)	0,255 (0,13 – 0,29)	0,002*
Doku TAS	2,395 (1,65 – 2,96)	2,115 (1,74 – 3,73)	0,959

2 grup arasında doku MDA bakımından fark var (p=0,002)

2 grup arasında doku TAS bakımından fark yok (p=0,959)

4.1. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

Mikroskopik değerlendirmede G1 grubunda normal spinal kord dokusu ait histolojik görünüm izlendi (Resim 1). G2 grubunda ödem ve hemoraji ile birlikte gri maddede belirgin nöronal dejenerasyon görüldü (Resim 2). G3 ve G4 gruplarında hafif derecede ödem ve konjesyonun yanı sıra kısmi nöronal dejenerasyon bulguları izlendi (Resim 3 ve 4).

4.2. Morfometrik Sonuçlar

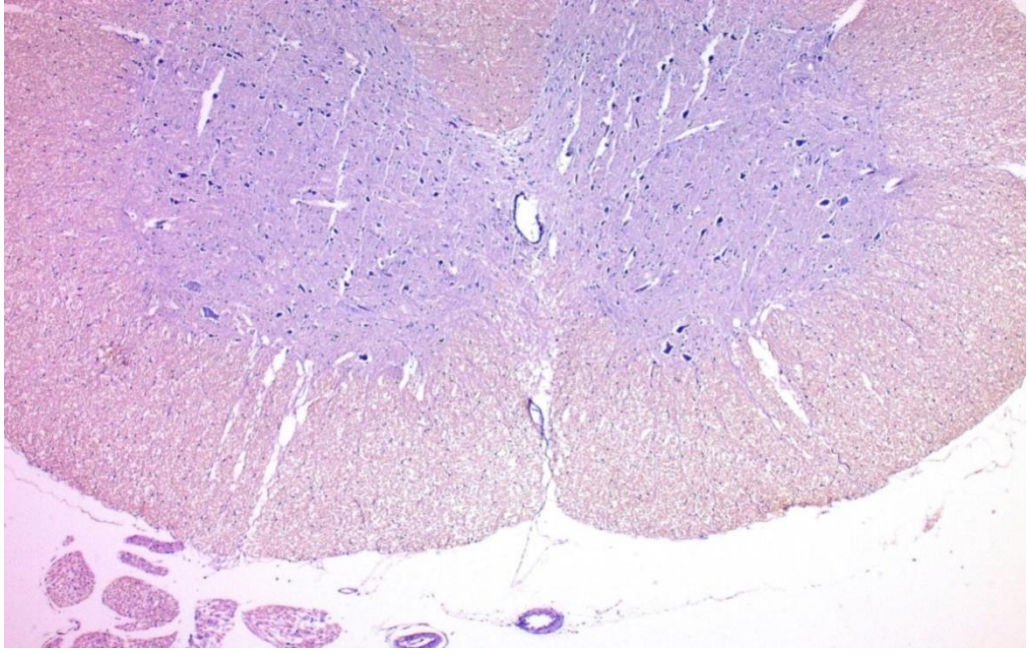
Yapılan incelemede nöron sayıları ile ilgili değerler tablo 14’de verilmiştir.

G1 de belirlenen nöron sayıları ile G2 ve G3 te belirlenen nöron sayıları arasında anlamlı fark gözlenmiştir. G1 ve G4 nöron sayıları arasında fark gözlenmemiştir.G2 ve G3 nöron sayıları arasında fark gözlenmemiştir. G4 te belirlenen nöron sayıları ile G2 ve G3 nöron sayıları arasında fark gözlenmiştir.

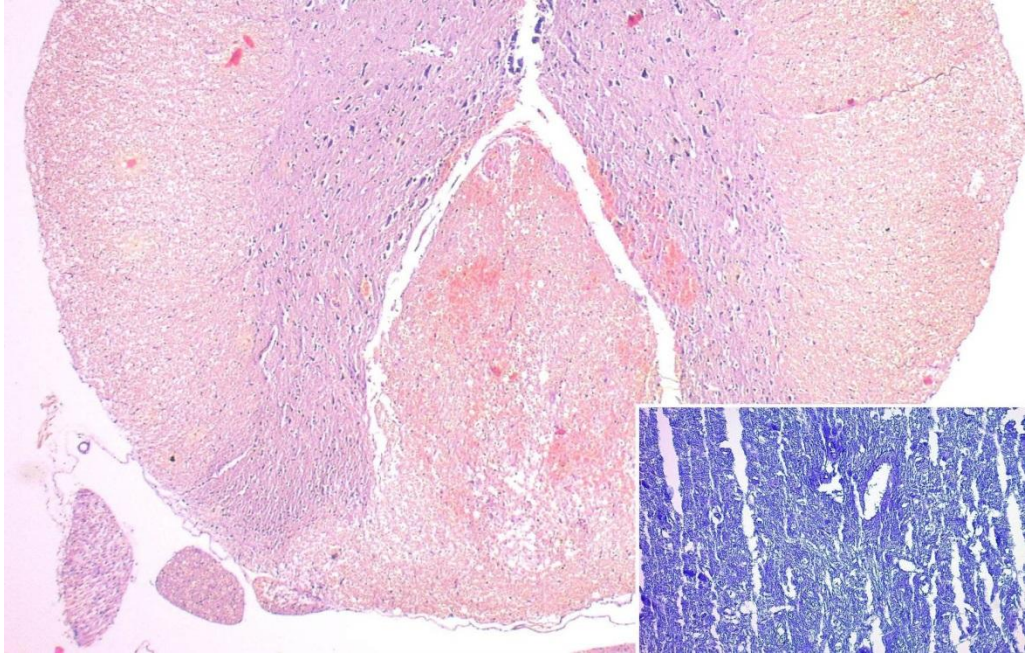
Tablo 14: Nöron sayıları ile ilgili değerler

Grup no	Denek sayısı	Nöron sayısı
G1	8	16.25 ±3.59
G2	8	11.03 ±2.57
G3	8	12.1 ±2.37
G4	8	14.9 ±3.01

