

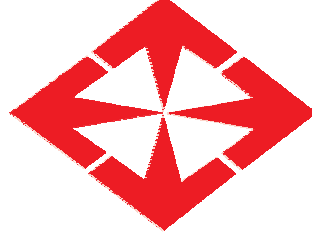
**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TRAVMATİK OMURİLİK YARALANMASI
MODELİNDE MİNOSİKLİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkin SÖNMEZ

Ankara, 2010



**T.C.
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL TRAVMATİK OMURİLİK YARALANMASI
MODELİNDE MİNOSİKLİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Erkin SÖNMEZ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr Cem YILMAZ

Ankara, 2010

12.02.2009 tarih ve DA 09/03 sayı

Bu tez çalışması Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Sağladığı üstün imkanlarla, nitelikli bir uzmanlık eğitimi almama olanak tanıyan üniversitemizin kurucusu ve rektörümüz Sayın Prof. Dr. Mehmet Haberal'a ve dekanımız Sayın Prof. Dr. Haldun Müderrisoğlu'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tıp fakültesindeki öğrencilik döneminden beri birlikte çalışmak için can attığım, hayata bakışımı değiştiren, bana el verip önce insan sonra hekim olmayı öğreten, yanlarında çalışmaktan gurur duyduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Nur Altınörs'e ve Sayın Prof. Dr. Hakan Caner'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman, her konuda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan değerli ağabeylerim Yrd. Doç. Dr. Cem Yılmaz'a ve Yrd. Doç. Dr. Salih Gülşen'e çok teşekkür ederim. Sahip olduğum mesleki bilgi ve becerilerde çok emeği olan Yrd. Doç. Dr. Tarkan Çalışaneller'e, Yrd. Doç. Dr. Özgür Özdemir'e, Yrd. Doç. Dr. Melih Çekinmez'e, Yrd. Doç. Dr. Kadir Tufan'a, Yrd. Doç. Dr. Serdar Kabataş'a, Uzman Dr. Feyzi Birol Sarıca'ya ve Uzm. Dr. Tufan Cansever'e çok teşekkür ederim.

Kısa bir süre beraber çalışma şansı yakaladığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu'na, Doç. Dr. Bülent Erdoğan'a, Doç. Dr. Orhan Şen'e ve Doç. Dr. Başar Atalay'a eğitimime olan katkılarından dolayı çok teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında her aşamada emeği geçen değerli ağabeylerim Yrd. Doç. Dr. Cem Yılmaz, Yrd. Doç. Dr. Serdar Kabataş ve Uzm. Dr. Tufan Cansever başta olmak üzere Yrd. Doç. Dr. Kadir Tufan'a, Doç. Dr. Gülten Karabay'a, Prof. Dr. Suna Türkoğlu'na, Doç. Dr. Ersin Ögüş'e, Doç. Dr. Özlem Özen'e ve Tekn. Sezai Kölcük başta olmak üzere deney hayvanları araştırma merkezi'nde görevli tüm ekibe yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıştığım, sevinç ve sıkıntılarımı paylaşan çalışma arkadaşlarım Dr. Fatih Aydemir ve Dr. İlker Çöven başta olmak üzere, Uzm. Dr. Aşkın Hastürk'e, Uzm. Dr. Özkan Özger'e, Uzm. Dr. Cemal Gökce'ye, Uzm. Dr. Eralp Çetinalp'e, Dr. Aydın Gerilmez'e, Dr. Berkay Köksoy'a, Dr. Aykan Akar'a, Dr. Serhat Cömert'e ve Dr. Fikret Şahintürk'e teşekkür ederim.

Hayatta bugün bulunduğum yere gelmemde büyük emeği olan, maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme ve bu zorlu yaşam koşullarında sürekli yanımda olan, elimi hiç bırakmayan biricik eşim Başak'a sonsuz teşekkürler.

Dr. Erkin SÖNMEZ

ÖZET

Travmatik omurilik yaralanması (TOY), yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli bir sağlık sorunudur. Travma sonrası ortaya çıkan fonksiyon kaybı, hem birincil yaralanmaya hem de birincil yaralanmanın tetiklediği ikincil yaralanma mekanizmalarına bağlıdır. Biz de çalışmamızda, minosiklin tedavisinin deneysel ikincil omurilik yaralanmasındaki nöroprotektif etkinliğini inceledik.

Çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Etik Kurulu'nun izniyle Başkent Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Toplam 80 adet Sprague-Dawley sıçan 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu dışındaki deneklere, modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemiyle torakal 9-10 standart omurilik yaralanması uygulandı. Travma grubunda omurilik yaralanması oluşturuldu fakat herhangi bir tedavi verilmedi. Tedavi gruplarına intravenöz ve intraperitoneal olmak üzere iki çeşit minosiklin tedavisi verildi. Minosiklin tedavisinin lipid peroksidasyonu (MDA, GSH), apoptoz (TUNEL), ultrastrüktürel yapı (EM, IM) ve fonksiyonel değerlendirme (BBB, Eğik düzlem) üzerine olan etkisinin erken ve geç dönem sonuçları araştırıldı.

Çalışmamızda minosiklin tedavisinin, lipid peroksidasyonunu azaltarak hasarlanmış omuriliği oksidatif stresten koruduğu, geç dönemde daha belirgin olmak üzere hem erken hem geç dönemde apoptozu azalttığı, omurilik ultrastrüktürel yapısını erken dönemde belirgin derecede koruduğu tespit edildi. Yapılan davranış analizinde, tedavi alan grupta arka ayak fonksiyonlarında belirgin bir düzelme saptandı. İntravenöz ve intraperitoneal tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Bu çalışma sonucunda minosiklin tedavisinin, ikincil yaralanma mekanizmalarının birçoğu üzerinde nöroprotektif etkinlik göstererek fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğunu tespit edildi.

Deneysel modellerde minosiklinin nöroprotektif etkinliği ile elde edilen tatminkar sonuçlar, travmatik omurilik yaralanmasının klinik tedavisi için gelecek vaat etmektedir.

Anahtar kelimeler: apoptoz, davranış analizi, lipid peroksidasyonu, minosiklin, nöroproteksiyon, travmatik omurilik yaralanması,

ABSTRACT

Evaluation of Minocycline's Neuroprotective Effects In Experimental Spinal Cord Injury

Traumatic spinal cord injury (SCI) is a devastating problem of health that results in high morbidity and mortality rates. The loss of function after SCI results from both the primary mechanical insult and the subsequent, multifaceted secondary response. We therefore evaluated the neuroprotective effects of minocycline on the secondary injury process of an experimental traumatic spinal cord injury model.

All experiments were conducted in the animal laboratory of Baskent University by the approval of Baskent University Animal Care Ethics Committee. A total of 80 adult male Sprague Dawley rats were randomly divided to four groups. A thoracal 9-10 contusion injury was produced by using modified Allen technique in all groups except control group. No medication was administered to the rats in the trauma group. Minocycline was administered intraperitoneally and intravenously to the treatment groups. Short term and long term neuroprotective effects of minocycline on the lipid peroxidation (MDA, GSH), apoptosis (TUNEL), ultrastructure of spinal cord (EM, LM) and behavioral assessments (BBB, Inclined plane) were evaluated.

Our study demonstrated that minocycline significantly diminishes lipid peroxidation, reduce apoptosis and preserves the ultrastructure of spinal cord tissue in the early posttraumatic period. Behavioral assessments showed significant improvement on the hind limb functions of minocycline receiving rats. Any statistically significant difference was not found between intraperitoneal or intravenous routes for minocycline injection. We report that minocycline is neuroprotective and contributes to functional improvement after traumatic SCI by eliminating the destructive process of secondary injury.

The encouraging results of minocycline in experimental models bode well for its therapeutic use in the injuries of human spinal cord.

Key Words: apoptosis, behavioral assesment, lipid peroxidation, minocycline, neuroprotection, traumatic spinal cord injury

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
TABLOLAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. EPİDEMİYOLOJİ	4
2.3. TRAVMATİK OMURİLİK YARALANMASININ PATOFİZYOLOJİSİ	5
2.3.1 Birincil Yaralanma	5
2.3.2 İkincil Yaralanma	5
2.3.2.1 Vasküler Mekanizmalar ve Endotel Hasarı	7
2.3.2.2 Biyokimyasal Değişiklikler	8
2.3.2.3 Elektrolit Kaymaları	15
2.3.2.4 İnflamatuar Cevap	18
2.3.2.5 Apoptoz	18
2.4. TRAVMATİK OMURİLİK YARALANMASININ HİSTOPATOLOJİSİ	20
2.4.1 Akut Faz	20
2.4.1.1 Erken Akut Faz	20
2.4.1.2 Subakut Faz	21
2.4.2 Orta Faz	21
2.4.3 Geç Faz	21
2.5. İKİNCİL OMURİLİK YARALANMASINA YÖNELİK TEDAVİ GİRİŞİMLERİ	21
2.5.1 Kortikosteroidler	22
2.5.2 Gangliozid GM-1	23
2.5.3 TRH	23
2.5.4 Gasiklidin	23
2.5.5 Nimodipin	24
2.5.6 Diğer	24
2.6 MİNOSİKLİN	26

3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1 Denek Grupları.....	30
3.2 Minosiklin hidrokloridin Hazırlanışı.....	31
3.3 Anestezi	31
3.4 Cerrahi İşlem.....	32
3.5 Travmatik Omurilik Yaralanmasının Oluşturulması.....	32
3.6 Kuyruk Ven Kanülasyonu ve İlaç Uygulaması.....	32
3.7 Biyokimyasal İnceleme Yöntemleri.....	36
3.7.1 Doku Malondialdehit (MDA) Analizi	36
3.7.2 Doku Glutasyon (GSH) Analizi.....	36
3.8 Histopatolojik İnceleme Yöntemleri	37
3.8.1 Elektron Mikroskopisi.....	37
3.8.2 Histopatoloji ve TUNEL Boyama	39
3.8.2.1 TUNEL Boyama ve Apoptoz Değerlendirilmesi.....	39
3.9 Davranış Analizi	40
3.9.1 BBB Lokomotor Değerlendirme Ölçeği.....	40
3.9.2 Eğik Düzlem Değerlendirmesi	40
3.10 İstatistiksel Değerlendirme.....	43
4 BULGULAR	44
4.1 Biyokimyasal İnceleme Sonuçları.....	44
4.1.1 Doku MDA Düzeyleri.....	44
4.1.2 Doku GSH Düzeyleri	44
4.2 Histopatolojik İnceleme Sonuçları	46
4.2.1 Elektron Mikroskopisi İnceleme Sonuçları	46
4.2.2 Işık Mikroskopisi İnceleme Sonuçları.....	53
4.2.3 TUNEL Boyama ve Apoptoz Değerlendirme Sonuçları.....	54
4.3 Davranış Analizi Sonuçları	57
4.3.1 BBB Fonksiyonel Değerlendirme Sonuçları	57
4.3.2 Eğik Düzlem Değerlendirme Sonuçları	57
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	68
7. KAYNAKLAR.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AIF	: Apoptoz inhibe edici faktör
ALS	: Amyotrofik lateral skleroz
AMPA	: Alfa-Amino-3-Hidroksil-5-Metil-4-Isoksazolpropionat
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
Ca ⁺⁺	: Kalsiyum
Cl ⁻	: Klor
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EAA	: Eksitator aminoasit
EM	: Elektron mikroskopisi
GER	: Granüllü endoplazmik retikulum
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni stimule edici faktör
GPX	: Glutasyon peroksidaz
GSH	: Glutasyon
GSR	: Glutasyon redüktaz
H&E	: Hematoksilen-eozin
HO ₂ ⁻	: Hidrojen peroksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
IL-1 β	: İnterlökin 1 beta
IL-6	: İnterlökin 6
IM	: Işık mikroskopisi
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksid sentetaz
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
K ⁺	: Potasyum
kDa	: kDalton

L	: Laminektomi
LT	: Laminektomi+travma
MDA	: Malondialdenit
Mg ⁺⁺	: Magnezyum
Mino	: Minosiklin
ml	: mililitre
mmHg	: Milimetre Civa
MMP	: Matriks metalloproteazları
M.Ö	: Milattan Önce
MPSS	: Metilprednizolon sodyum süksinat
MS	: Multiple skleroz
M.S	: Milattan sonra
MSS	: Merkezi sinir sistemi
Na ⁺	: Sodyum
NASCIS	: North American Spinal Cord Injury Study
NMDA	: N-metil-D-aspartat
OH ⁻	: Hidroksil radikali
O ₂ ⁻	: Süperoksit anyon radikali
PGI ₂	: Prostosiklin
P38 MAPK	: p38 mitogen activated protein kinase
RK	: Randomize, kontrollü
ROO ⁻	: Peroksil radikali
SF	: Serum fizyolojik (%0,9 sodyum klorür)
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TCA	: Triklor asetik asit
TM	: Trilizad mesilad
TNF- α	: Tumor necrosis factor alfa
TOY	: Travmatik omurilik yaralanması
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormon
TxA ₂	: Tromboksan A ₂
TUNEL	: Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) bağımlı nick-end labeling
X	: Büyütme

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Travmatik omurilik yaralanmalarında birincil yaralanma mekanizmaları	5
Tablo 2.2. Travmatik omurilik yaralanmalarında ikincil yaralanma mekanizmaları	6
Tablo 2.3. Hücre yapıtaşları için toksik oksijen radikalleri.....	9
Tablo 2.4. Hücre içi ve hücre dışı antioksidan sistemler.....	10
Tablo 2.5. Tamamlanmış prospektif, randomize, kontrollü, omurilik yaralanması klinik çalışmaları.....	25
Tablo 3.1. Denek grupları	31
Tablo 3.2. Deneysel omurilik yaralanmasında ultrastrüktürel yapı skorlama sistemi.....	38
Tablo 3.3. Basso-Beattie-Bresnahan lokomotor değerlendirme ölçeği ve tanımları.....	41
Tablo 4.1. Doku MDA analiz sonuçları	44
Tablo 4.2. Doku GSH analiz sonuçları	45
Tablo 4.3. Ultrastrüktürel skorlama	47
Tablo 4.4. Apoptotik indeks.....	55
Tablo 4.5. BBB değerleri	58
Tablo 4.6. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri	59
Tablo 4.7. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Eksitotoksisite ile serbest radikal oluşumu arasındaki ilişki	15
Şekil 2.2.	Minosiklinin kimyasal yapısı.....	26
Şekil 3.1.	Total laminektomi sonrası sağlam omurilik dokusunun görüntüsü	34
Şekil 3.2.	Allen ağırlık düşürme yöntemi ile omurilik travması oluşturulması.....	34
Şekil 3.3.	Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusunun görüntüsü.....	35
Şekil 3.4.	Dorsal kuyruk ven kanülasyonu.....	35
Şekil 4.1.	Doku MDA düzeyi.....	45
Şekil 4.2.	Doku GSH düzeyi	46
Şekil 4.3.	Ultrastrüktürel değerlendirme	47
Şekil 4.4.	EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)	48
Şekil 4.5.	EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)	48
Şekil 4.6.	EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)	49
Şekil 4.7.	EM incelemesi travma grubu (Grup II).....	49
Şekil 4.8.	EM incelemesi travma grubu (Grup II)	50
Şekil 4.9.	EM incelemesi travma grubu (Grup II).....	50
Şekil 4.10.	EM incelemesi mino-iv grubu (Grup III).....	51
Şekil 4.11.	EM incelemesi mino-iv grubu (Grup III).....	51
Şekil 4.12.	EM incelemesi mino-ip grubu (Grup IV)	52
Şekil 4.13.	EM incelemesi mino-ip grubu (Grup IV)	52
Şekil 4.14.	Kontrol grubu. (H&E X100).....	53
Şekil 4.15.	Travma grubu. (H&E X100)	54
Şekil 4.16.	Tedavi grubu. (H&E X100)	54
Şekil 4.17.	Düşük apoptotik indeks (TUNEL X100) –Kontrol grubu-	56
Şekil 4.18.	Yüksek apoptotik indeks (TUNEL X100) –Travma grubu-	56
Şekil 4.19.	Orta apoptotik indeks (TUNEL X100) –Tedavi grubu-.....	56
Şekil 4.20.	Apoptotik indeks.....	57
Şekil 4.21.	BBB skoru	60
Şekil 4.22.	Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri	60
Şekil 4.23.	Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri	61

1. GİRİŞ

Travmatik omurilik yaralanması (TOY) neden olduğu morbidite ve mortalite nedeniyle hastayı, yakınlarını ve toplumu kötü yönde etkileyen önemli bir sorundur. ABD’de her yıl yaklaşık 12.000 yeni olgu bildirilmektedir. 2008 yılında yapılan istatistiklerde, yaralanma seviyesi ve lezyonun genişliği esas belirleyici faktör olmakla birlikte TOY geçiren hastaların sadece %11,5’i bir yıl sonra iş hayatına geri dönebilmektedir. 25 yaşında tetraplejik kalan bir hastanın beklenen yaşam boyu maliyeti ise yaklaşık 1.800.000 Amerikan Doları olarak hesaplanmıştır (1) .