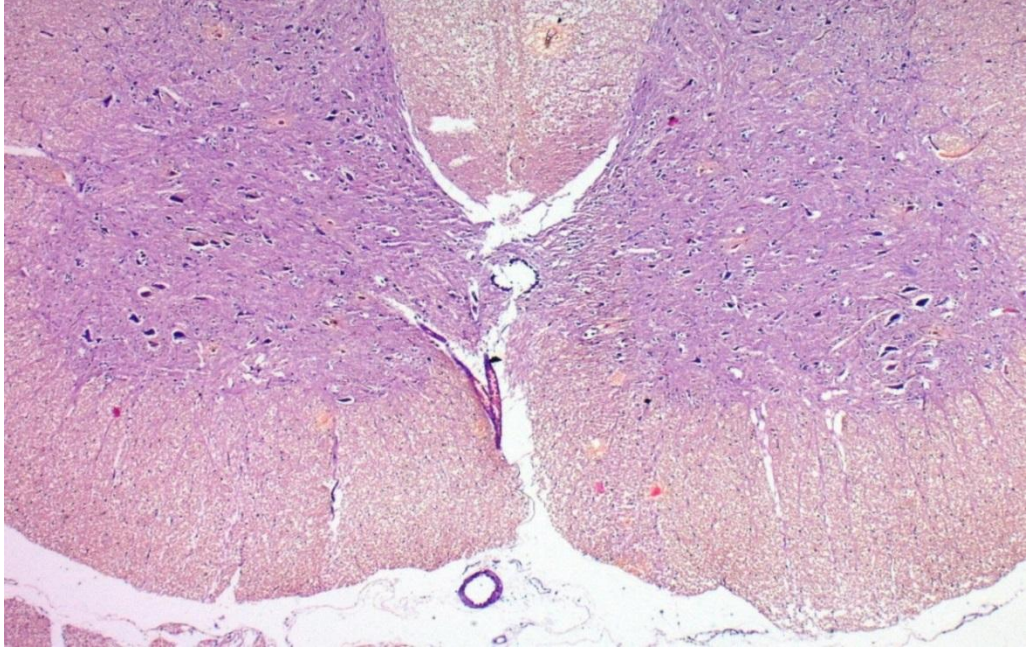
G1>G2 iki grup arasında fark vardır (p=0.021) ve G1>G3 iki grup arasında fark vardır (p=0.028). G1 ve G4 arasında fark yoktur (p=0.442). G2 ve G3 arasında fark yoktur (p=0.234). G2 ve G4 arasında fark vardır(p=0.015). G3 ve G4 arasında fark vardır (p=0.038).



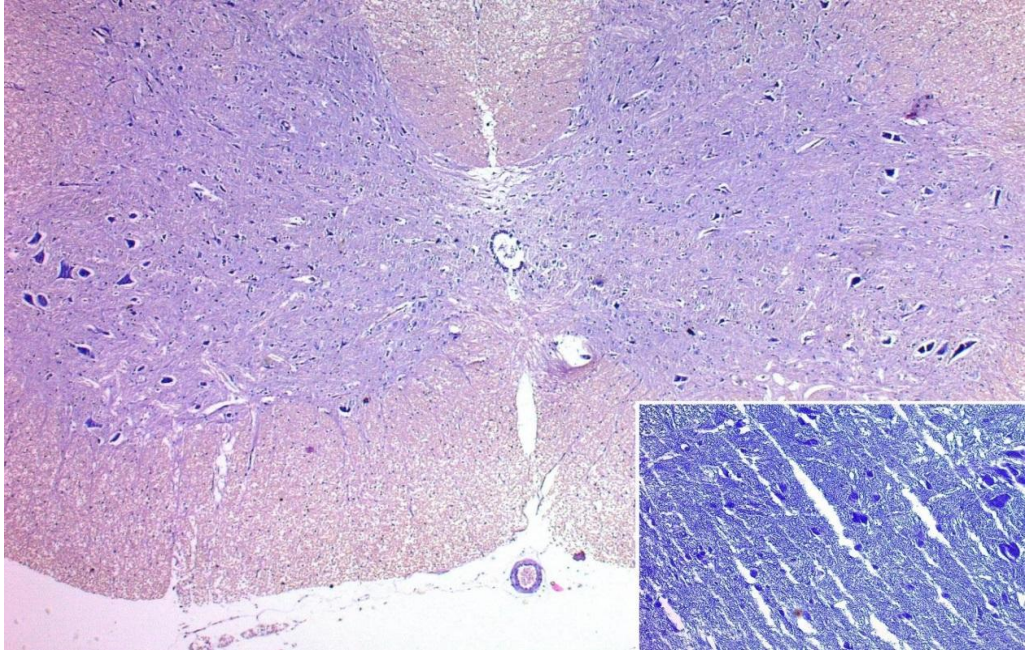
Resim 1: G1 (laminektomi) grubunda nöronların düzenli dağılım gösterdiği normale yakın histolojik özelliklerin izlendiği spinal kordun mikroskopik görünümü (H&E; X100).



Resim 2: G2 (laminektomi+klip) grubunda ödem, hemoraji ve gri maddedebelirgin nöronal dejenerasyon (H&E; X100) – (sağ alt köşede nöron hücre kaybı kristal viyole boyası ile gösterilmiştir).



Resim 3: G3 (Düşük Doz) grubunda nöron dejenerasyonunda ve hücre kaybında G2 grubuna kıyasla görece azalma (H&E; X100).



Resim 4: G4 (yüksek doz) grubunda, dejeneratif değişikliklerde ve hücre kaybında belirgin azalma (H&E; X100) – (sağ alt köşede nöron hücre kaybı kristal viyole boyası ile gösterilmiştir).

5. TARTIŞMA

Spinal kord yaralanması fiziksel, duygusal ve ekonomik boyutu ile toplumun geniş bir kesimini etkilemektedir. Birçok araştırmacı nörolojik fonksiyonları düzeltmek amacıyla akut omurilik yaralanması patofizyoloji mekanizmaları üzerinde değişik metodlar bulmaya çalışmaktadır. Oluşan hasarın meydana gelmesindeki iki mekanizma öne sürülmektedir (13). Medulla spinalise darbe olduğu ilk anda nöronlarda oluşan hasar primer yaralanma olarak adlandırılmakta ve primer yaralanmanın tetiklediği birçok mekanizmayla oluşan nörolojik hasar ise sekonder yaralanma olarak tarif edilmektedir.