TOY’ dan sonra görülen hücre ve fonksiyon kaybı, travma anında ortaya çıkan ilk mekanik hasara ve bu hasarın tetiklediği birtakım yıkıcı olaylar zincirine bağlıdır (2). Travma anında ortaya çıkan ve nöral dokunun kompresyon, kontüzyon ve/veya lacerasyonu ile sonuçlanan bu duruma birincil yaralanma denir. İkincil yaralanma ise birincil yaralanmayı takiben dakikalar içinde başlayıp haftalarca devam eden bir süreçtir. Eksitotoksisite, lipid peroksidasyonu, inflamasyon ve apoptoz başlıca ikincil yaralanma mekanizmalarıdır (2-4).

Omurilik yaralanmalarında en etkin tedavi, çarpma etkisiyle başlayan ikincil yaralanmanın önlenmesidir. Bu amaçla birçok sayıda ilaç hayvan çalışmalarında denenmiş ve önemli bir kısmı etkin bulunmuştur (5-15). Etkin bulunan bu ilaçların bazıları klinik çalışmalarda kullanılmış, fakat metilprednizolon dışında klinik kullanıma geçen olmamıştır (16-17). Fonksiyonel düzelmenin izlendiği deneysel çalışmalarda ilaç tedavisi genellikle ya travmadan önce ya da travma ile eş zamanlı olarak verilmiştir. Günlük yaşamımızda ise travma öncesi veya travma ile eş zamanlı olarak tedavi pek mümkün olmadığı için, benzer başarılı sonuçlar elde edilememektedir. Bununla birlikte, tedavi sırasında görülen yan etkilerinden dolayı yüksek doz metilprednizolon tedavisi de günümüzde tartışmalı hale gelmiştir (18).

Minosiklin yıllardan beri birçok dermatolojik ve romatolojik hastalığın tedavisinde kullanılan ikinci kuşak bir tetrasiklin türevidir (19). 1998 yılında Yrjanheikki ve arkadaşlarının yaptıkları serebral iskemi modelinde nöroprotektif etkinliğinin de gösterilmesinden sonra, minosiklin çok popüler olmuştur (20, 21). Multiple skleroz (MS), Huntington hastalığı, Parkinson hastalığı, Amyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi

nörodejeneratif hastalık modellerinde, kafa ve omurilik travması modellerinde denenmiştir (22-42). Antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisinin olduğu ileri sürülmüştür (38).

Bu çalışmamız da literatürdeki diğer çalışmalardan farklı olarak intraperitoneal ve düşük doz intravenöz minosiklin tedavi yöntemlerini karşılaştırdık. TOY oluşturulmuş sıçanlarda, minosiklinin lipid peroksidasyonuna, ultrastrüktürel yapıya, apoptoza ve lokomotor fonksiyonlara olan etkisini araştırdık. Çalışmamız düşük doz, intravenöz minosiklin tedavisinin kullanıldığı ilk deneysel TOY modelidir. Lipid peroksidasyonu değerlendirmesinde MDA ve GSH analizi, EM incelemesinde ultrastrüktürel yapı skorlama yöntemi ve TUNEL yöntemi ile geç dönem apoptoz tespiti diğer minosiklin çalışmalarından farklı olarak ilk kez çalışmamızda kullanılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

Omurga ve omuriliği ilgilendiren hastalıkların tanı ve tedavisi hakkındaki çalışmalar antik çağlara kadar uzanmaktadır (43). Omurga ve omurilik yaralanmalarıyla ilgili bilinen ilk yazılı belge, yaklaşık beş bin yıl önce Imhotep (M.Ö 2686-2613) tarafından yazıldığı düşünülen Edwin Smith Papirusü'dür (43, 44). Bu papirüste toplam 48 adet kafa ve omurilik travması geçirmiş olgudan bahsedilmektedir. Bu olgular tedavi edilebilecek, tedavi edilmeye çaba gösterilmesi gerekenler ve umutsuz olgular olarak sınıflandırılmaktadır. Papirüste bahsedilen tedavisi umutsuz olguların kliniği günümüzde ki komplet omurilik lezyonu tanımına uymaktadır (44).

Hipokrat (M.Ö 460-370) ve Galen (M.S 129-200) dönemine kadar önemli bir gelişme sözkonusu değildir (43-47). Hipokrat paraplejiyi tarif etmiş, ancak omurilik fonksiyonunu açıklamaktan daha çok, travma sonrası omurga deformitelerinin düzeltilmesi amacıyla traksiyon uygulanmasını önermiştir (46). Galen ise deneysel olarak kesilen omurilik segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu göstermiştir (47). Ege'li Paul (M.S 625-690) omuriliğe bası yapan kırıkların tedavisinde ilk defa laminektomi yapan hekimdir (45).

Fransız cerrah Pare 16. yüzyılda spinal dislokasyonları redükte etmek için tahtadan bir düzenek kurmuştur. Ayrıca bu amaçla insizyon yaparak omurga ve sinirleri öne itmeyi önermiştir (43). Fabricius Hildanus 1646'da servikal fraktür dislokasyonlarda redüksiyon ve traksiyon amacı ile yumuşak dokular ve spinöz çıkıntılara bir çivi takarak klemp ile çekmeyi denemiştir (44). Bu manevranın başarısız olması durumunda ise fragmanların temizlenmesini önermiştir. Louis ise 1762'de lomber bölgeye giren ve paraplejiye yol açan metal bir cisim çıkarmış, operasyon sonrası tam iyileşme bildirmiştir (45).

Omurilik travması ile ilgili ilk patofizyolojik çalışma, 1890'da Schamus tarafından tavşan omuriliğinde travma sonucu gelişen patolojik değişiklikleri inceleyerek yapılmıştır (48). TOY patofizyolojisi zamanla daha iyi anlaşılmış ve deneysel modeller geliştirilmeye başlanmıştır.

1911 yılında Alfred Reginald Allen günümüzde hala en çok kullanılan modellerden birisi olan ağırlık düşürme metodunu tanımlamıştır (49). Köpeklerde laminektomi sonrası omurilik üzerine ağırlık düşürerek kontüzyon tipi omurilik hasarı oluşturmuş ve uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin boşaltılmasının nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını ortaya koymuştur. Bu çalışma daha önce yapılmış olan deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasını sağlamış ayrıca ikincil hasar kavramının da öncülüğünü yapmıştır.

1953'te Tarlov epidural balon kompresyon tekniği ile deneysel omurilik yaralanması modelini tariflemiştir (48).

1978'de Rivlin ve Tator ekstradural klip kompresyon tekniği ile deneysel omurilik yaralanması modelini geliştirmişlerdir (48, 50).

2.2. Epidemiyoloji

TOY, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli bir sorundur. ABD'de 2009 yılında yapılan son istatistiklerde yıllık insidans yaklaşık 12.000 yeni olgu -40 olgu/1 milyon nüfus- olarak bildirilmiştir (1, 2). 2008 yılı itibariyle yaklaşık 260.000 TOY hastası bulunmaktadır. Bu hastaların %81'ini erkekler oluşturmaktadır. 2005 yılından önce omurilik yaralanması ile hastaneye başvuranların yaşı 16 ile 30 arasında değişmekte iken 2005 yılından sonra bu yaş ortalama 40,2 olarak bulunmuştur. Etyolojide motorlu taşıt kazaları %42,1 ile ilk sırayı alırken, düşmeler %26,7, darp (şiddet) %15,1 ve spor kazaları %7,6 ile sıkça görülen diğer sebeplerdendir (1).

Ülkemizde yapılan bir epidemiyolojik çalışmada, yıllık insidans 12.7/1 milyon nüfus olarak bildirilmiştir (51,52). Erkek/Kadın oranı 2.5/1 olarak bulunmuştur. %48,8 ile motorlu taşıt kazaları birinci sırada yer almaktadır. Tetraplejik hastalarda yaralanma en sık C5 seviyesinde saptanırken, paraplejiklerde ise en sık T12 seviyesinde bulunmuştur (51, 52).

2.3. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Patofizyolojisi

Travmatik omurilik yaralanmalarında, mekanik travma nadiren tam kesiye neden olurken klinik olarak genellikle tam fonksiyon kaybı görülmesi dikkat çekici bir durumdur. Bu durum birincil (mekanik) yaralanmayla başlayan ve birlikte seyreden ikincil yaralanma teorisinin gelişmesine neden olmuştur (53).

2.3.1. Birincil (Mekanik) yaralanma

Birincil yaralanma travma anında olan hasardır (2-4). Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon ve rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetler, penetran yaralanmalar omurilik dokusunda ve/veya damarlarında harabiyete neden olurlar. Diğer olası mekanik etkiler, kemik kısımlardan, ligamanlardan veya spinal kanal içindeki hematomlardan kaynaklanan kompresyonu içermektedir. Bu kuvvetler sadece yaralanma esnasında akut olarak değil, kalıcı deformiteye sekonder olarak da omuriliğe kronik süreçte zarar verebilirler.

Birincil yaralanmada bir dizi tek veya kombine mekanik güç mekanizmaları rol oynayabilir (Tablo 2.1). En sık görüleni, çarpma etkisi ve kompresyonun birlikte olduğu yaralanmalardır (4).

Tablo 2.1. Travmatik omurilik yaralanmalarında birincil yaralanma mekanizmaları

Mekanik Kuvvet	Hasar Mekanizması
Çarpma + Devamlı Bası	Patlama kırığı, Kırıklı çıkık, Disk basısı
Çarpma + Geçici Bası	Hiperekstansiyon
Distraksiyon	Hiperfleksiyon
Laserasyon, Tam Kesi	Patlama kırığı, Laminar fraktür, Fraktür dislokasyon, Silah yaralanmaları

2.3.2. İkincil yaralanma

Omurilikte birincil yaralanma ile tetiklenen ve saatler içinde patolojik metabolik ve biyokimyasal mekanizmalarla ilerleyen sürece ikincil yaralanma denir (2, 53). Allen 1911'de, kısa süreli omurilik travmasına maruz kalan hayvanlarda ilerleyici klinikle birlikte ilerleyici doku hasarı olduğunu bildirmiştir (49). Bu durumun açıklanması için

çeşitli patofizyolojik mekanizmalar öne sürülerek ikincil yaralanma kavramı geliştirilmiştir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Travmatik omurilik yaralanmalarında ikincil yaralanma mekanizmaları

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)

Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi
Kan basıncında kısa süreli hipertansiyon, sonra uzun süreli hipotansiyon
Periferik dirençte azalma
Kalp debisinde azalma

Omurilik Mikrodolaşımında Lokal Vasküler Hasar

Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
Özellikle gri cevherde hemoraji
Mikrodolaşımında kayıp-mekanik, tromboz, vazospazm

Biyokimyasal Değişiklikler

Serbest radikal üretimi
Lipid peroksidasyon
Eksitotoksikite: glutamat
Nörotransmitter birikimi
Endojen opioidler
Katekolaminler: noradrenalin, dopamin
Araşidonik asit salınımı
Eikazanoid üretimi
Prostaglandinler
Sitokinler

Elektrolit Bozuklukları

İntrasellüler kalsiyumda artış
İntrasellüler potasyumda artış
İntrasellüler sodyumda artış

İnflamatuvar Cevap

Serbest radikal üretimi
Aksonal yıkım
Miyelin artıklarının uzaklaştırılması
Sitokinlerin salınımı
Glial hücre aktivasyonu
Oligodendritsitlerde sitotoksik etkiler
Wallerian dejenerasyon

Ödem

Apoptoz

Enerji metabolizmasında kayıp

Azalmış ATP üretimi

2.3.2.1 .Vasküler mekanizmalar ve endotel hasarı

Akut omurilik yaralanması sistemik vasküler etkiler ile birlikte ikincil hasara uzanan ani mikrovasküler değişiklikler oluşturur. Bu değişikliklerin ilerleyici karakteri omurilik iskemisini travmadan sonra gittikçe arttırır (2).

Sistemik Vasküler Etkiler

Omurilik yaralanmalarında, travmanın şiddeti ve yaralanmanın seviyesi ile orantılı olarak birçok kardiyovasküler ve hemodinamik değişiklikler ortaya çıkabilir. Nörojenik şok denilen tablo gelişebilir. Hipotansiyon (70 mmHg ve altı), bradikardi (40 atım/dak ve altı) ve hipotermi üçlüsünün tespiti ile tanı konulabilir. Nörojenik şokun sebebi, sempatik tonusun azalması ile ortaya çıkan periferik vasküler dilatasyon, anormal vagal uyarıya bağlı gelişen bradikardi ve sonuçta kardiyak çıktının azalması olarak açıklanabilir (54).

Lokal Vasküler Etkiler

Omurilik yaralanmalarında direkt mekanik travma etkisiyle bazı arteriyollerde ve venüllerde yırtılma olur. Yapılan anjiyografi çalışmalarında anterior spinal arter gibi büyük damarlarda hatta orta boy arteriyollerde bütünlüğün korunduğu, özellikle kapiller dolaşımın bozulduğu gösterilmiştir (50, 55, 56). Hem deneysel hem de otopsi çalışmalarında en sık görülen histopatolojik bulgu omuriliğin merkezinde özellikle gri cevherde görülen kanamadır. Buna santral hemorajik nekroz denir (57, 58). Mikrosirkulasyondaki bozulma ve santral hemorajik nekroz, saatler içinde ilerleme gösterip yaralanma bölgesinin rostral ve kaudaline doğru yayılır. İskemik alan, hemorajik gri cevhere komşu beyaz cevherde daha belirgindir. Gri cevheri katederek beyaz cevhere ulaşan arteriyollerdeki vazospazm ve tromboz ile ikincil hasar artar (54).