Spinal hasarın sekonder mekanizmaları artmış glutamat seviyesi, Ca^{+2} 'ye bağlı nitrik oksit üretimi, hücrel membranlara serbest radikal hasarı ve lipid peroksidasyonudur (139).

Lipid santral sinir sisteminin ana yapısını oluşturur. Bu nöronal dokuları hidroksil radikallerine veya lipid peroksidasyonuna yatkın hale getirir. Lipid peroksidasyonu spinal kord hipoperfüzyonunu, ödem oluşumunu, aksonal iletim yetersizliğini bozar ve enerji metabolizmasında azalmayı artırır (140).

Literatürde Barut ve ark. yaptıkları spinal kord travması sonrası lipid peroksidasyon ölçüm çalışmasında, MDA düzeyleri erken dönemde (travmadan 1dk., 15 dk., 1,2 ve 4 saat sonra) bakılmış ve MDA düzeyinin 15 dk. sonra artmaya başladığını, 1. saatte maksimuma ulaştığını ve daha sonra düştüğünü gösterdiler (53).

Bu mekanizmaların yanında; opioid reseptör aktivasyonunun eksitotoksik sürece katkıda bulunabileceği μ ve δ opioid reseptörlerinin eksitotoksik süreci uzatabileceği, asetilkolin ve 5-hidroksitriptamin gibi nörotransmitterlerin seviyelerini arttırdığı bunun da vazokonstrüksiyona, endotelial permeabiliteye neden olarak sekonder hasara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (141-143).

Travma sonrası glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonu; erken evrede intrasellüler Na^{+} artışı ile nöronal şişme ve lizise neden olurken, bir sonraki aşamada artan intrasellüler Ca^{+2} ile birlikte Ca^{+2} bağımlı lipaz ve proteazların aktivasyonuna yol açarak hücre membranının ve nöroflamanların hasarına neden olur. Ayrıca glutamat toksisitesi lipid peroksidasyonunun başlaması, $Na^{+} - K^{+} ATP^{+}$ az inhibisyonu, membran kanal inaktivasyonu ve solunum zinciri enzim inhibisyonu gibi mekanizmalarla nöronal

ölümü şiddetlendiren reaktif oksijen ve nitrojen ürünlerinin meydana gelmesine yol açar (16). Faden ve ark. yaptığı çalışmada spinal kord travması sonrası artan NMDA reseptör aktivasyonunun gecikmiş doku hasarını arttırdığı bulunmuş ve bu reseptör blokajının tedavide yarar sağlayacağı belirtilmiştir (29).

Nesic ve ark. spinal kord hasarı sonrası NMDA reseptör blokörü MK 801 kullanımının gen ekspresyonunda kontrol grubuna göre %50'ye varan azalma olduğunu gösterdiler (38).

Sekonder hasarın ilerlemesinde önemli diğer bir mekanizma travma sonrası meydana gelen aşırı NO sentezidir. NO birçok fizyolojik fonksiyonunun yanı sıra patolojik durumlarda yüksek miktarlarda üretimi sonucu nörotoksik hale dönüşür ve bir serbest radikal olarak sekonder hasarın ilerlemesinde önemli rol oynar. NO sentezinde işlev gören 3 enzimden biri olan İNOS sağlıklı dokularda bulunmazken patolojik süreçlerde inflamatuvar mediatörler ve sitokinler tarafından uyarılarak aşırı NO oluşumuna neden olur. Bu ise peroksinitrit oluşumu, protein hasarı, lipid peroksidasyonunda artış, hücresel enerji kaybı mitokondrial solunumun durması ve DNA replikasyon inhibisyonu ile hücre ölümüne neden olur (74-76).

Suzuki ve ark. yaptıkları kompresyon tipi deneysel spinal kord travması çalışmasında erken dönemde İNOS inhibisyonun kronik fazda daha iyi fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını gösterdiler (75).

Apopitozda sekonder hasarlanmada önemli patolojik mekanizmalardan biridir. Bu yüzden apopitozu azaltmak spinal kord hasar tedavisinde önemli bir araştırma nedeni olmaktadır. Spinal kord hasarlanma sürecinde sinyal iletimi önemlidir. Uyarı iletimi ekstrasellüler uyarılar ile nükleer gen aktivasyonu arasındaki iletişimi sağlar. Bu yüzden eksternal hasar gen ekspresyonundaki değişikliklere neden olur. Uyarı iletiminin regülasyonu da spinal kord hasarlanma tedavisinin gelişiminde önemli bir yer alır (144,149).

Spinal hasardaki sekonder mekanizmalar hala farmakolojik tedavinin hedefi konumundadır.

Akut tedaviler nöroprotektif ilaçları içerir ve dört gruba ayrılır: Antioksidanlar, Nörotransmitter reseptör blokörleri, Fosfokinaz stimülatörleri, Fosfataz inhibitörleridir Antioksidanlar, hasara uğramış hücreler tarafından üretilen serbest radikaller veya reaktif molekülleri nötralize eder (150). Eksojen kaynaklı

antioksidanların birçoğu bugün yaygın olarak kullandığımız gıdalarda bulunmaktadır. Bunlar, bazı vitaminler, flavonoidler, polifenoller ve diğer bileşikleri kapsamaktadır (5).

Flavonoidler, glikozidler gibi canlı hücrelerde ortaya çıkarlar, sıcak, asit ve enzimlerle sırasıyla aglikon ve şekere parçalanabilirler. Fenolik Antioksidanlar (AH), lipid radikallere, hızla H⁺ vermesi şeklinde lipid oksidasyonu ile etkileşir. Görevi lipid peroksi (ROO[·]) ve alkoksil (RO[·]) radikalini parçalamak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmaktır (151).

Hesperidin ise portakal, limon gibi turunçgillerde bol miktarda bulunan bir bioflavonoiddir. Hesperidin analjezik, antikarsinojenik, antihipertansif, antiviral, antiinflamatuvar, antioksidan etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Hesperidin güçlü bir radikal temizleyicisi olduğuna inanılmaktadır (152,103).

Hwang ve ark. hesperidin iskemi-reperfüzyon gibi durumlarda nörodejenerasyonu önleyebileceği ve beyin fonksiyonlarını sağlıklı bir şekilde devam etmesine yardım edebileceğini bildirilmişlerdir (153). Öztanır ve ark. C57BL/6J farelere global serebral iskemi-reperfüzyon modeli uygulanmış, 10 gün süreyle intraperitoneal (i.p.) olarak hesperidin (100mg/kg) verilmiştir. Sonuçta hesperidin glutatyon (GSH), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve Gpx seviyelerini önemli derecede azalttığı ve nöroprotektif etkileri gösterilmiş (154).