Beyaz cevher perfüzyonu travmadan sonraki beşinci dakikada hızla azalırken, on beşinci dakikadan sonra normale dönmeye başlar. Gri cevherde ise ilk beş dakika içinde birçok hemorajik alan belirir. Perfüzyon travmadan saatler sonra bile yoktur. Lezyon bölgesinde özellikle gri cevherde, omurilik kan akımının ileri derecede azalması iskemi ile sonuçlanır. Travma sonrası omurilik iskemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir (59).

Şiddetli ve üst seviye omurilik yaralanmalarında otheregölasyon tamamen bozulur ve oluşan sistemik hipotansiyon sonrası omurilik kan akımında belirgin azalma olur. Ortalama arter basıncının 160 mmHg'ye yükseltilmesi omurilik kan akımını arttırmaz ancak yaralanma bölgesinin komşu bölgelerinde hiperemiye neden olur (54).

Yaralanmış omurilik aksonlarının normal aksonlara göre iskemiye toleranslarının daha az olduğunu gösteren kanıtlar vardır. Omurilik yaralanma derecesi ve posttravmatik iskemi derecesi ile motor ve somatosensoriel uyarılmış potansiyeller arasında lineer ilişkinin olduğunun bildirilmesi, posttravmatik iskeminin akson fonksiyonunun bozulması ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir (60, 61).

Endotel Hasarı

Posttravmatik iskeminin kesin nedeni halen anlaşılamamıştır. Yaralanmayı oluşturan mekanik travma, vazoaaktif aminlerin salınımı, hemoraji, tromboz, platelet agregasyonu ve endotel hasarı vazospazmı tetikleyebilir (2). Kaptanoğlu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, vasküler endotel hasarının travma şiddeti ile doğru orantılı olarak arttığını bununla beraber ödem, akson, myelin ve nükleus hasarı ile karşılaştırıldığında endotelin yaralanmaya en dirençli yapı olduğunu bildirmişlerdir (62). Glutamat –eksitator bir aminoasit- endotel hasarından sorumlu tutulmaktadır. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör blokörlerinin (MK-801, Mg vb) deneysel omurilik yaralanma modellerinde, nöroprotektif etkilerinin olduğu ve endotel hasarını azalttıkları gösterilmiştir (9, 54). Carlos ve Harlan, endotel hasarının aktive olmuş nötrofiller tarafından olduğunu öne sürmüşlerdir (63). Endotel hasarına platelet yapışması, intravasküler platelet agregasyonu ve mikrovasküler oklüzyon eşlik etmesi nedeni ile endotel hasarını azaltmak için antiplatelet ajanlar da denenmiştir (64).

2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler

Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller dış yörüngelerinde çiftlenmemiş bir elektron bulunduran kuvvetli reaktif moleküllerdir. Biyolojik dokularda serbest radikallerin en sık kaynağı moleküler oksijen radikalleridir (Tablo 2.3). Normal metabolizma sırasında ortaya çıkabildikleri gibi

birtakım çevresel faktörler (radyasyon, antineoplastik ilaçlar vb) de serbest radikal yapımını arttırabilirler (2, 4, 65).

Tablo 2.3. Hücre yapıtaşları için toksik oksijen radikalleri

Oksijen Radikalleri	Sembol
Süperoksit anyon radikali	O_2^-
Hidrojen peroksil radikali	HO_2^-
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil radikali	OH^-
Peroksil radikali	ROO^-

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada ‘‘antioksidan’’ olarak adlandırılan savunma sistemleri mevcuttur (Tablo 2.4). Antioksidanlar dört şekilde etkilerini oluştururlar:

- *Toplayıcı etki*; serbest radikallerin tutulması veya daha zayıf bir moleküle çevrilmesi şeklinde etki ederler. SOD, CAT, GPX, GSR bu gruba örnekler.
- *Bastırıcı etki*; serbest radikallere bir hidrojen aktararak reaktivitelerini azaltırlar veya inaktif hale gelirler. A, C, E, K vitaminleri bu gruba örnekler.
- *Onarıcı etki*
- *Zincir kırıcı etki*

Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller, enzimatik antioksidan mekanizmalar (sitokrom oksidaz sistemi vb), non-enzimatik antioksidanlar (tokoferol vb) ya da metal bağlayıcılar (seruloplazmin vb) ile inaktive edilerek doku hasardan korunur. Çeşitli sebeplerden ötürü serbest radikaller antioksidan mekanizmalarla etkisiz hale getirilemezlerse, dokular oksidatif strese maruz kalırlar (2, 4). Oksidatif stres hücre metabolizmasında bir takım bozukluklara neden olur.

Bunlar:

- DNA yapısının bozulması
- İntraselüler serbest Ca^{+2} miktarında yükselme
- Hücre membranı iyon transportunun zarar görmesi ve lipid peroksidasyonu

İntraselüler kalsiyum artışı ise hücre içinde nükleaz, proteaz, protein kinaz C, fosfolipazların aktive olmasına ve hücrenin nekrotik ve apoptotik bir sürece girerek ölümüne neden olmaktadır.

Tablo 2.4. Hücre içi ve hücre dışı antioksidan sistemler

Hücre içi	Hücre dışı
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksit dismutaz (SOD)
Katalaz (CAT)	Ürat
Glutasyon perosidaz (GPX)	Vitamin A, C, E
Glutasyon redüktaz (GSR)	Seruloplazmin
Vitamin A, C, E, K	Metal bağlayıcılar
Ürat	Transferrin
Tiyoller	Albumin
İndirgenmiş glutasyon (GSH)	Laktoferrin
Ubikinon	

Merkezi sinir sistemi, askorbat, glutasyon ve tokoferol gibi antioksidan mekanizmalara yüksek oranda sahiptir (2). Ancak travma sonrası dokuda bu antioksidan mekanizmalar hızla azalır. Oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitler oluştururlar. Bunun sonucunda daha fazla serbest radikal oluşur (65-67).

İskemi veya travma sonrası:

- Oksijen radikali üreten enzim ve substratların artması
- Mitokondride oksijen radikali yapımı artması
- Doku hasarı sonucu kemotaksis ile toplanan nötrofillerden kaynaklanan serbest radikallerin artması
- SOD gibi antioksidan mekanizmaların inaktive olmaları sonucu oksidan-antioksidan dengenin bozulması

Sinir hücresi membran lipidlerinin kolesterol ve doymamış yağ asitlerinden zengin olması, SOD, GPX ve özellikle katalaz enzimlerinin nöral dokuda az miktarda bulunması,

nöronların çok sayıda lizozom içermesi, demir miktarının fazla olması ikincil yaralanmanın merkezi sinir sisteminde daha belirgin olmasına yol açar (2, 4, 65).

Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olaylar topluluğu olarak açıklanabilir. Hücre membranı ve hücre organel membranlarının yapısal matriksi polar bir baş ve ikili kuyruktan oluşan fosfolipidlerden ibarettir. Serbest radikalın, lipid molekülünden bir hidrojen alması sonucu lipid radikali ortaya çıkar. Lipid radikali ortamdaki oksijen ile reaksiyona girip lipid peroksil radikaline dönüşür. Bu bir serbest radikal gibi davranıp başka bir lipid molekülünden bir hidrojen çeker ve sonuçta bir lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid radikali oluşur. Bu reaksiyonlar zinciri sürüp gider ve hücre membranında hasar oluşur (66, 67).

Steroid, siklosporin-A, vitamin E ve selenyum gibi maddeler serbest radikal tutucu etkilerinden ötürü deneysel TOY modellerinde etkin bulunmuşlardır (68, 69) . Kaptanoğlu ve arkadaşları ise melatonin, meksiletin, eritropoetin, tiopental ve propofol gibi ajanların deneysel TOY modellerinde lipid peroksidasyonunu önlediklerini ve ultrastrüktürel koruma sağladıklarını göstermişlerdir (5-14).

Eksitatör Aminoasit Birikimi ve Eksitotoksisite

Omurilik yaralanması sonrası eksitatör aminoasitlerden (EAA) glutamat ve aspartat dakikalar içinde hızla yükselir. Yapılan çalışmalar eksitatör aminoasitlerin neden olduğu geç doku hasarında glutamat reseptörlerinin önemini vurgulamışlardır (70).

Glutamat santral sinir sisteminin en önemli eksitatör nörotransmitteridir. Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, duyu ve sinaptik bağlantıların plastisitesinin sağlanması gibi birçok nörolojik fonksiyonda görev alır. Glutaminerjik sinir uçlarında, mitokondriyal bir enzim olan glutaminaz aracılığıyla glutaminden sentezlenir ve ATP gerektiren bir işlemle presinaptik veziküllere taşınarak burada depolanır. Hücre membranının depolarizasyonu, presinaptik sinir uçlarındaki veziküllerden sinaptik aralığa kalsiyum iyonuna bağımlı bir süreçle glutamat salınmasına yol açar. Sinaptik aralığa salınan glutamat, postsinaptik uça bulunan spesifik reseptörleri aktive ederek, etkilerinin ortaya çıkmasını sağlar. Normal koşullarda sinaptik aralığa salınan glutamat, sodyum iyonuna bağımlı, yüksek afiniteli glutamat geri alım taşıyıcıları aracılığıyla hızla ortamdaki

uzaklaştırılır. Bu taşıyıcılar nöron ve glial hücrelerin membranlarında bulunurlar. Glial hücre içine alınan glutamat, glutamin sentetaz enzimi aracılığıyla glutamine dönüştürüldükten sonra tekrar glutaminerjik sinir uçlarına gönderilir (71).

Herhangi bir sebeple bu dengenin bozulması ve glutamatın sinaptik aralıkta birikmesi sonucu glutamat reseptörlerinin yüksek düzeyde uyarılması ile karakterize bu duruma ‘‘eksitotoksisite’’ denir. Aşırı glutamat birikiminin sebebi, hücre membran polarizasyonuna bağlı olarak sinaptik veziküllerden glutamat salınımının uyarılması ve ATP yetmezliğine bağlı olarak glutamat geri alım mekanizmalarının çalışmaması olarak açıklanabilir (72).

Eksitotoksisite inme, travma ve çeşitli nörodejeneratif hastalığın ortak final yoludur. Deneysel omurilik yaralanmasında da hasardan sonra on beş dakika içinde eksitator nörotransmitter düzeyinin toksik düzeye ulaştığı gösterilmiştir (73-75).

Glutamat farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik yapıya sahip bir dizi spesifik reseptör aracılığıyla etki eder. İki grup glutamat reseptörü vardır (71).

1) Metabotropik reseptörler: Uyarılmaları sonucu guanin nükleotid bağlayıcı protein (G protein) üzerinden etki gösteren ve ikincil mesajcı seri reaksiyonunu aktive eden, protein fosforilasyonu ile hücre metabolizmasını etkileyen reseptörlerdir.

2) İyonotropik reseptörler: Ligand kapılı iyon kanallarıdır. Bu reseptörler, kendilerini selektif olarak aktive eden bileşiklere göre üç alt tipe ayrılırlar.

a) N-Metil-D-Aspartat (NMDA) reseptörleri: NMDA reseptörleri, hipokampus ve kortekste daha yüksek olmak üzere, memeli beyin ve omuriliğinde yoğun olarak bulunmaktadır. Hem glutamat, hem de glisin için bağlanma yerine sahip, kompleks yapıda reseptörlerdir. Aktive olabilmeleri için hem glutamatın, hem de glisinin reseptöre bağlanmış olması gerekir (73).

Ayrıca spermin ve spermidin gibi poliaminler için de bağlanma bölgesine sahiptirler. Poliaminler bu reseptörlerin aktivasyonunu arttırırlar. Magnezyum iyonu tarafından voltaja bağımlı olarak bloke edilirler.

NMDA reseptörü, diğer glutamat reseptörlerinin aksine ancak yüksek güçte sinaptik giriş ile aktive olur ve uzun süreli repolarizasyon sağlar. Ayrıca hücre

içine sodyum (Na^+) ve potasyum (K^+) geçişinin yanında kalsiyum (Ca^{++}) geçişine de imkan veren bir katyon kanalını da kontrol eder. İskemi veya travma gibi patolojik süreçlerde NMDA reseptörlerinin uzamış ve/veya yüksek düzeyde uyarılması hücre içi Na^+ ve Ca^{++} konsantrasyonlarının artmasına sebep olur (74, 75).

- b) Alfa-Amino-3-Hidroksil-5-Metil-4-Isoksazolpropionat (AMPA) reseptörleri:** GluR1-4 diye adlandırılan 4 subunitin ikişerli kombinasyonundan oluşurlar. Esas olarak sodyum iyonu geçişine aracılık ederler. Ancak GluR2 subunitini içermeyenler kalsiyum iyonuna da son derece geçirgendirler. Aktivasyon sonucu Na^+ hücre içerisine girer, K^+ ise hücre dışına çıkar. AMPA reseptör aktivasyonu ile erken dönemde hücre içinde Na^+ birikerek sitotoksik ödem ve intrasellüler asidoz oluşmasına yol açar (76).
- AMPA reseptörleri eksitotoksitedeki etkilerini, depolarizasyon oluşturup voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını açarak, sodyum-kalsiyum pompasının işleyişini tersine çevirerek gösterirler (77).

- c) Kainat reseptörleri:** Çok iyi incelenememişlerdir. KA1-2 subunitleri vardır.

Eksitator aminoasit nedenli nörotoksosite iki safhada oluşmaktadır (73, 78). Erken dönemde patolojik süreçle başlayan glutamatın iyonotropik reseptörleri uyarmasıyla hücre içine hızlı Na^+ akışı olur. Bunu pasif olarak hücre içine su girişi izler ve akut hücresel şişme ile hücre ölümü oluşabilir. Geç dönemde ise özellikle NMDA reseptörünün yüksek oranda ve/veya uzamış uyarımıyla hücre içine Ca^{++} akışı olmakta ve Ca^{++} 'un neden olduğu otodestruktif olaylar zinciriyle hücre ölümü gerçekleşmektedir.

Glutamatın aşırı salgılanması ya da geri alınımının aksaması sonucu, hücre içinde Ca^{++} 'un aşırı birikmesi, lipazlar, proteazlar ve endonükleazlardan oluşan enzimlerin yüksek oranda aktive olmasına neden olur. Yine protein kinazların aktivasyonu ile membran kanallarının ve reseptörlerinin fonksiyonları bozulur. Proteazların aktivasyonu ile hücre iskeletini oluşturan ve plazma membranının bütünlüğünü sağlayan yapılar yıkılır, ortamda fosfolipidler ve özellikle araşidonik asit başta olmak üzere serbest yağ asitleri birikmeye başlar (73-75).

Sonuçta, lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin etkisi ile bu yıkım komşu nöronal ve glial hücrelere zarar vererek zincirleme reaksiyonlar halinde devam eder (Şekil 2.1) .

Nörotransmitter Birikimi

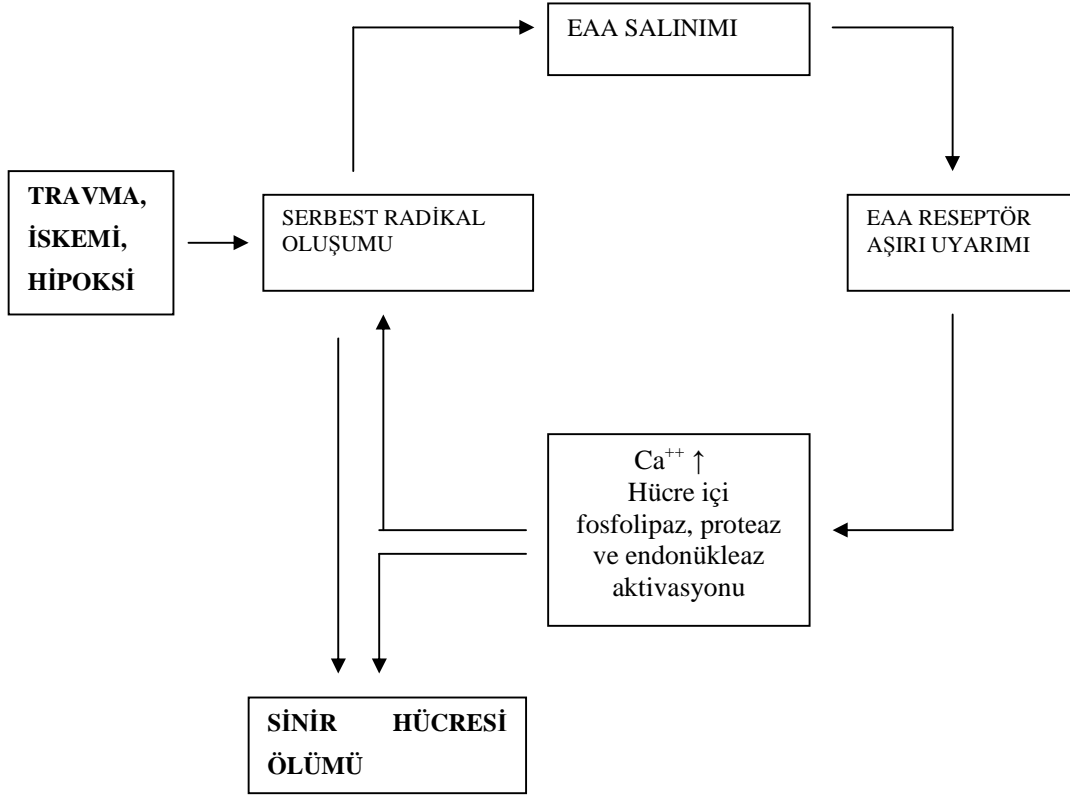
Omuriliğin inen liflerindeki sempatik sinir uçlarından salgılanan dopamin, serotonin ve norepinefrin en önemli vazoaaktif etkili nörotransmitterlerdir. Bu maddelerin omurilik yaralanmalarında yüksek oranda salınımı, vazospazma ve ikincil yaralanmada kötüleşmeye neden olur (4, 79-81).

Endojen Opioidler

Beyin ve omurilikte yoğun şekilde bulunan endojen opioidler fizyolojik şartlarda kan basıncı, ısı regülasyonu, cinsel aktivite, hafıza ve en önemlisi ağrı modülasyonunda görev alırlar. Üç grup altında incelenirler; Endorfinler (alfaendorfin, betaendorfin), Enkefalinler (metenkefalin, löenkefalin) ve Dinorfinler (dinorfin A ve B, neoendorfin alfa ve beta). Yapılan çalışmalarda omurilik yaralanmaları sonrası beta endorfin düzeylerinin arttığının gösterilmesi, dinorfin A düzeyinin travmanın şiddetiyle direkt ilişkili olduğunun savunulması ve yüksek dozda opioid reseptör blokleri –naloksan- verildiğinde nörolojik tabloda ve kan akımında düzelme gözlemlendiğine yönelik yayınların olması bu alana olan ilgiyi arttırmıştır (4, 82).

Araşidonik Asit Salınımı ve Eikasonoid Birikimi

Omurilik yaralanmasında, mekanik yaralanmadan hemen sonra hücre içi kalsiyum artışı ve hasar bölgesinde inflamasyon ile fosfolipazlar aktive olur. Fosfolipazlar membran fosfolipidlerini yıkarak araşidonik asit oluşumuna neden olurlar. Araşidonik asit lipooksijenazlar ile yıkıldığında lökotrienler ortaya çıkar. Siklooksijenazlar ile yıkıldığında ise prostaglandinler, prostasiklin (PGI2) ve tromboksan A2 (TxA2) ortaya çıkar. Araşidonik asit ürünlerinin tümüne birden “eikasonoidler” denir. Travma sonrası araşidonik asit yıkım zincirinin son ürünleri vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonu ile lokal iskemiye ve inflamasyona neden olurlar. Bunun sonucunda serbest radikal oluşumu artar ve lipid peroksidasyonu hasarın derinleşmesine neden olur (4, 83, 84).



Şekil 2.1. Eksitotoksisite ile serbest radikal oluşumu arasındaki ilişki

2.3.2.3. Elektrolit Bozuklukları

Hüresel fonksiyonların yerine getirilebilmesi için, hücrenin intrasellüler ve ekstrasellüler Na^+ ve K^+ gradientlerini dengelemesi gerekir. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonu ekstrasellüler alandan 12 kat daha düşükken, K^+ konsantrasyonu 50 kat daha yüksektir. Bu elektrokimyasal gradientin devamı, bariyer işlevi gören sağlam bir hücre membranını ve bu membrana bağlı bir enzim olan $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ 'ın normal aktivitesini gerektirir (85-87).

$\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ pompası aktif olarak sodyumu ekstrasellüler sıvıya, potasyumu ise intrasellüler bölgeye pompalar. İskemi sonucu dokuda ortaya çıkan enerji yetersizliği ile hücre membranlarından salınan serbest yağ asitleri ve serbest radikallere bağlı lipid peroksidasyonu sonucu $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ aktivitesi düşer. $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPaz}$ aktivitesinin omurilik yaralanmasından beş dakika sonra düştüğü ve bu düşüşün bir hafta sonra bile devam ettiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (85, 87). Bu enzimin aktivitesinin

düşmesi veya durması, sodyumun hücre içine girmesine, potasyumun da hücre dışına çıkmasına yol açar. Hücre içine giren sodyum iyonu, klor (Cl-) iyonunu ve suyu da beraberinde içeri çeker; böylece akut hücre şişmesi olur. Daha ileri aşamalarda ise, değişen membran polarizasyonu, kalsiyum iyonunun hücre içine girmesine ve eksitator aminoasitlerin sinaptik veziküllerden salınmasına yol açar.

Bütün hücrelerde kalsiyum iyonları; hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunması, membran eksitabilitesi, ekzositoz ve sinaptik aktivite gibi sayısız yaşamsal süreçlerin devam ettirilebilmesi için kullanılmaktadır. Normal nöronal fonksiyonların düzenlenmesinde kalsiyum iyonunun bu önemli rolünden ötürü, nöronlar kalsiyum iyonlarının hücre içindeki lokalizasyonlarını ve serbest sitoplazmik konsantrasyonlarını sıkı bir biçimde kontrol altında tutmak için mekanizmalar –hücre içine kalsiyum girişi, kalsiyum tamponu, internal kalsiyum depoları, hücre dışına kalsiyum çıkışı ve intrasellüler kalsiyum diffüzyonu- geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların tümü hücre içi kalsiyum seviyelerinin, hücre dışına göre 100.000 kat düşük olmasını sağlamaktadır (2, 4).

Potasyum Kanalları

Omurilik yaralanmasından sonra subpial bölgede kalan aksonlarda fonksiyonel ileti bozular. Bu aksonlarda refraktör periyod uzar, yüksek frekanslı ileti bozular, aktivasyon eşiği yükselir, ısı bağımlı ileti bloğu olur ve ileti azalır. Hızlı aktive olan K⁺ kanalları myelin tarafından sarılmış olarak paranodal ya da internodal bölgelerde yerleşmiştir. Miyelin yaralandığında hızlı potasyum kanallarının aktivitesi artar, membran potansiyeli potasyum denge potansiyeline yaklaşır ve aksonal ileti bloğu oluşur. 4-aminopiridin hızlı aktive olan voltaj bağımlı potasyum kanallarını bloke ederek, omuriliği yaralanmış kedilerde klinik bulguları iyileştirmiştir (2, 88).

Sodyum Kanalları

Merkezi sinir sistemi (MSS) beyaz cevher yaralanmasındaki anoksi, ATP (Adenozin trifosfat) ve membran depolarizasyonunun kaybına neden olur. Sodyum kanallarından hücre içine sodyum akar. İntrasellüler sodyum konsantrasyonundaki bu artış, Na⁺ - Ca⁺⁺ değiştiricinin ters çalışmasına ve hücre içine aşırı miktarda kalsiyum girişine neden olur (2). Sıçanlarda yapılan deneysel omurilik yaralanma modellerinde, sodyum kanal blokeri olan meksiletin ve fenitoinin nöroprotektif etkileri gösterilmiştir (5, 12, 13).

Kalsiyum Kanalları

Fizyolojik olarak kalsiyumun hücre içine girişi temel olarak iyon kanalları vasıtasıyla olur. Kalsiyumun hücre dışına çıkışı ise iyon pompaları tarafından kontrol edilmektedir. Bunun yanında kalsiyum tamponlanması, birkaç kalsiyum bağlayıcı protein ve aynı zamanda kalsiyum deposu olarak da görev yapan, sitoplazmik organeller –mitokondri, endoplazmik retikulum- tarafından yürütülmektedir (89).

Günümüzde hem in vitro hem de in vivo ortamlarda yapılan çalışmalar, hücre içine kalsiyum girişi ve nöral dokuda oluşan hasar arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Schanne ve arkadaşları, hücre içine kalsiyum girişinin toksisitenin açığa çıkması için kesin bir gereklilik olduğu sonucuna vardılar ve bu sürece "hücre ölümünün son basamağı" adını verdiler (90, 91).

Omurilik yaralanmasında hücre hasarı ile membranların parçalanması, hücrede enerji yetmezliği ve bunun neticesinde Na^+ - Ca^{++} değiştirici gibi elektrolit pompalarının iyi çalışmaması sonucunda gradient farkı ile hücre içine kalsiyum girişi olur. Kalsiyum iyonları hücre içinde fosfolipazları, proteazları ve fosfatazları aktifleyerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur. Fosfolipazlar hücre membranlarının yıkılmasını sağlayarak araşidonik asit gibi yağ asitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz, araşidonik asiti prostaglandinler ve lökotrienlere dönüştürür. Fosfatazlar nitrik oksit sentetaz gibi diğer enzimleri aktifler, ayrıca kalsiyum kanallarının ve diğer iyon kanallarının çalışmasını düzenler. Hücreye kalsiyum girişi ve serbest radikal oluşumu eş zamanlı olur ve sinerjistik etki gösterebilir. Kalsiyum iyonları mitokondrial respiratuar enzimlere bağlandığında elektron transportunu bozarak serbest radikal oluşmasına neden olurlar (2, 4).

Bu oksijen serbest radikalleri, fosfolipazlar ve proteazlarla birlikte membranın yıkılmasına ve araşidonik asitin serbestlenmesine neden olurlar. Voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının bloke edilmesinin (nimodipin, nikardipin) omurilik yaralanmasında klinik sonuçları iyileştirmezken, kan akımını arttırdığı gösterilmiştir (92-94).

Hücreye kalsiyum iyonlarının girişi için bir diğer yol da glutamat reseptörleridir. Glutamat reseptör blokörleri deneysel omurilik yaralanmasında nörolojik sonuçları iyileştirir.

Bazı tedaviler hücre içine kalsiyum girişi neticesinde oluşan olayları etkileyerek nöroprotektif etki gösterirler. Glukokortikoidler kalsiyumun aktive ettiği fosfolipaz aktivitesi ile ilişkili bir proteinin sentez ve salınımını önler. İndometazin ve diğer siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitörleri eikazanoidlerin üretimini azaltırlar. Siklosporin ve FK506 kalsinörünü inhibe ederken, nitrik oksit üretimini azaltır ve nöronları glutamat toksisitesinden korur (95-97).

2.3.2.4. İnflamatuar Cevap

Omuriliğin travmatik yaralanması sonrası inflamasyon cevabı saatler içinde başlar ve birkaç gün içinde tepe değerine ulaşır. Bu cevap endotel hasarı, mikroglia aktivasyonu, inflammatuar mediatörlerin salınımı, vasküler permeabilite artışı, ödem ve periferel inflammatuar hücrelerin göçü olarak gözlemlenir (53, 98).

Merkezi sinir sisteminin temel savunma hücreleri, mikroglialar omurilik yaralanmasından sonra erken dönemde aktive olurlar ve IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflammatuar sitokinleri salırlar (99-101). Bu erken mikroglia aktivasyonunu nötrofil invazyonu takip eder. Birinci günde tepe değerine ulaşırken üçüncü günde kaybolurlar (99, 101). Nötrofiller, proteazlar, serbest oksijen radikalleri ve nitrik oksid gibi çok sayıda sitotoksik faktörün yapımından ve salınımından sorumludurlar. Lipid peroksidasyonuna ve protein nitrasyonuna katkıda bulunurlar (102). Nötrofillerin bu zararlı etkilerini bu aşamada bloke eden ajanların, deneysel hayvan çalışmalarında nörolojik fonksiyonel iyileşmeyi sağladıkları bildirilmiştir (103). Nötrofillerden sonra yaralanma bölgesine gelen hücreler, makrofajlardır (99). Esas görevleri oluşan hücre debrisinin fagositozudur. Omurilik yaralanması sonrası ortaya çıkan makrofajların hem pozitif hem de negatif etkileri bulunmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda makrofajların kontrollü aktivasyonunun organizmanın lehine olduğu vurgulanırken, diğer çalışmalarda da makrofaj aktivasyonunun demyelinizasyonu, kavite oluşumunu ve kalıcı akson hasarını arttırarak ikincil yaralanmaya katkıda bulunduğu gösterilmiştir (22, 38).

2.3.2.5. Apoptoz

Apoptoz, klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdaki birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptoz terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı

dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Bu fizyolojik olay, dokularda tek tek hücre kaybına yol açtığından latince ayrı düşmek anlamına gelen –apo: ayrı, ptoz: düşmek- apopitoz denilmiştir (38).

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen apopitozun, daha önce hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen, bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir. Birçok yönüyle nekrozdan farklıdır. Kromatin agregasyonu, intranükleozomal DNA fragmentasyonu, çekirdek piknozisi ve hücre büzüşmesi gibi birtakım hücre içi olayları içerir. Hücrelerin sitozolik parçalarının dışarı salgılanması ve herhangi bir lokal inflamatuvar yanıt olmaksızın fagosit içine alınmasıyla sonuçlanır. Apopitoz hücrenin protein sentezi ve enerji gerektiren aktif ölümüdür (2, 38).