Kamışlı ve ark. yaptığı çalışmada sisplatinin yarattığı oksidatif stresin santral ve periferik sinir sistemi üzerine toksik etkiye sahip olduğu, hesperidin eklenmesiyle antioksidan enzim seviyesini (SOD, CAT, Gpx arttırdığı, Tiyobütirikasit reaktif madde (TBARS) seviyelerini, EMG değişikliklerini ve dokudaki histolojik değişiklikleri azalttığı belirtilmiş. Bu durumun hesperidin antioksidan, antiinflamatuvar serbest radikalleri temizleyebime özelliğinden kaynaklanabileceği vurgulanmış (155). Kara ve ark. retinal apoptosiz sırasında ve retinal iskemi-reperfüzyon morfolojisi olan ratlarda Trihidroksil içeren flavonların (hesperitin, naringin) protektif rol oynadığı gösterilmiş (156).

Acar ve ark. sinir sistemi poliansature yağlardan yüksek miktarda içerdiğinden dolayı serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizlikten kaynaklı bir durum olan oksidatif stresin nörolojik hastalıkların patogenezinde önemli rol oynadığını belirtmişler (157). Shagirtha ve ark. ratlara 40

mg/günden verilen hesperitinin testiste cadmiyum birikimini azalttığını ve bu biyokimyasal reaksiyonun antioksidan sistem aktivitesini arttırarak oksidatif stresi baskılamasıyla ilişkili olduğunu belirtmişler (152). Son zamandaki çalışmalar spinal kord hasarlanma süreci ile alakalı uyarı yollarını tanımlamıştır. Bunlar MAPK, PI3K/Akt, gsk-3beta ve JAK/STAT dır (158-161).

Gaur hesperidin tedavisinin iskemi reperfüzyon beyin hasarı olan yetişkin ratlarda nöro davranışsal değişiklikleri önemli ölçüde iyileştirmiş olduğunu ve bu koruyucu etkinin L arginin tarafından azaltıldığını ama bu etki L-NAME ile önemli ölçüde arttırıldığını göstermiş. Bu sonuç, L-arjinin-NO sinyal yolağının hesperidinin serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi ile ilişkili olduğunu gösterdi (101).

Rong ve ark. Hesperidinin hipoksik iskemik beyin hasarındaki nöroprotektif etkilerinin olası mekanizmasını anlamak için neonatal ratlarda immatür nöronların sağkalımı ile ilişkisi olan Akt sinyal yolağı üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. PI3k/Akt sinyal yolağı nöronal sağkalım regülasyonunda önemli rol oynar. IGF -1, PI3K veya Akt reseptöründe over ekspresyonu nöronal büyüme ve farklılaşmaya neden olur. Bu çalışmada hesperidinin önceden verilmesiyle FoxO3 seviyelerini serbest radikal düzeyini azalttığı bu durmunda Akt fosforilasyonu ile olduğu belirtilmiş (162).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda, hesperidinin antioksidan etkisi gösterilmiş olmasına rağmen bizim yaptığımız çalışmanın biyokimyasal incelemelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu durum, hesperidinin antioksidan etkisini, incelediğimiz biyokimyasal parametrelerden farklı parametreler üzerinden gösterdiği veya çalışılan parametrelerin antioksidan etkinin gösterilmesinde yeterli olamayabileceği sonucuna ulaştırabilir. Yaptığımız çalışmada spinal kord travması sonrasında nöron sayılarında belirgin azalma meydana gelmiştir. Yüksek doz hesperidin kullanılan grupta nöron sayılarının kontrol grubuyla benzer olduğu tespit edilmiştir. Yüksek doz hesperidin tedavisi sonrasında histopatolojik parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı düzelme sağlanmıştır. Sonuç olarak literatürde ortaya konmuş olan hesperidinin nöroprotektif etkisi (101,153-156,162) yaptığımız çalışmada histomorfometrik olarak gösterilmiştir.

Planlanacak olası çalışmalarda, çalışılacak denek sayısının fazla tutulması, çalışma suresinin farklı zaman aralıklarında yapılması, hesperidinin daha yuksek dozda ya da daha uzun sureli kullanılması, daha geniş biyokimyasal parametrelere bakılması ile istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlara ulaşılabileceği kanısındaız.

6. SONUÇ

Hesperidinin antioksidan etkisi daha önce yapılmış çalışmalar ile bilinmektedir. Literatüre baktığımızda spinal kord travma modelinde kullanımına yönelik çalışma sayısı sınırlıdır.

Yapmış olduğumuz deneysel çalışmanın değerlendirilmesi sonucunda, yüksek doz hesperidin kullanılan grup, kullanılmayan grup ile histomorfometrik olarak karşılaştırıldığında nöron sayıları bakımından belirgin bir artış mevcut olup bu sayısal farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konmuştur. Yüksek doz hesperidinin, deneysel spinal travma modelinde nöronal sekonder hasarın önlenmesinde olumlu etkilerini olduğu söylenebilir.

Hesperidinin etkilerinin araştırılması ve faydalı etkilerinin ortaya çıkarılması, yapılacak ileri çalışmalar ile de desteklenmesi halinde, yüksek mortalite ve morbiditeye sahip bu hastalığın tedavisinde klinik uygulamalara ışık tutacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1- Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology demographics and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* (26):2-12, 2001.
- 2- Karamehmetoglu SS, Unal S, Karacan I, Yilmaz H, Togay HS, Ertekin M, Dosoglu M, Ziyal MI, Kasaroglu D, Hakan T. Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An Epidemiological study. *Paraplegia* 33(8):469-71, 1995.
- 3- Pearse DD, Sanchez AR, Pereira FC, et al. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia* 55: 976-1000, 2007.
- 4- Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, et al. Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 88: 84-88, 2007.
- 5- Stavric B. Role of chemopreventers in human diet. *Clin. Biochem* 27(5):319-332, 1994.
- 6- Nones J, Spohr TC, Gomes FC. Hesperidin, a flavone glycoside, as mediator of neuronal survival. *Neurochem Res* 36: 1776–1784, 2011.
- 7- Xarchas K, Bourandas J. Injuries and disease of the Spine in ancient times. *Spine* 28(13):1481-1484, 2003.
- 8- Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 44: 1027-1040, 1999.
- 9- Stokes BT, Reier PJ. Fetal grafts alter chronic behavioral outcome after contusion damager to the adult rat spinal cor. *Soc Neurosci Abstr* 16(1):37, 1990.
- 10- İplikçioğlu C. Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Omurilik Omurga Cerrahisi, Ed: Zileli M, Özer AF, (2.Baskı),ss 459-465 Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2002.