Apopitoz sürecine giren hücreler büzüşür, komşu hücrelerle temas kaybı olur, membranda blebler oluşur ve profagositik yüzey sinyalleri taşırlar. Süreç daha sonra kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu ile devam eder. Tüm hücrenin küçük, çevresi membranla çevrili, hızla fagosite edilebilen veziküllere parçalanmasıyla sona erer (2, 38).

Hücre nekrozu ise hücre membranı parçalanması, mitokondriyal şişme, rastlantısal DNA yarıklanması ve genel-bölgesel inflamatuvar reaksiyon içeren uzun bir olaydır (2, 38).

Apopitozun indüklenmesinde üç prototip sinyal yolu vardır (2, 38).

- 1) Mitokondri aracılı apopitoz oluşturulması
- 2) Dış sinyallerle apopitozun tetiklenmesi
- 3) Endoplazmik retikulum (ER) aracılı apopitoz oluşturulması

Apopitoz tanımlanmasında pek çok moleküler biyolojik test geliştirilmiştir. DNA yarıklanmasını gösteren terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) bağımlı nick-end labeling (TUNEL) tekniği oldukça popüler bir testtir. İtranükleozomal DNA fragmentasyonu apopitozun ana işaretidir ve elektroforezde karakteristik olan merdivenleşme paterniyle tanınabilir (19).

Apopitoz omurilik yaralanmalarında önemli rol oynar. Yong ve arkadaşları, ciddi kontüzyon zedelenmesinden sonra sıçan omuriliğinde travma tarafından indüklenmiş apopitoz varlığını göstermişlerdir (104). Diğer bir deneysel omurilik yaralanma modelinde,

apoptozun görülebilir bulgularının ilk 24 saat içinde ortaya çıktığı ve en az 3 hafta sonraya kadar devam ettiği gösterilmiştir (105). Emery ve arkadaşları 1998 yılında, travmatik omurilik yaralanması geçiren insanlarda, lezyon merkezinin kenarlarında ve komşu beyaz cevherde apoptotik hücelere rastlamışlardır (106).

2.4. Travmatik Omurilik Yaralanmasının Histopatolojisi

Omurilikte travmayı takiben başlayan ikincil hasar süreci akut, orta ve geç faz olarak sınıflanabilir. Akut faz da erken akut (2-48 saat) ve subakut (2-14 gün) olmak üzere iki başlık altında incelenebilir (2, 53, 107).

2.4.1. Akut Faz

2.4.1.1. Erken Akut Faz (2-48 saat)

Yaralanmadan sonraki ilk değişiklik omurilik gri cevher mikrovaskülaritesindeki değişikliklerdir. Santral kanal etrafı ve ön boynuzdaki multifokal peteşial kanamalar saatler içinde radial olarak yayılma eğilimindedirler. Mikrotrombüslerin gözlenmesi ve kanın ekstrasvaze olması ilk 24 saatte belirginleşir. Yaralanmadan dakikalar sonra endotel bileşkeleri açılmaya başlar. Santral peteşiler genişledikçe glial reaksiyon ve nöronal dejenerasyon belirgin hale gelir. Yaralanmış kan omurilik bariyerine bağlı ödem formasyonu yaralanmadan sonra erken saatlerde başlar, radial ve longitudinal olarak ilerler, ilk 24 saatte belirginleşir. Ödem pia elastisitesi olmadığı için vasküler rezistansın artmasına ve dolayısıyla omurilik kan akımının azalmasına neden olur. Nöronlarda nekrozun ilk göstergeleri birinci saatte başlar. Sitoplazmik eozinofili, hayalet hücreler, Nissl cisimciğinin kaybolması, küçülmüş nöronlar, hiperkromatizasyon ve irregüler şekil nekrotik değişiklik göstergeleridir. Gri cevherdeki nekrotik değişiklikler ilk saatlerde artar, 8. saatten sonra beyaz cevhere yayılmaya başlar. Ön boynuz hücrelerinde arka boynuz hücrelerine göre daha erken nekroz görülür. Hem nöronlar, hem de glial hücrelerde aynı zaman aralığında hücre ölümü görülür. Hücre içi kalsiyum artışı sonucu nükleazlar, proteazlar, kinazlar ve lipazların aktivasyonu ile hücre hasarı artar ve hücre ölümü nekroz ya da apoptoz şeklinde gerçekleşir (2).

2.4.1.2. Subakut faz (2-14 gün)

Aktive olmuş mikroglia ve astrositler reaktif gliosis oluşturmaya başlarlar. Mikroglia, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Bu hücreler lezyon merkezinde çalışırlar ve nadiren yayılırlar. Sağlıklı ya da hafifçe yaralanmış hücreleri öldürüp öldürmediği henüz anlaşılamamıştır. Yaralanmaya cevap olarak astrositler hipertrofi ve proliferasyon gösterirler. Astrositik cevap 14. günde en üst düzeye çıkarken bazen bu süreç 28 güne kadar uzayabilir. İnflamatuar hücrelerin yaralı omuriliğe göçünde iki dalga vardır. Birincisinde polimorfonükleer granüositler yaralanmadan saatler sonra lezyon bölgesine gelerek sitotoksik etkileri ile nöronofaji yapabilirler. 24 saatte maksimum düzeye çıkıp, 72. saatte kaybolurlar. İkinci dalgada, lezyon bölgesine monosit ve makrofajlar gelir ve hücre debrisini fagosite ederler. Schwann hücreleri, meningeal hücreler ve fibroblastlar lezyon bölgesine göç eden diğer periferel hücrelerdir (2, 107).

2.4.2. Orta Faz (2 hafta-6 ay)

Önceden başlamış glial skar dokusunun oluşumu ve olgunlaşma süreci bu fazda devam eder (107).

2.4.3. Geç Faz (>6 ay)

Omurilikte yara iyileşmesi, kistik kavite oluşumu ile sonuçlanır. Yaralanmadan aylar sonra santral kanal ile birleşmiş, beyin omurilik sıvısı ile dolu kistik kaviteler gelişir. Bu kistik kaviteler stabil lezyonlar olmayıp yaklaşık %30 kadarı ilerleme gösterebilirler. İlerleyici nörolojik defisit ve nöropatik ağrıya sebep olabilirler.

Zedelenmiş aksonların wallerian dejenerasyonları bu fazda hala devam ederken, bu zedelenmiş akson ve hücre gövdelerinin temizlenmesi yıllar sürebilir.

Demyelinizasyon gelişmiş ve/veya kısmen kurtulmuş aksonlarda, remyelinizasyonun kısıtlı da olsa tekrardan başlaması bu fazın diğer bir önemli özelliğidir (2, 53, 107).

2.5. İkincil Omurilik Yaralanmasına Yönelik Tedavi Girişimleri

Tibbin diğer dallarındaki gelişmeler ile karşılaştırıldığında, TOY tedavisi hakkındaki ilerlemeler çok yavaş olmaktadır (Tablo 2.5). Son 25 yıl içinde çok sayıda umut verici ajan

linik çalışmalarda denenmiş olmasına rağmen günümüz itibariyle yaygın kabul gören hiçbir ajan bulunmamaktadır (16, 17).

2.5.1. Kortikosteroidler

Metilprednizolon sodyum süksinat (MPSS) hem deneysel hem de klinik çalışmalara en fazla konu olmuş ve nöroprotektif etkileri gösterilmiş glukokortikoiddir. Serbest radikal oluşumunu azaltması, lipid peroksidasyonunu engellemesi, Na⁺/K⁺-ATPaz pompa aktivitesini düzenlemesi, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu ayarlaması ve omurilik kan akımını düzeltmesi söz konusu nöroprotektif etkilerindedir (2, 16, 17).

1984 yılında tamamlanan NASCIS I (North American Spinal Cord Injury Study I) adlı klinik çalışmada, yüksek ve düşük doz MPSS alan hasta grupları karşılaştırıldı. Nörolojik gelişme açısından, her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, yüksek doz ilaç alan grupta yara yeri enfeksiyonu, gastrointestinal kanama, sepsis ve pulmoner emboli görülme sıklığında artış izlenmesi dikkat çekiciydi (16, 17).

Hemen bu çalışmanın ardından başlanan ve 1990 yılında tamamlanan NASCIS II adlı klinik çalışmada ise yüksek doz MPSS, naloksan ve placebo karşılaştırıldı. Yaralanma sonrası ilk 24 saat içinde verilen 3 madde arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmazken, yaralanma sonrası ilk 8 saat içinde MPSS alan grupla diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptandı (17).

Bunun zerine NASCIS III alışması, MPSS'nin ilk 8 saatte uygulandığında ortaya çıkan olası faydalarını saptamak için planlandı. 1997 yılında tamamlanan bu çalışmada, MPSS'nin 24 ve 48 saat süren infüzyonları tirilizad mesilad (TM) –glukokortikoid ve mineralokortikoid etkisi olmayan ancak lipid peroksidasyonunu metilprednizolona göre daha yüksek oranda inhibe eden 21 aminosteroid- ile karşılaştırıldı. Bu alışma, yaralanma sonrası ilk 3 saat içinde MPSS tedavisi başlanırsa 24 saatlik infüzyonun, eğer 3 ila 8 saat arasında başlanırsa da 48 saatlik infüzyonun daha etkili olacağını gösterdi. Tirilizad mesilatın klinik kullanıma yönelik faydalı bir etkisi bulunamadı. 48 saatlik MPSS infüzyon grubunda sepsis, pnömoni ve ölüm oranlarının 24 saatlik tedavi grubu ile karşılaştırıldığında ortalama 3 kat daha fazla olduğu saptandı (16, 17).

2006 yılında ABD’de çalışan spinal cerrahlar arasında omurilik yaralanmalarının tedavisi hakkında yapılan bir anket, cerrahların büyük bir kısmının sadece hukuki davalara konu olmamak için, MPSS kullandıklarını ortaya koydu (17, 18).

2.5.2. Gangliozid GM-1 (Sygen)

Gangliozidler, sinir dokusu hücre zarlarında bulunan kompleks yapıda glikolipidlerdir. Yapılan hayvan çalışmalarında, gangliozidlerin nöral doku tamirini ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir. 1991 yılında 37 hastayı içeren randomize, kontrollü Maryland GM-1 klinik çalışması, plasebo ile karşılaştırıldığında motor skorlardaki iyileşmenin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ortaya koydu. Bunun üzerine, TOY hakkında şimdiye kadar yapılmış en geniş, randomize klinik araştırma –Sygen- planlandı. 28 tane klinik, 750’den fazla hasta 5 yıl süren bu çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın sonucunda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar çıkmadı (16, 17).

2.5.3. Tirotropin Salgılatıcı Hormon (TRH)

Yapılan deneysel TOY modellerinde, TRH’nın ikincil hasarda görülen eksitotoksiteyi, endojen opioidleri, lökotrienleri ve platelet aktive edici faktörleri doz bağımlı olarak antagonize ettiği gösterilmiştir. 1995 yılında TRH ile ilgili ilk ve tek çalışma yapıldı. Randomize, çift kör, plasebo kontrollü olarak yapılan çalışmada komplet ve inkomplet yaralanmalı hastalar plasebo ile karşılaştırıldı. İnkomplet yaralanmalı küçük bir hasta popülasyonunda elde edilen fonksiyonel iyileşmenin plasebo ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmasına rağmen, çalışma kurgusundaki hatalardan ötürü bu sonuçlar anlamlı olarak değerlendirilmedi (17).

2.5.4. Gasiklidin (GK-11)

Gasiklidin, deneysel TOY modellerinde nöroprotektif etkisini kanıtlamış, yan etkisi daha az bir non-kompetitif NMDA reseptör antagonistidir.

Fransa’da 200 hastanın dahil edildiği çift kör, faz II insan çalışmasında denenmiştir. Erken dönem sonuçları anlamlı olmakla birlikte, geç dönem kontrollerinde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu geç dönem negatif sonuçlar her ne kadar yetersiz istatistiksel değerlere bağlansa da, gasiklidin yeni çalışmalarda tekrar düşünülmemiştir (16, 17).

2.5.5. Nimodipin

Nimodipin bir L-tipi kalsiyum kanal blokeridir. Yapılan çalışmalarda eksitotoksisite ve apoptoz üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (92). Bunun üzerine insan klinik çalışmaları planlanmıştır. 1996 yılında Fransa'da tamamlanan çalışmaya 100 adet omurilik yaralanmalı hasta dahil edilmiştir. Nimodipin, MPSS ve plasebo ile karşılaştırılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç çıkmamıştır (16, 17).

2.5.6. Diğer

Son yıllarda ikincil omurilik yaralanmasına yönelik yeni farmakolojik ajanlar denenmektedir. Riluzol –ALS tedavisinde kullanılan antikonvulzan- ve minosiklin –akne tedavisinde kullanılan tetrasiklin grubu antibiyotik- bu ilaçlardan en popüler olanlarıdır (16, 17, 19, 38). Santral nöronların rejenerasyon kabiliyetlerinin olduğunun David ve Aguayo tarafından gösterilmesinden sonra rejenerasyon çalışmaları büyük hız kazanmıştır (108). Omurilik yaralanması sonrası, merkezi sinir sistemindeki bir takım faktörlerin nöron rejenerasyonunu inhibe ettiği ortaya çıkmıştır (17). Myelin ve glial skar dokusu ile ilişkilendirilen bu inhibitör faktörlerin antagonize edilmesiyle de yaralanma sonrası oluşan fonksiyon kayıplarının düzeldiği görülmüştür (109). Fehlings ve arkadaşları tarafından başlatılan çok merkezli faz I/IIa insan çalışmasında da rejenerasyon inhibitörleri Cethrin® isimli ajanla antagonize edilmişlerdir. Devam eden çalışmadan çıkan ilk sonuçlar, hastaların %27'sinde fonksiyonel iyileşmenin olduğunu göstermektedir (17).

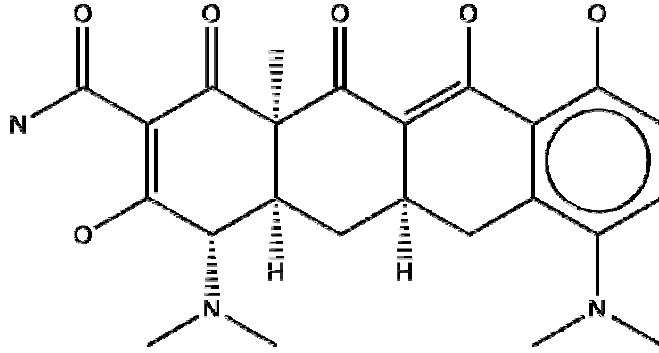
Rejenerasyon çalışmalarıyla birlikte hasarlı omuriliğin yeniden yapılanmasını amaçlayan hücre transplantasyonu çalışmaları da son zamanlarda hız kazanmıştır. Aktive otolog makrofajlar, schwann hücreleri, olfaktor hücreler, kemik iliği stromal hücreler ve embriyonik kök hücreler bu çalışmalarda en sık kullanılan ve gelecek vaat eden hücrelerdir (17).