- 11- Naderi S, Zileli M, Özer A.F. Omurga Cerrahisinin Tarihçesi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed: Zileli M, Özer A.F, (2.baskı), ss1-13. cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002.
- 12.-Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, 27: 1504-1510, 2002.
- 13- Tator CH: Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 75: 15-26, 1991.
- 14-UsAK.VertebraKırıkları:Erişim:<http://www.medicine.ankara.edu.tr/surgicalmedical/orthopaedics/turkish/kadro/kus/kuvertkirik.htm> 19.04.2003.Erişim tarihi:20.06.2003.
- 15- Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie*, 37: 291-302, 1991.
- 16- Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J. Acute spinal cord injury, Part I Pathophysiologic Mechanisms. *Clin. Neuropharmacology*, 24 (5): 254-264, 2001.
- 17- Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J Emerg Med*. 11: 13-22,1993.
- 18- Bligt AR, Young W: Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by schwan cells. *J Neurol Sci*. 91: 15-34, 1989.
- 19- Tator CH ed: Wilkins RH, Rengachary SS, *Neurosurgery*. McGraw-Hill, 2 nd edition, ss2847-2859, 1996.
- 20- Kiss ZHT, Tator CH. Neurogenic shock. Ed: Geller ER, *Shock and Resuscitation* New York: McGraw-Hill; ss 421-440,1993.
- 21- Zileli M, Özer AF, (2.Baskı) s: 459-465. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 2002.
- 22- Zileli M, Özer A.F. Omurga Cerrahisinin Tarihçesi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed: Zileli M, Özer A.F, (2.baskı, cilt 1) ss 1-13. Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002.

- 23- Geisler FH. Neuroprotection and regeneration of the spinal cord, eds: Menezes AH, Sonntag VKH, Principles of spinal surgery, ss 769-784. New York, McGraw-Hill, 1996.
- 24- Koyonagi I, Tator CH, Lea PJ. Silicone rubber microangiography of acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 32: 260-268, 1993.
- 25- 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* 18: 433-439, 1986.
- 26- Dohrmann GJ, Wagner FC, Bucy PC. The microvasculature in transitory traumatic paraplegia: An electron microscopic study in the monkey. *J Neurosurg* 35: 263-271, 1971.
- 27- Kruk Z, Pycock C. Neurotransmitters and drugs. London, Chapman and Hall 1991.
- 28- Cooper J, Bloom Froth R. The biochemical Basis of Neuropharmacology, 7th edition. New York, Oxford University press, 1996.
- 29- Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology Of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23: 623-626, 1988.
- 30- Meldrum B. Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory Amino acids neurotransmitters. *Clin Sci.* 68: 113-122, 1985.
- 31- Mills CD, Xu GY, McAdoo J, Hulsebosch CE. Involvement of metabotropic glutamate receptors in excitatory amino acid and GABA release following spinal cord injury in rat. *J Neurochem* 79: 835-848, 2001.
- 32- Mills CD, Fullwood SD, Hulsebosch CE. Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 170:244-257, 2001.
- 33- Fields RD, Yu C, Nelson PG. Calcium network activity, and the role of NMDA channels in synaptic plasticity in vitro. *J Neurosci* 11: 134-146, 1991.

- 34- Choi DW. Ion dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 17: 369-379, 1999.
- 35- Greenmayre JT, Porter RHP. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology* 44 (8):7-13, 1994.
- 36- Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* 17(3):1055-1063, 1997.
- 37- Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ. Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacology* 24(5): 265-279, 2001.
- 38- Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian R. Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Current Opinion in Neurology* 15: 713-720, 2002.
- 39- Marion DW. Head and spinal cord injury. *Neurol. Clin.* 16(2):485-502, 1998.
- 40- Yang XC, Reis DJ. Agmatine selectively blocks the NMDA subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. *JPET* 288:544-549, 1999.
- 41- Li GL, Farooque M, Holtz A, et al. Apoptosis of oligodendrocytes occurs for long distances away from the primary injury after compression trauma for at spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.
- 42- Diana A, setzu M, Sirigu S, Diaz G. Nuclear patterns of apoptotic and developing neurons of superior cervical ganglion of newborn rat. *Int J Dev Neurosci.* 11: 773-780, 1993.
- 43- Faden AI, Chan PH, Longar S. Alterations in lipid metabolism. *J Neurochem.* 48: 1809-1816, 1987.
- 44- Boucher BA, Phelps SJ. Acute management of the head injury patients. In; DiPiro JT, Talbert RL, Yee GC. *Pharmacotherapy.* Stamford: Appleton-Lange 1229-1242, 1997.

- 45- Zileli M. Omurilik yaralanmasının farmakolojik tedavisi. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Ed: Zileli M, Özer AF, (2. Baskı) ss 833-840. Saray Medikal yayıncılık, İzmir, 2002.
- 46- Kaur, C. and Kapoor, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables-the millennium's health. Int. J. Food Sci. Tech. 36; 703-725, 2001.
- 47- Diplock, A. Healty lifestyles nutrition and physical activity: Antioxidant nutrients. ILSI Europe concise monograph series, s 59 Belgium, 1998.
- 48- Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK. Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidant in acute brain and spinal cord injury. J Neuro Trauma 9: 165, 1992.
- 49- Demopoulos H, Flamm E, Pietronigro D. The Free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. Acta Physiol Scand 492: 91, 1980.
- 50- Cheeseman KH, Salter TF. An introduction to free radical biochemistry. Brit. Med Bul. 49: 481-493, 1993.
- 51- Del Maestro FR. An aproch to free radicals in medicine. Acta Physiol Scand 492: 153-168, 1980.
- 52- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 41(12):1819-1828, 1975.
- 53- Barut Ş, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, Cokneşeli B, Kaya U. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. Neurosurgery Rev. 16: 53-59, 1993.
- 54- Uzan M. Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatoloji, In Hancı M; Medulla spinalis yaralanmaları ss 152-161, 2000.
- 55- Ancioğlu, A. Serbest oksijen radikalleri ve hücre hasarı. Doktor. 2/3 Mayıs: 238-242, 1994.

- 56- Comporti, M. Lipid peroxidation. Biopathological significance. *Molec. Aspect. Med.* 14: 199-207, 1993.
- 57- Wills. E.O. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. In: *Biochemical Toxicology*. Edited by. Snell. K. and Mullock.B. IRL Press Limited. Oxford England. 127- 152, 1987.
- 58- Liau LM, Bergsneider M, Becker DP. ed: Youmans JR, *Neurological Surgery*. W.B. Saunders Co.4 th ed 1997.
- 59- Sakamoto A, Ohnishi ST, Ohnishi T et al. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res* 554:186-192, 1991.
- 60- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals and Disease. *Biochem. J.* 219:1-14, 1984.
- 61- Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain res* 547-:344-348, 1991.
- 62- Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *LAB Invest* 47: 412-426, 1982.
- 63- Shuman SL, Bresnahan JC, Battie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after experimental spinal cord contusion in rats. *J NeurosciRes* 50: 798-808, 1997.
- 64- Li M, Ona VO, Chen M et al. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase 1 and 3 in a Mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000.
65. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M. Nitric oxide via macrophage iNOS induces apoptosis following traumatic spinal cord injury. *Brain Res Mol.* 85: 114-122, 2000.

- 66- Tachibana T, Noguchi K, Ruda MA. Analysis of gene expression following spinalcord injury in rat using complementary DNA microarray. *Neuroscience Letters*, 327: 133-137, 2002.
- 67- Hwan AH, Yeop BY, Gwang L, et al. Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords: Inflammation, apoptosis and cell survival. *BBRC*, 384: 560-570, 2006.
- 68- Allen AR. Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. *JAMA*;57: 878-880.
- 69- Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Acute up-regulation of brain-derived neurotrophicfactor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. *ActaNeuropathol*, 102: 239-245, 2001.
- 70- Cuzzocrea S, Genovese T, Mazzon E, et al. Poly (ADP-Ribose) glycohydrolase activitymediates post-traumatic inflammatory reaction after experimental spinal cord injury. *JPED*, 319: 127-138, 2006.
- 71- Fiskum G. Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural death. *J Neurotrauma* 17: 843-855, 2001.
- 72- Sullivan PG, Thompson MB, Scheff SW. Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 160:226-234, 1999.
- 73- Diaz –Ruiz A, Ibarra A, Perez-Severiano F, Guizar-Sahagun G, Grijalva I,Rios C. Constitutive end inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats. *Neuroscience Letters* 319:129-132, 2002.
- 74- Liu C, Jin A, Zhou C, Chen B. Gene expression of inducible nitric oxidesynthase in injured spinal cord. *Chin. Med. J.* 115(5):740-742, 2002.
- 75- Blantz RC, Satriano J, Gabbai F, Kelly C. Biological effects of arginine metabolites. *Acta Physiol Scan* 168: 21-25, 2000.

- 76- Chabrier PE, Pallardy CD, Auget M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *CMLS* 55: 1029-1035, 1999.
- 77- Wu W, Liuzzi FJ, Schinco FP, Depto AS, Li Y, Mong JA. Neuronal nitric oxide synthase is induced in spinal neurons by traumatic injury. *Neuroscience* 61(4):719-726, 1994.
- 78- Arnolda LF, Mckitrick DJ, Llewellyn-Smith IJ, Minson JB. Nitric oxide limits pressor responses to sympathetic activation in rat spinal cord. *Hypertension* 36: 1089-1092, 2001.
- 79- Wada K, Chatzipanteli K, Kraydieh S, Busto R, Dietrich WD. Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43(6):1427-1436, 1998.
- 80- Schwab ME, Bartholdi D. Degenerative and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319-370, 1996.
- 81- Oz B. Medulla spinalis yaralanmalarında patoloji. In Hancı M, Medulla spinalis yaralanmaları ss 137-142, 2000.
- 82- Kakulas BA, Taylor JR. Pathology of injuries of vertebral column and spinal cord. Frankel HL, ed. *Handbook of clinical neurology* Vol.61 Els Sci Pub. ss 21-51, 1992.
- 83- Kakulas BA. Pathology of spinal injuries. *Cent Nerv Syst Trauma* 1(2):117-129, 1984.
- 84- Ducker TB, Kindt GW, Kepme LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* 35: 700-708, 1971.
- 85- West N, Collins GH. Cellular changes during repair of a cryogenic spinal cord injury in rat. *J Neuropathol* 48: 94-108, 1989.
- 86- Fried L, Goodkin R. Microangiographic observations of the experimentally traumatized spinal cord. *J.Nerosurg.* 35: 709-714, 1971.

- 87- Anderson T. Spinal cord contusion injury: experimental dissociation of hemorrhagic necrosis and subacute loss of axonal conduction. *J.Neurosurg.* 62: 115-119, 1985.
- 88- O'Brien M, Felmly WT, Hafer TR. Thoracic and lumbar fractures: Diagnosis and management. *The text book of spinal surgery. Volume II*, Lipincott, Philadelphia ss 871-873, 1991.
- 89- Vaccaro AR, Klein GR. Cervical spinal trauma: Upper and lower. *Principles and practice of spine surgery*, Mosby, Philadelphia, Pennsylvania, ss 441-478, 2003.
- 90- Torun F, Attar A. Omurilik yaralanması ve değerlendirilmesi, Ed: Aksoy K, *Temel Nöroşirürji*, s 1144-1162. Türk Nöroşirürji Derneği yayınları, Ankara, 2005.
- 91- Wagner FC Jr. Injuries to the cervical spine and spinal cord, *Youmans neurological surgery*, Volume 4, W.B Saunders Co. Philadelphia ss 2378-2391, 1990.
- 92- Pang D. Spinal cord injury without radiographic abnormality in children, 2 decades later. *Neurosurgery* 55(6): 1325-42, 2004.
- 93- Fehlings MG, Sanjay R, Tator CH, et al. The optimal radiologic method for assessing spinal canal compromise and cord compression in patients with cervical spinal cord injury: Part II: Results of a multicenter study, 1998.
- 94- Zileli M. Omurilik yaralanmasında epidemiyoloji ve prognoz, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, Ed: Zileli M, Özer AF, (2.baskı) ss 885-892. Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002.
- 95- Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of hematoporphyrin. *Biochim. Biophys. Acta.* 799:313-317, 1984.
- 96- Stavric B. Quercetin in our diet: from potent mutagen to probable anticarcinogen. *Clin. Biochem* 27(4): 245-248 1994.