Tablo 2.5. Tamamlanmış prospektif, randomize, kontrollü, omurilik yaralanması klinik çalışmaları

Çalışma adı	Yıl	Hasta sayısı	Çalışma dizaynı	Kullanılan ilaç
NASCIS I	1984	330	Faz III RK	MPSS 100 mg MPSS 1000 mg
NASCIS II	1990	487	Faz III RK	MPSS (24 saat) Naloksan Plasebo
Maryland GM-1	1991	34	Faz II RK, pilot çalışma	GM-1 Plasebo
Otani et al.	1994	158	RK	MPSS (24 saat) Plasebo
TRH	1995	20	Faz II RK, pilot çalışma	TRH Plasebo
NASCIS III	1997	499	Faz III RK	MPSS (24 saat) MPSS (48 saat) TM
Nimodipin	1998	100	Faz III RK	Nimodipin MPSS (24 saat) Nimodipin+MPSS Plasebo
Gasiklidin	1999	280	Faz II RK	Gasiklidin Plasebo
Pointillart et al.	2000	106	RK	MPSS Nimodipine Nimodipin ve MPSS Plasebo
Sygen (GM-1)	2001	797	Faz III RK	MPSS ve GM-1 MPSS ve plasebo

2.6. Minosiklin

Minosiklin, yaklaşık 30 yıldır kullanımda olan yarı sentetik bir tetrasiklin türevidir. Lipofilik bir yapısı vardır. Tetrasiklinler içerisinde, beyin omurilik sıvısına (BOS) en iyi geçen ve en uzun etkili olan moleküldür (Şekil 2.2). Yıllardır akne tedavisinde çok yaygın olarak kullanılmaktadır (19, 38).



Şekil 2.2. Minosiklinin kimyasal yapısı

Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda, minosiklinin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra nöroprotektif etkilerinin de olduğu bildirilmiştir. Antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkileri ile nöroproteksiyon sağladığı öne sürülmektedir (19, 38).

DeneySEL serebral iskemi, MS, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve ALS modellerinde denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (20, 21, 23-33).

Yrjanheikki ve arkadaşları yaptıkları deneysel global serebral iskemi modelinde, iskemi başlangıcından 12 saat önce ve 30 dakika sonra verilen minosiklinin hipokampal piramidal nöronların yaşam sürelerini sırasıyla %77 ve %71 arttırdıklarını göstermişlerdir (20). Fokal serebral iskemi çalıştıkları diğer bir modelde ise, iskemi başlangıcından 4 saat sonra başlanan minosiklin tedavisinin kortikal enfarkt alanını %63 oranında düşürdüğünü göstermişlerdir (21). Bu iki çalışma sonucunda araştırmacılar, minosiklinin serbest radikal oluşumunu azalttığını, matriks metalloproteazları (MMP), SSS'de zararlı etkileri olan mikroglia aktivasyonunu ve inflamasyonda önemli rol oynadığı kabul edilen indüklenbilir nitrik oksit sentaz'ı (iNOS) inhibe ettiğini ve hücre ölümü ile inflamasyonda ikili rol

oynayan anahtar bir enzim olan kaspaz 1 (IL-1 β) mRNA seviyelerini azalttığını öne sürmüşlerdir. Böylece minosiklinin hem antiinflamatuvar hem de antiapoptotik etkili iki yönlü bir ajan olduğuna dair ilk ipuçları ortaya çıkmıştır.

Bu ilk inme çalışmalarını takiben 2000 yılında Chen ve arkadaşları Huntington hastalığı yapılmış farelerde minosiklin tedavisinin yaşam süresini %14 uzattığını ve performans sonuçlarında ortaya çıkan gerilemeyi geciktirdiğini göstermişlerdir (25). 2001 yılında Sanchez Mejia ve arkadaşları, minosiklin tedavisinin travmatik beyin hasarı sonrası ortaya çıkan lezyon hacmini ve nörolojik defisitleri azalttığını göstermişlerdir (34). He ve arkadaşları Parkinson hastalığı yapılmış farelerde minosiklinin nigral hücreleri koruduğunu, diğer bir Parkinson hastalığı modelinde ise Du ve arkadaşları, minosiklinin nigrostriatal dopaminerjik nörodejenerasyonu yavaşlattığını bildirmişlerdir (27, 29). 2002 yılında Brundula ve arkadaşları, minosiklinin deneysel MS modelinde hastalığın ilerleyişini yavaşlattığını göstermişlerdir (23). Deneysel ALS modelinde ise Zhu ve arkadaşları minosiklinin hastalığın başlangıcını geciktirdiğini ve farelerin beklenen yaşam süresini uzattığını bildirmişlerdir (30).

Bu gelecek vaat eden başarılı çalışmalardan sonra 2003 yılında, minosiklinin kullanıldığı 2 adet deneysel travmatik omurilik yaralanması çalışması yayınlanmıştır. İlk çalışmada, Wells ve arkadaşları travmatik omurilik yaralanmasından sonra glutamat, serbest radikaller ve matriks metalloproteazlar gibi çeşitli inflamatuvar nörotoksik moleküllerin arttığını ve sadece tek bir spesifik moleküle veya yola yönelik bir ajan denemektense, minosiklin gibi çok yönlü bir ajan denemenin daha etkili olacağını ileri süren bir hipotez geliştirmişlerdir (35). Çalışmalarında, travmatik omurilik yaralanması oluşturulmuş deneklerin bir grubuna travmadan 1 saat sonra başlayarak 5 gün boyunca minosiklin, bir gruba metil prednizolon ve diğer bir gruba da sadece serum fizyolojik vermişler. Çalışmanın sonunda deneklerin davranış analizleri ve omurilik dokusunun histolojik değerlendirmeleri yapılmış. Birinci ayın sonunda yapılan davranış analizlerinde, minosiklin verilen gruptaki deneklerin arka ayak güçlerinde ve fonksiyonlarında, kontrol ve metilprednizolon grupları ile karşılaştırıldığında belirgin iyileşme saptanırken, ek olarak yapılan histopatolojik değerlendirmelerde de minosiklin grubunda travmaya bağlı gelişen lezyon genişliğinde ve akson hasarında belirgin bir düşüş saptanmış. Sonuç olarak hipotezlerine uygun şekilde, minosiklinin travmatik omurilik yaralanmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir (35).

İkinci çalışmada Lee ve arkadaşları, minosiklinin antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerini araştırmak için travmatik omurilik yaralanması oluşturulmuş ratlarda davranış analizi, omurilik dokusunun morfolojik analizi, TUNEL, kaspaz-3 aktivitesi ve inflamatuvar sitokin düzeyleri çalışmışlar (36). Travmadan hemen sonra başlanan minosiklin tedavisi sonrasında, tedavi alan gruptaki ratların arka ayak güçlerinde ve fonksiyonlarında, kontrol grubundaki ratlara göre belirgin düzelme saptamışlar. Minosiklin alan grupta travma sonrası gelişen lezyon boyutunda 21. ve 38. günler arasında belirgin azalma saptanmış. Minosiklin tedavisi TUNEL pozitif hücre sayısını ve kaspaz-3 düzeylerini anlamlı derecede azaltırken, antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-10 salınımını arttırmış. Buna ek olarak minosiklin alan grupta proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α salınımının azaldığı ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak yazarlar, minosiklinin omurilik yaralanmasında nöroprotektif bir ajan olduğunu bildirmişlerdir (36).

2004 yılında Teng ve arkadaşları, yaptıkları bir deneysel travmatik omurilik yaralanması modelinde minosiklinin, mitokondriden sitoplazmaya olan sitokrom c salınımını inhibe ederek kaspaz 3 ve kaspaz 9 aktivasyonuna bağlı ikincil hasar mekanizmalarını engellediklerini bildirmişlerdir (39). Aynı çalışmada, minosiklinin travma bölgesinde oluşan posttravmatik astrogliozisi inhibe ettiğini ve ratlarda birinci haftadan itibaren başlayan bir fonksiyonel düzelme de saptadıklarını bildirmişlerdir.

2004 yılında Stirling ve arkadaşları, yaptıkları deneysel servikal dorsal kolon transeksiyon modelinde minosiklinin, beyaz cevherdeki oligodendrosit apoptozunu ve mikroglia/makrofaj aktivasyonunu azalttığını, kortikospinal aksonları ilerleyici hasardan koruduğunu, travmaya ikincil gelişen lezyon boyutunu azalttığını ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını bildirmişlerdir (37).

Bütün bu çalışmaların ışığında, Yong ve arkadaşları Aralık 2004'te minosiklinin etki mekanizmalarını anlatan bir derleme yayınlamışlardır (19). Çalışmalarında minosiklinin, mikroglial aktivasyonu inhibe ettiğini, apoptozu yavaşlattığını, serbest radikal oluşumunu baskıladığını, matriks metalloproteazları inhibe ettiğini, lökosit fonksiyonlarını düzenlediğini ve kalsiyum bağlayıcı olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte bahsedilen bütün bu etkilerin omurilik travmasının erken döneminde daha belirgin olduğu için, minosiklin tedavisinin ilk birkaç gün içinde başlamasını önermişlerdir.

Stirling ve arkadaşları 2005 yılında yayınlanan derlemelerinde, minosiklinin antiinflamatuvar etkinliği ile karşılaştırdığında daha az bahsedilen antiapoptotik etkisi ve üçüncü bir yolak –p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK)- üzerinde durmuşlardır (38). Minosiklinin, hücreleri apoptotik uyarılara karşı daha dirençli hale getirerek hücre ölümünü azalttığını bildirmişlerdir. Minosiklinin bu etkiyi antiapoptotik proteinleri artırarak ve/veya proapoptotik maddelerin etkisini antagonize ederek veya kaspaz aktivasyonunu azaltarak ortaya çıkardığını ileri sürmüşlerdir. Buna ek olarak, minosiklinin mitokondri üzerine direkt etki ederek sitokrom c, Smac/DIABLO ve apoptoz indükleyici faktör (AİF) gibi proapoptotik moleküllerin serbestlenmesini inhibe ettiğini açıklamışlardır.

P38 MAPK, stres veya çeşitli sitokinlere cevaben salgılanan ve çok sayıda kinaz tarafından aktifleşen serin treonin kinazıdır. İnflamatuvar sinyal iletiminde çok önemli rol oynar. İnflamatuvar reaksiyonlar esnasında nötrofil cevabını düzenler. İnhibisyonları IL-8 üretimini, superoksid oluşumunu ve nötrofil kemotaksisini ortadan kaldırır. Nötrofillerin TNF- α veya GM-CSF ile uyarılması p38 MAPK aktivasyonu sağlar. P38 MAPK nöronların ve glial hücrelerin apoptozunda rol oynar. P38 MAPK inhibisyonu nöron ve oligodendrositleri korurken, immün hücrelerin ölümünü indükler. Sonuç olarak yazarlar, nötrofillerden salınan sitotoksik faktörlerin inhibisyonunun veya p38 MAPK inhibisyonu ile nötrofillerin ölümünün, omurilik yaralanması sonrası ortaya çıkan ikincil yaralanmayı azaltacağını ileri sürmüşlerdir (38).

Yune ve arkadaşları, yaptıkları deneysel omurilik yaralanması modelinde minosiklinin, p38 MAPK yolu üzerinden mikrogliyalarda üretilen sinir büyüme faktörünü inhibe ederek oligodendrositlerde görülen apoptozu azalttığını bildirmişlerdir. Bu yazılarıyla minosiklinin oligodendrosit kaybı üzerindeki inhibitör etki mekanizmasını ortaya koyduklarını iddia etmişlerdir (41).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler çerçevesinde, Başkent Üniversitesi Etik Kurulu'ndan gerekli onay (12/02/2009 tarih DA09/03 sayı) alındıktan sonra yürütülmüştür. Çalışmada toplam 80 adet, 400-450 gram ağırlığında, Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deneklerin genel sağlığı çalışma öncesi kontrol edildi ve her denek yer aldığı gruba göre uygun yöntemle işaretlendi. Deney süresince tüm denekler, 25 C° sıcaklığında odalarda, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık döngüsüne uygun olarak, kafeslerde tutuldular. Deneklere yem veya su kısıtlaması yapılmadı. Mesaneleri düzenli olarak boşaltıldı (39).

3.1. Denek Grupları

Denekler eşit olarak 4 gruba bölündü. Her grupta biyokimya için 6, elektron mikroskopisi için 8 ve patoloji için 6 sıçan ayrıldı (Tablo 3.1).

Grup I Kontrol grubu: Deneklere sadece laminektomi yapıldı ve herhangi bir tedavi verilmedi.

Grup II Travma grubu: Deneklere omurilik travması uygulandı. İlaçlar ile eşit miktarda %0,9'luk NaCL çözeltisinden verildi.

Grup III Minosiklin (iv) grubu: Travmadan hemen sonra, 1mg/kg Minosiklin hidroklorid kuyruk veninden yavaş infüzyon olarak verildi. Daha sonra 24 saat boyunca, her 4 saatte bir, aynı miktarda ilaç aynı yol ile 5 kez daha uygulandı.

Grup IV Minosiklin (ip) grubu: Travmadan hemen sonra 90 mg/kg Minosiklin hidroklorid ip olarak verildi. Daha sonra 24 saat boyunca, 12 saatte bir, 45 mg/kg ilaç ip olarak 2 kez daha verildi.

Biyokimyasal değerlendirme için 24 adet sıçan, travma sonrası ikinci saatte sakrifiye edildi.

Elektron mikroskopisi ve patoloji değerlendirmeleri için erken dönem travma sonrası 1. günü, geç dönem ise travma sonrası 28. günü ifade etmektedir. Bu yüzden erken dönem

değerlendirmesi yapılacak 28 sıçan travmadan 1 gün sonra, geç dönem değerlendirilmesi yapılacak 28 sıçan ise travmadan 28 gün sonra sakrifiye edildiler. Geç dönemde sakrifiye edilecek deneklere 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde davranış analizi yapıldı.

Tablo 3.1. Denek grupları

	Biyokimya	EM		Patoloji	
	Erken	Erken	Geç	Erken	Geç
Kontrol (Sadece laminektomi)	6	4	4	3	3
Travma (Laminektomi+Travma+SFiv)	6	4	4	3	3
Minosiklin (Laminektomi+Travma+Minosiklin)					
intravenöz grup (iv)	6	4	4	3	3
intraperitoneal grup (ip)	6	4	4	3	3

EM: Elektron mikroskopi, L: Laminektomi, T:Travma, Mino: Minosiklin, iv: intravenöz, ip: intraperitoneal
SF: %0,9 NaCl

3.2. Minosiklin Hidrokloridin Hazırlanışı

Minosiklin hidroklorid (SIGMA, USA) toz, %0,9'luk NaCl içerisinde çözüldü. Açık sarı renkli, berrak bir çözelti elde edildi (39).

3.3. Anestezi

Bir gece önceden aç bırakılan deneklerde genel anestezi, 60 mg/kg Ketamin (Ketalar® Pfizer) ve 10mg/kg Xylazine (Rompun®-%2 Bayer) karışımının intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlanmıştır (12). Anestezi, denekler ağrıya yanıtız olacak ve deney sırasında spontan solunumlarına devam edecek şekilde ayarlanmış, gerektiğinde ek doz verilmiştir. Deney sırasında deneklerin vücut sıcaklıkları rektal ısı probu ile kontrol edilerek 37 C° sabit tutulmuştur. İşlem sırasında nasal maske ile 1.5 lt/dk. dan O₂ verilmiştir. Çalışma sonrası denekler normal oda ısısında (23-25 C°) tutulmuşlardır.