- 97- Formica JV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Fd. Chem. Toxic.* 33 (12):1061-1080, 1995.
- 98- Fluckiger FA, Hanbury D. In *pharmacographic-A history of the Principle Drugs of vegetable oirigin*, ss 104-105. International book distrubutory. Delhi, India, 1986.
- 99- Suarez J, Herrera M.D, Marhuenda E. Invitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine* 5(6), 469-473, 1998.
- 100- Ameer B. Weintraub R.A, Johnson J.V, Yost R.A, Rouseff R.L. Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin. Pharma- col. Ther.* 60, 34-40, 1996.
- 101- Gaur V, Kumar A. Hesperidin pre-treatment attenuates NO-mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacol Rep* 62(4):635-648, 2010.
- 102- Amado NG, Cerqueira DM, Menezes FS. Isoquercitrin isolated from *Hyptis fasciculata* reduces glioblastoma cell proliferation and changes beta-catenin cellular localization. *Anticancer Drugs* 20: 543-552, 2009.
- 103- Youdim KA, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, Rice-Evans C. Interaction between flavonoids and the blood- brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* 85: 180-192, 2003.
- 104-Marion DW. Head and spinal cord injury. *Neurol. Clin.* 16(2):485-502, 1998.
- 105- Ducker TB, Zeidman SM. Spinal cord injury. Role of steroid therapy. *Spine* 19: 2281-2287, 1994.
- 106- Tuma RF, Vasthare US, Arforks KE, Young WF. Hypertonic saline administration attenuates spinal cord injury. *J Trauma* 42: 54-60, 1997.

- 107- Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury. 1 year follow up. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS III). J Neurosurg 89: 699-706, 1998.
- 108- Greene K. Pharmacological management of spinal cord injury: Current status of drugs designed to augment functional recovery of the injured human spinal cord. J Spinal Dis 5: 355-366, 1995.
- 109- Kaptanoğlu E, Tator CH. Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejileri. eds: Zileli M, Özer F, Omurilik ve omurga cerrahisi, (2. baskı) ss 813-832. META Basım ve Matbaacılık Hizmetleri, izmir, 2002.
- 110- Young W. Spinal cord injury pathophysiology and therapy. eds: Narayanf RK, Wilberger JE, Povlishock JT, Neurotrauma. ss 1079-1082. New York: McGraw-Hill; 1996.
- 111- Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. NeuroRx. 1(1):80-100, 2004.
- 112- Rhoney DH, Luer MS, Hughes M. New pharmological approaches to acute spinal cord injury. Pharmacotherapy 16: 382-392, 1996.
- 113- Hall ED. effects of the 21-aminosteroid U-74006F on posttraumatic spinal cord ischemia in cats. J Neurosurg 6: 176-179, 1988.
- 114- Faden AI, Jacobs TP. Effect of TRH analogs on neurologic recovery after experimental spinal trauma Neurology 35: 1331-1335, 1985.
- 115- Faden AL, Jacobs TP, Holaday JW. Opiate antagonist improves neurologic recovery after spinal injury. Science 211:493-494, 1981.
- 116- Puniak MA, Freeman GM, Agresta CA, et al. Comparison of a serotonin antagonist, opioid antagonist, and TRH analog for the acute treatment of experimental spinal trauma. J Neurotrauma 8: 193-203, 1996.

- 117- Faden AI, Jacobs TP, Holaday J. Comparison of Early and Late Naloxone Treatment in Experimental Spinal Injury. *Neurology* 32: 677-681, 1982.
- 118- Flamm E, Young W, Demopoulos H. Experimental Spinal Cord Injury Treatment With Naloxone. *Neurosurgery* 10: 227-231, 1982.
- 119- İldan F, Polat S, Öner A, İsbir T, et al. Effects of Naloxone on Sodium and Potassium Activated and Magnesium Dependent Adenosine-5- Triphosphatase Activity and Lipid Peroxidation and Early Ultrastructural Findings After Experimental Spinal Cord Injury. *Neurosurgery* 36: 797-805, 1995.
- 120- Faden AI, Takemore AE, Portogese TS. Alpha selective opiate antagonists norbinaltorphimine improves outcome after spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 64: 951-961, 1986.
- 121- Imanaka T, Hukuda S, Maeda T. The role of GM-1 ganglioside in the injured spinal cord of rats. *J Neurotrauma* 13: 163-170, 1996.
- 122- Luo J, Robinson JP, Shi R. The increase of reactive oxygene species and their inhibition in an isolated guinea pig spinal cord compression model. *Spinal cord* 40: 656- 665, 2002.
- 123- Fu ES, Tummala RP. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Current opinion in anaesthesiology* 18: 181-187, 2005.
- 124- Fujimoto T, Nakamura T, İkedada T, et al. Effects of EPC-K On lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Spine* 25(1): 24-29, 2000.
- 125- Hall ED, Braugler JM. Role of lipid peroxidation in posttraumatic spinal cord degeneration. *CNS Trauma* 3: 281-293, 1987.
- 126- Weir B, Calcium antagonists, cerebral ischemia and vasospasm. *Can J Neu.* 11: 239-246, 1984.

- 127- Kaptanoğlu E, Beşkonaklı E, Solaroğlu İ, et al. Magnesium sulfate treatment in spinal cord injury: emphasis on vascular changes and early clinical results. *Neurosurg. Rev* 26: 283-287, 2003.
- 128- Suzer T, Coskun E, Islekel H et al. Neuroprotective effects of magnesium on lipid peroxidation and axonal function after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 37: 480-484, 1994.
- 129- Teng YD, Wrathall JR. Local blockade of sodium channels by tetrodotoxin ameliorates tissue loss and long term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. *J Neurosci* 17: 4359-4366, 1997.
- 130- Schwartz G, Fehlings MG. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with Riluzole. *J Neurosurg* 94: 245-56, 2001.
- 131- Katzung BG. *Basis and clinical pharmacology*. Stamford: Appleton-Lange ss 304-317, 1998.
- 132- Hayes KC, Potter PJ, Wolfe DL, et al. 4-Aminopyridinesensitive neurologic deficits in patients with spinal cord injury. *J Neurotrauma* 11: 433-446, 1994.
- 133- Arnold PM, Citrom BA, Ameenuddin S et al. Caspase-3 inhibition is neuroprotective after spinal cord injury *J Neurochem* 74: 811-829, 2000.
- 134- Kaptanoğlu E, Tuncel M, Palaoğlu S, et al. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 1)* 93: 77-84, 2000.
- 135- Yu CG, Jimenez O, Marcillo AE, et al. Beneficial effects of modest systemic hypothermia on locomotor function and histopathological damage following contusion-induced spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine 1)* 93: 85-93, 2000.
- 136- Huang Lixin, Mehta MP, Nanda A, et al. The role of multiple hyperbaric oxygenation in expanding therapeutic windows after acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine 2)* 99: 198-205, 2003.

- 137- Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, et al. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport* 15(15):2369-2373, 2004.
- 138- Lowry oh, rosebrough nj, farr al and randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
139. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute spinal cord injury model in rat. *Surg. Neurol.* 10: 39-43, 1978.
- 140- Hall ED, Wolf DL, M.S. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 64: 951-961, 1986.
- 141- Carlson GD, Gorden C. Current developments in spinal cord injury research. *Spine J* 2: 116-28.141, 2002.
- 142- Olsson Y, Sharma HS, Nyberg F, et al. The opioid receptor antagonist naloxone influences the pathophysiology of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 104:381–99, 1995.
- 143- Faden AI. Neuropeptides and central nervous system injury. *Arch Neurol* 43: 501-4, 1986.
- 144- McIntosh TK, Hayes RL, Dewitt DS, et al. Endogenous opioids may mediate secondary damage after experimental brain injury. *Am J Physiol* 253:E565–74, 1987.
- 145- Zhao T, Qi Y, Li Y, Xu K. PI3 Kinase regulation of neural regeneration and muscle hypertrophy after spinal cord injury. *Mol Biol Rep* 39(4):3541–3547, 2012.
- 146- Dasari VR, Spomar DG, Li L, Gujrati M, Rao JS, Dinh DH. Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *Neurochem Res* 33(1):134–149, 2008.
- 147- Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M, He Z. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322(5903):963–966, 2008.

- 148- Dominguez E, Mauborgne A, Mallet J, Desclaux M, Pohl M. SOCS3-mediated blockade of JAK/STAT3 signaling pathway reveals its major contribution to spinal cord neuroinflammation and mechanical allodynia after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 30(16):5754–5766, 2010.
- 149- Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17(3):203–218, 2000.
- 150- Yao GL, Kato H, Khalil M, Kiryu S, Kiyama H. Selective upregulation of cytokine receptor subchain and their intracellular signalling molecules after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 9(5):1047–1054, 1997.
- 151- Braughler JM, Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 9: 1-7, 1992.
- 152- Feredioon S, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic Antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 32(1):67-103, 1992.
- 153- Shagirtha K, Pari L. Hesperetin, a citrus flavonone, protects potentially cadmium induced oxidative testicular dysfunction in rats. *Ecotoxicol Environ Saf* 74(7):2105–2111, Epub 2011Jun 29.
- 154- Hwang SL, Shih PH, Yen GC. Neuroprotective effects of citrus flavonoids. *J Agric Food Chem* 60(4):877–885, Epub 2012 Jan 23.
- 155- Öztanır MN, Ciftci O, Cetin A, Aladağ MA. Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurol Sci* 2014 mar 28.
- 156- Kamisli S, Ciftci O, Kaya K, Cetin A, Kamisli O and Ozcan C. Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin-induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats *Toxicol Ind Health* published online 3 April 2013.

- 157- Kara S, Gencer B, Karaca T, Tufan HA, Arikan S, Ersan I, Karaboğa I , Hanci V. 3Protective Effect of Hesperetin and Naringenin against Apoptosis in Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Injury in Rats□e Scientific World Journal Volume , Article ID 797824, 8 pages, 2014.
- 158- Acar A, Akil E, Alp H, Evliyaoglu O, Kibrisli E, Inal A, et al. Oxidative damage is ameliorated by curcumin treatment in brain and sciatic nerve of diabetic rats. *International Journal of Neuroscience* 122(7): 367–372, 2012.
- 159- Paterniti I, Melani A, Cipriani S, Corti F, Mello T, Mazzon E, Esposito E, Bramanti P, Cuzzocrea S, Pedata F. Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. *J Neuroinflammation* 8: 31, 2011.
- 160- Paterniti I, Esposito E, Mazzon E, Bramanti P, Cuzzocrea S. Evidence for the role of PI(3) -kinase-AKT-eNOS signalling pathway in secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. *Eur J Neurosci* 33(8):1411–1420, 2011.
- 161- Li Q, Michaud M, Canosa S, Kuo A, Madri JA. GSK-3β: a signaling pathway node modulating neural stem cell and endothelial cell interactions. *Angiogenesis* 14(2):173-185, 2011.
- 162- Yamauchi K, Osuka K, Takayasu M, Usuda N, Nakazawa A, Nakahara N, Yoshida M, Aoshima C, Hara M, Yoshida J. Activation of JAK/STAT signalling in neurons following spinal cord injury in mice. *J Neurochem* 96(4):1060–1070, 2006.
- 163- Rong Z, Pan R, XU Y, Zhang C. Hesperidin pretreatment protects hypoxia-ischemic brain injury in neonatal rat *Neuroscience* 2013 Dec 26;255:292-9. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.09.030. Epub 2013 Sep 25.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Onayı



T.C.
BÜLENT ECEVİT ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu



TOPLANTI TARİHİ : 08.05.2013
TOPLANTI NO : 2013/04

3- B.E.Ü. Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 2013-09-08/05 Protokol no'lu "Ratlarda Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Hesperidin'in Nöroprotektif Etkisi" konulu çalışmasının Etik Kurul ilkelerine uygun olduğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR

Prof. Dr. Emine YILMAZ SİPAHİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkan Vekili