Sakrifikasyon ise derin anestezi altında kalpten kan alma ve intrakardiak perfüzyon-fiksasyon yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir (4, 12).

3.4. Cerrahi İşlem

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi Deney Hayvan Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Anesteziden sonra sırt bölgesi tıraş edilen sıçanlar ameliyat masasına yatırıldı. Povidin-iodine (Betadine®) ile yapılan lokal antisepsiden sonra, spinöz çıkıntıları ortalayarak orta hat insizyonu ile cilt-ciltaltı geçildi. Paravertebral kaslar künt diseksiyonla sıyrıldı. Torakal 9, 10, 11 vertebra laminaları ortaya konuldu ve mini rongeur yardımıyla torakal 9, 10 total laminektomi yapıldı. Omurilik ortaya konuldu (Şekil 3.1). Bu işlemler sırasında omurilikte travma olmamasına özen gösterildi ve teknik hata nedeniyle lezyon meydana gelen hayvanlar çalışma dışı bırakıldı. Cerrahi işlemler sırasında dura mater sağlam bırakıldı. Bu aşamadan sonra travma (Grup II) ve tedavi grubu deneklerinde (Grup III, IV) modifiye Allen ağırlık düşürme metodu ile omurilik yaralanması oluşturuldu (Şekil 3.2). Hemostazı takiben tabakalar katlar anatomisine uygun olarak kapatıldı.

3.5. Travmatik Omurilik Yaralanması Oluşturulması

Sıçanlar için özel olarak üretilmiş ucu künt, 5 gram ağırlığındaki çelik ağırlıklar, 10 cm uzunluğundaki özel yapım çelik ve cam borular içerisinden omuriliğe dik olacak şekilde düşürülerek omurilik yaralanması oluşturuldu (Şekil 3.3).

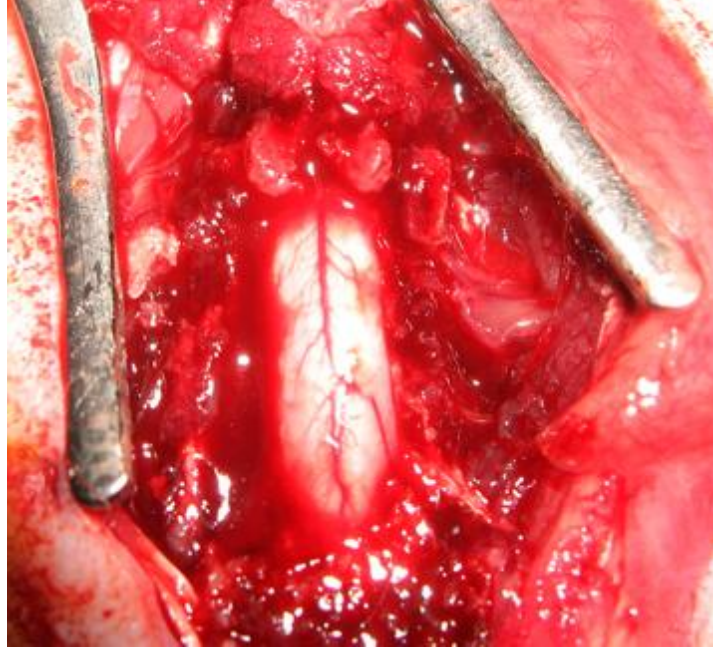
3.6. Kuyruk ven kanülasyonu ve ilaç uygulaması

Sıçanlarda ikisi lateralde ve biri de dorsal de olmak üzere toplam 3 tane kuyruk veni bulunmaktadır. Öncelikle kuyruk iyice temizlenmeli ve dezenfekte edilmelidir. Arkasından venlerin görünür hale gelmesi için kuyruk vücut seviyesinden aşağı sarkıtılmalı ve ısıtılmalıdır. Takiben ince uçlu bir iğne veya intraket yardımıyla kateterizasyon gerçekleştirilir. Sıvılar yavaş infüzyon şeklinde verilmeli ve genellikle 4 ml geçilmemelidir.

İntravenöz tedavi grubundaki (Grup III) sıçanların kuyruk venleri, travmadan hemen sonra 22-24 G intraket ile kanüle edildi (Şekil 3.4). Tedavi dozu (1mg/kg) yaklaşık 2 cc içerisinde (0,5 cc/100 gr doku) yavaş infüzyon olarak 4-5 dakikada verildi. Aynı şekilde

bu doz 24 saat boyunca, her dört saatte bir olmak üzere toplam 5 kez daha tekrarlandı (110).

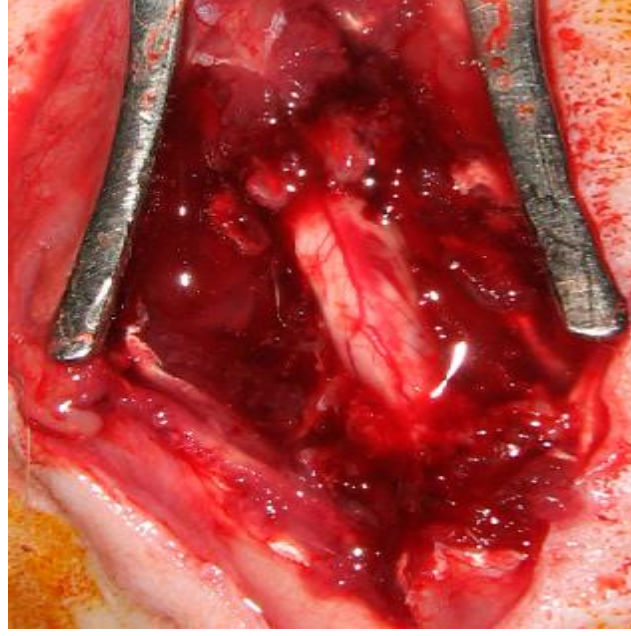
İntraperitoneal tedavi grubundaki (Grup IV) sıçanlara 90 mg/kg minosiklin hidroklorid, travmadan hemen sonra intraperitoneal olarak verildi. İdame doz (45 mg/kg), 12 saat arayla iki kez daha intraperitoneal olarak tekrarlandı.



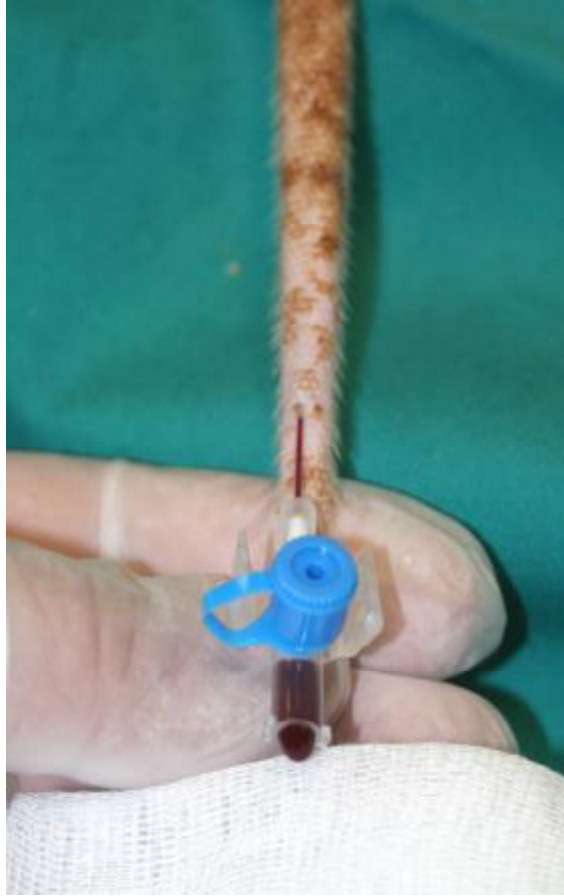
Şekil 3.1. Total laminektomi sonrasında sağlam omurilik dokusunun görüntüsü



Şekil 3.2. Allen ağırlık düşürme yöntemi ile omurilik travması oluşturulması



Şekil 3.3. Travma sonrası hasarlanmış omurilik dokusunun görüntüsü



Şekil 3.4. Dorsal kuyruk ven kanülasyonu

3.7. Biyokimyasal İnceleme Yöntemleri

Oksidatif stres parametreleri 1 ile 5 saat arasında tepe değerine ulaştığı için biyokimyasal incelemede kullanılacak denekler travma sonrası ikinci saatte kalpten kan alma yöntemiyle sakrifiye edildi (4). Her denekten kontüzyonlu bölüm merkezde kalacak şekilde omurilik dokusu çıkarıldı. Bu doku örnekleri daha önceden kodlanmış ependorfların içine konulup etrafına alüminyum folyo sarıldı ve azot tankının içine yerleştirildi. Azot tankı içinde laboratuvara ulaştırılan doku örnekleri analiz gününe kadar eksi 20°C’de donduruldu.

3.7.1. Doku Malondialdehit (MDA) Analizi

MDA organik bir oksidatif stres belirteçidir. Dokular 0,15 M potasyum klorür içinde cam-cam homojenizatör kullanılarak (1/10;w/v) homojenize edilmiştir. Doku örneklerinde MDA derişimi Buege ve Aust’un yöntemi kullanılarak saptanmıştır (111). Yöntem MDA’nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile yaptığı kompleksin kolorimetrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır. Homojenat örnekleri 0,13 mM TBA ve %7,5 (v/v) trikloroasetik asit (TCA) içeren ayıraç ile kaynar su banyosunda 15 dk. inkübe edilmiştir. Tepkime sonrası elde edilen örnekler soğutulduktan sonra, 1500xg’de santrifüj sonrası edilen süpernatantların absorbansı 535 nm’de örnek körüne karşı ölçülmüştür. MDA derişimleri molar ekstinksiyon katsayısı ($1,56 \times 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplanmış ve nmol/g doku olarak ifade edilmiştir.

3.7.2. Doku Glutatyon (GSH) Analizi

GSH, hücreleri serbest radikaller ve peroksitler gibi reaktif oksijen moleküllerinden koruyan antioksidan bir moleküldür.

Doku GSH derişimleri Ellman’ın doku sülfidril grup analizi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (112). Homojenat örneklerinin %1,67 metafosforik asit (w/v) çözeltisi ile deproteinizasyonu sonrası 4°C’de, 1500xg’de 10 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süpernatantın Ellman belirteci ile oluşturduğu renkli kompleksin absorbansları 412 nm’de köre karşı saptanmıştır (Shimadzu-1601). Glutatyon derişimleri standart eğri kullanılarak hesaplanmış ve $\mu\text{mol/g}$ doku olarak ifade edilmiştir.

3.8. Histopatolojik inceleme yöntemleri

Omurilik yaralanması sonrası beklenen histopatolojik değişiklikler travma sonrası 24. saatte daha belirgin hale geldiği için histopatolojik inceleme yapılacak denekler 24. saatte intraperitoneal ketamin enjeksiyonuyla derin anestezi altına alındı. Toraks duvarı, prosesus ksifoideus'dan başlanıp, kostaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve kranyal yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve perikardiyum kesildi. Serum fizyolojik ile perfüzyon yapıldıktan sonra elektron mikroskopisi bakılacak denekler paraformaldehit ile, ışık mikroskopisi bakılacak denekler ise formaldehit ile fikse edildi. Eski dorsal insizyon açılarak laminektomi sahasından yaklaşık 2 cm'lik omurilik örnekleri alındı.

3.8.1. Elektron Mikroskopisi (EM)

Elektron mikroskopik (EM) inceleme için alınan doku örnekleri 24 saat boyunca fosfat tamponlu %2,5 glutaraldehit ve %2 paraformaldehit solüsyonu içinde bekletildi. Daha sonra fosfat tamponlu %2 osmium tetraoksit (OsO_4) içinde 1 saat postfikse edilip, seri alkol uygulamaları ile dehidrate edildi. Araldehit ile bloklama yapıldıktan sonra ultratom (Reichert Supernova) ile yarı ince kesitler alınıp toluidin mavisi ile boyandı. Işık mikroskobu (Olympos CH-2) ile incelenen yarı ince kesitlerden uygun bölgeler tespit edilip aynı ultratom kullanılarak ince kesitler alındı. İnce kesitler bakır gridler üzerinde toplanıp %70 etil alkolle doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Hazır kesitler tranmisyon elektron mikroskobu (LEO 906E) ile histoloji bölümünce incelendi (4).

EM ile doku örneklerinin kantitatif doku değerlendirmesi için Kaptanoğlu ve arkadaşlarının tanımladığı "Deneysel Omurilik Yaralanmasında Ultrastrüktürel Yapı Skorumlama Yöntemi" kullanıldı (Tablo 3.2) (10). Bu skorlama sistemi için her örnekte hücre içi ödem ve nukleus değerlendirmesi için 20 adet nöron, aksonal değişikliklerin tespiti için 20 adet akson ve mitokondri değişikliklerinin tespiti için 20 adet mitokondri incelendi. Böylece her deneğe ve her gruba ait nümerik değerler elde edildi.

Tablo 3.2 Deneysel omurilik yaralanmasında ultrastrüktürel yapı skorlama yöntemi (10)

	Skor
İntrasitoplazmik ödem	
Yok	0
Hafif	1
Orta	2
Ağır(Hücre zarı defekti)	3
Nükleus	
Normal	0
Kümelenmiş kromatin	1
Seyrek kromatin	2
Ağır hasar	3
Aksonal Myelin	
Normal myelin tabakaları	0
Vezikülleşmiş myelin	1
Parçalanmış myelin tabakaları	2
Bal peteği görünümü ve ekstrüde veziküller	3
Genel Aksonal Skor	
Normal	0
Hafif derece ödem	1
Orta derece ödem	2
Ağır derece ödem ve yapının kaybı	3
Mitokondri	
Normal	0
Hafif derece ödem	1
Orta derece ödem	2
Ağır derece ödem ve yapının kaybı	3

3.8.2. Histopatoloji ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) Boyama

Spinal kord doku örnekleri %10'luk formalin içinde fikse edildikten sonra parafin bloklara gömüldü. Bütün doku örneklerinden multiple koronal kesitler alındı. Hematoksilen eosin ile boyanan kesitlerde ödem, kanama, aksonal dejenerasyon, damar duvarı değişiklikleri ve kistik vakuolizasyon bulguları aranırken, TUNEL immunohistokimya yapılan kesitler nöronal hücre ölümü ve apoptoz açısından değerlendirildi. Şişmiş, eozinofilik sitoplazmalı, piknotik nükleusu olan veya hiç nükleusu olmayan hücreler nekrotik olarak kabul edilirken, nükleer karyoreksis ve minimal sitoplazmik değişim gösteren TUNEL pozitif hücreler ise apoptotik hücreler olarak kabul edildi. Kesitler semikantitatif olarak skorlandı.

3.8.2.1. TUNEL Boyama ve Apoptoz Değerlendirilmesi

Spinal kord doku örneklerinde apoptozu göstermek için In Situ Cell Death Detection Kit (Roche) kullanıldı. Parafine gömülmüş örnekler deparafinize edildikten sonra değişik konsantrasyonlarda alkol ile rehidrate edildi. Daha sonra örneklerin permeabilitesini arttırmak amacıyla, doku örnekleri ilk olarak proteinaz K (20 mg/ml) ile oda ısısında 15 dakika boyunca muamele edildi. Endojen preoksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla oda ısısında 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit uygulanmasının ardından 75 ul equilibration tamponu (buffer) uygulandı. Dokular daha sonra nükleotidlerin 3'OH serbest ucuna polimerizasyonunu katalize ederek DNA kırılmış kenarlarının işaretlenmesi için TUNEL reaksiyon karışımıyla muamele edildi. Kesitler daha sonra 30 dakika boyunca Converter-POD ile inkübe edildi, daha sonra renk gelişimi için 12 dakika 3-Amino-9-etilkarbozol uygulandı. Sonrasında kesitler metil yeşil ile boyandı ve lam üzerine yerleştirildi. Her basamak arasında lamlar PBS ile yıkandı. Böylece kesitlerde nöronların nükleuslarında boyanma gösterildi.

Nükleer karyoreksis ve minimal sitoplazmik değişim gösteren TUNEL pozitif hücreler ise apoptotik hücreler olarak kabul edildi. Apoptotik indeks omurilik dokusundaki gri maddedeki apoptotik nöronların total nöron sayısına oranı ile hesaplandı. Sonuçlar yüzde olarak ifade edildi.

Buna göre boyanma saptanmayan kesitler Grade 0, %1-4 oranında apoptoz Grade 1, %5-24 arasındakiler Grade 2, %25-49 arasındakiler Grade 3 ve \geq %50 oranında apoptotik hücre boyanması gösterenler Grade 4 olarak ifade edildi.

3.9. Davranış Analizi

Deneklerin travmatik omurilik yaralanması sonrası 1, 7, 14, 21, 28. günlerde nörolojik durumlarını değerlendirmek amacıyla Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) lokomotor değerlendirme ölçeği ve eğik düzlem değerleri kullanıldı (35, 39, 113).

3.9.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Locomotor Değerlendirme Ölçeği

BBB ölçeği, deneklerin arka ayak eklem hareket fonksiyonlarının, adımlama yeteneklerinin, trunkal stabiliteilerinin ve ön-arka ayak koordinasyonlu adımlama yeteneklerinin ölçüldüğü 22 birimli bir ölçektir (Tablo 3.3).

Her test yaklaşık 4 dakika sürer ve birbirinden bağımsız iki ayrı gözlemci tarafından puanlamalar yapılır. BBB değerlendirilmesi yapılmadan önce, 5 gün boyunca denekler testin yapılacağı kaydırmaz zeminli açık alanda günde beş dakika serbest bırakılırlar. Bu deneklerin değerlendirme sonucunu negatif etkileyebilecek olan korku ve stres faktörünün minimuma indirilmesi için gerekli bir egzersizdir ve her değerlendirme öncesinde yapılmalıdır (113).

3.9.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi

Eğik düzlem değerlendirilmesi –yukarı doğru ve aşağı doğru- deneklerin ayak kuvvetini gösteren önemli bir testtir. Eğik düzlem değerlendirilmesinde, deneklerin eğik bir düzlem üzerine yatay pozisyonda yerleştirilmesinden sonra, düzlemin zeminle olan açısı zamanla beşer derece artırılır. Deneğin beş saniye süresince devrilmeden durabildiği en yüksek açı, o deneğin eğik düzlem derecesi olarak belirlenir (35, 39).

Tablo 3.3 Basso-Beattie-Bresnahan lokomotor değerlendirme ölçeği ve tanımları (113)

0	Hiçbir arka ayak hareketi gözlenmiyor
1	Bir veya iki eklemdede kısıtlı hareket, genellikle kalça ve/veya diz eklemi
2	Bir eklemde geniş hareketi veya bir eklemde geniş hareketi ve diğer eklemde kısıtlı hareketi
3	İki eklemdede geniş hareket
4	Arka ayakların her üç eklemde de kısıtlı hareket
5	İki eklemdede kısıtlı hareket ve üçüncü eklemde geniş hareket
6	İki eklemdede geniş hareket ve üçüncü eklemde kısıtlı hareket
7	Arka ayakların her üç eklemde de geniş hareket
8	Ağırlık taşımaksızın süpürme hareketi yapmak veya ağırlık taşımaksızın ön pençenin plantar yüzünün yere teması
9	Sadece durma esnasında ağırlık taşıyan pençenin plantar yüzünün yere teması veya nadiren, sıkça veya sürekli ağırlık taşıyan pençenin dorsal yüzünün yere teması ve plantar yüzün yere temas etmemesi
10	Nadiren ağırlık taşıyan plantar adımlar, ön-arka ayak koordinasyonu mevcut değil
11	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve ön-arka ayak koordinasyonu mevcut değil
12	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve nadir ön-arka ayak koordinasyonu
13	Sık-sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar ve sık ön-arka ayak koordinasyonu
14	Sürekli ağırlık taşıyan plantar adımlar, sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve hareket esnasındaki (yere ilk temas ve ayağı yerden kaldırma aşamasında) baskın pençe hareketinin rotatuar olması (içe veya dışa) veya sıkça plantar adımlama, sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve nadiren dorsal adımlama
15	Sürekli plantar adımlama ve sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ayak parmak temizlemesi yok veya ilerlerken nadiren ayak parmak temizlemesi mevcut
16	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas sırasında baskın pençe pozisyonu yere paralel iken kaldırma esnasında rotatuardır

Tablo 3.3 Devam

17	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paraleldir
18	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sürekli ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas sırasında baskın pençe pozisyonu yere paralel iken kaldırma esnasında rotatuardır
19	Sürekli plantar adımlama ve duruş esnasında sürekli ön-arka ayak koordinasyonu ve ilerlerken sıkça ayak parmak temizlemesi mevcut, ilerlerken yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paraleldir ve kuyruk genellikle veya her zaman aşağıdadır
20	Sürekli plantar adımlama ve sürekli koordine duruş, sürekli ayak parmak temizlemesi, yere ilk temas ve kaldırma esnasında baskın pençe pozisyonu yere paralel, kuyruk sürekli havada ve trunkal instabilite mevcut
21	Sürekli plantar adımlama ve koordine duruş, sürekli ayak parmak temizlemesi, duruş esnasında baskın pençe pozisyonu yere paralel, kuyruk sürekli havada ve trunkal stabilite mevcut

Kısıtlı: Eklem hareket açıklığının yarısından daha az gerçekleşen parsiyel eklem hareketi

Geniş: Eklem hareket açıklığının yarısından daha fazla gerçekleşen eklem hareketi

Süpürme Hareketi: Arka ayakların ritmik hareketi (Her üç eklem önce ekstansiyonda, sonra tamamen fleksiyonda ve sonra tekrar ekstansiyonda), denek genelde sıralar, pençenin plantar yüzü yere temas edebilir veya etmeyebilir, arka ayaklar hareket esnasında ağırlık taşımaz

Ağırlık Taşımaması: Pençenin plantar yüzünün yere teması esnasında arka ayak ekstansör kaslarında kontraksiyon gözlenmemesi veya arka uyluğunu kaldıramaması

Ağırlık Taşıma: Pençenin plantar yüzünün yere teması esnasında arka ayak ekstansör kaslarında kontraksiyon gözlenmesi veya arka uyluğunu kaldırabilmesi

Plantar Adımlama: Pençenin ağırlık taşımakla birlikte yere plantar yüzle teması, takiben arka ayakların ileriye hareketi ve tekrar pençenin yere plantar yüzle teması

Dorsal Adımlama: Yürüyüş siklusunun herhangi bir aşamasında ağırlığın pençenin dorsal yüzüyle taşınması

Ön-arka ayak koordinasyonu :Yere temas eden her ön ayak adımı için bir arka ayağın yerden kaldırılması veya tam tersi

Nadiren: ≤%50

Sık: %51-94

Sürekli: %95-100

3.10. İstatistiksel Değerlendirme

Deneyde elde edilen değerler SPSS 11.5 programı kullanılarak analiz edildi. Grupların parametrik test ön şartlarına uyanlarına tek yönlü parametrik varyans analizi (ANOVA), şartları sağlamayanlara parametrik olmayan varyans analizi -Kruskall Wallis testi- uygulandı. Gruplar arasında fark olup olmadığını bulmak için parametrikte Tukey testi, non parametrikte ise Dunn testi uygulandı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Oranların karşılaştırılması için Z testi yapıldı. $Z > 1,96$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal İnceleme Sonuçları

4.1.1. Doku MDA düzeyleri

Doku MDA düzeyi sonuçları kontrol, travma, minosiklin (iv) ve minosiklin (ip) grupları için sırasıyla ortalama 22.45, 46.21, 26.21 ve 28.96 nmol/gr yaş doku olarak bulundu. Çalışmamızda travma grubu ile minosiklin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak çok anlamlı ($p<0,001$) bulunurken, intravenöz ve intraperitoneal minosiklin verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.1).

Doku MDA düzeyleri ele alındığında, minosiklin tedavisinin akut omurilik yaralanmasının seyrini olumlu yönde etkilediği tespit edildi. Ayrıca bu sonuçlar, intravenöz tedavinin, intraperitoneal yol ile karşılaştırıldığında lipid peroksidasyonu üzerine olumlu bir etkisinin olmadığını gösterdi (Şekil 4.1).

Tablo 4.1. Doku MDA analiz sonuçları

Doku MDA(nmol/gr yaş doku)	Denek Sayısı	Ort±SS	Min	Max	Median
Kontrol	6	22,45±2,950	18,70	26,00	21,80
Travma	6	46,21±5,527	38,30	53,90	47,15
Minosiklin (iv)	6	26,21±7,358	18,30	38,10	24,50
Minosiklin (ip)	6	28,96±6,777	20,50	37,60	27,00

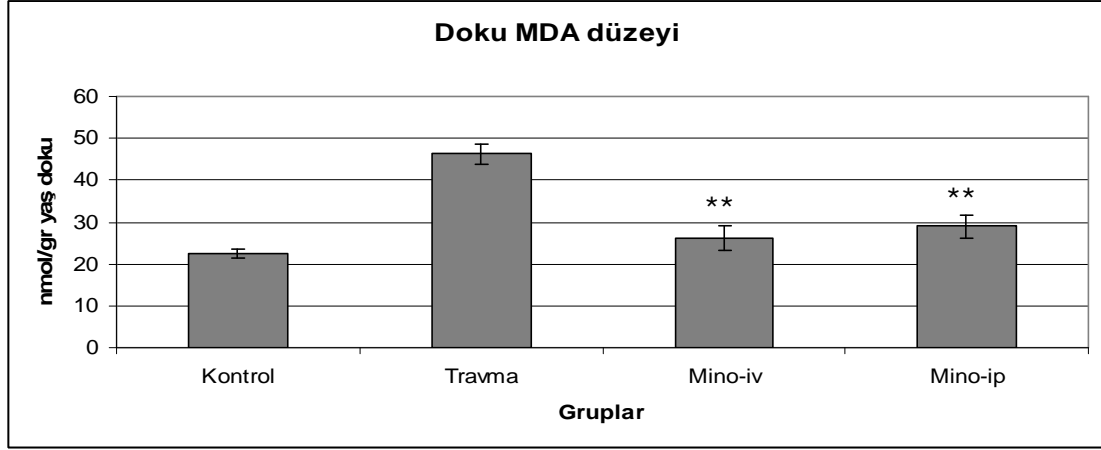
Ort: ortalama SS: Standart sapma Min: minimum Max:Maximum Median: Ortanca

4.1.2. Doku GSH düzeyleri

Doku GSH düzeyi sonuçları kontrol, travma, minosiklin (iv) ve minosiklin (ip) grupları için sırasıyla ortalama 9.97, 2.59, 7.61 ve 7.56 $\mu\text{mol/gr}$ yaş doku olarak bulundu. Travma grubu ile minosiklin grupları arasındaki fark istatistiksel olarak çok anlamlı ($p<0,001$)

bulunurken, intravenöz ve intraperitoneal minosiklin verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.2).

Doku GSH düzeyleri ele alındığında, minosiklin tedavisinin akut omurilik yaralanmasının seyrini olumlu yönde etkilediği tespit edildi.



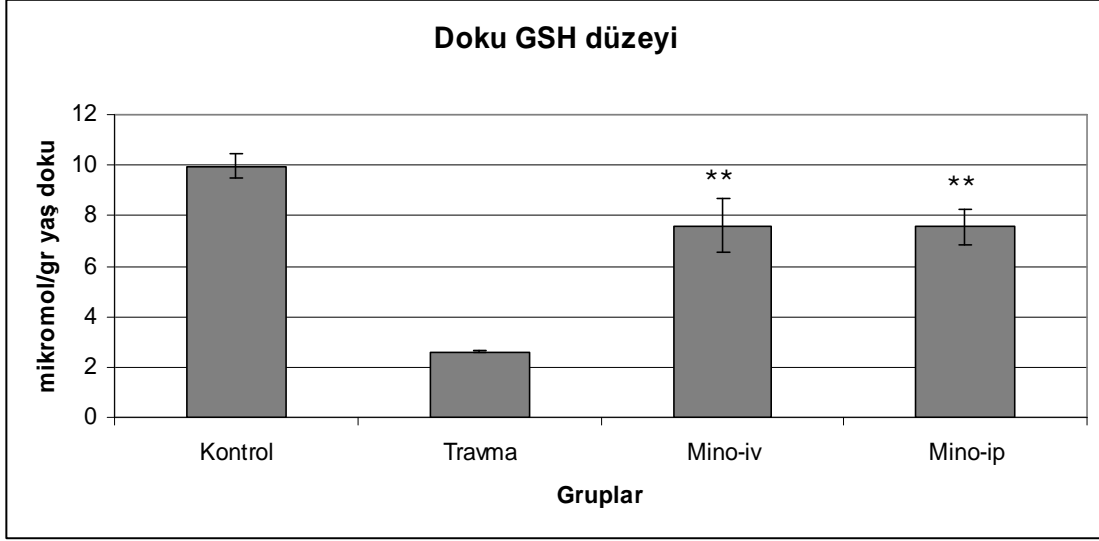
Şekil 4.1. Doku MDA düzeyi

Değerler ortalama değerleri, y hata çubukları ise standart hata değerlerini göstermektedir. **: $p<0,001$

Tablo 4.2 Doku GSH analiz sonuçları

Doku GSH($\mu\text{mol/gr}$ yaş doku)	Denek Sayısı	Ort \pm SS	Min	Max	Median
Kontrol	6	9,97 \pm 1,083	8,60	11,75	9,75
Travma	6	2,59 \pm 0,132	2,34	2,72	2,62
Minosiklin (iv)	6	7,61 \pm 2,571	5,26	12,00	7,04
Minosiklin (ip)	6	7,56 \pm 1,696	5,70	10,02	7,10

Ort: ortalama SS: Standart sapma Min: minimum Max:Maximum Median: Ortanca



Şekil 4.2. Doku GSH düzeyi

Değerler ortalama değerleri, y hata çubukları ise standart hata değerlerini göstermektedir. **: $p < 0,001$

4.2. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

4.2.1. Elektron mikroskopisi inceleme sonuçları

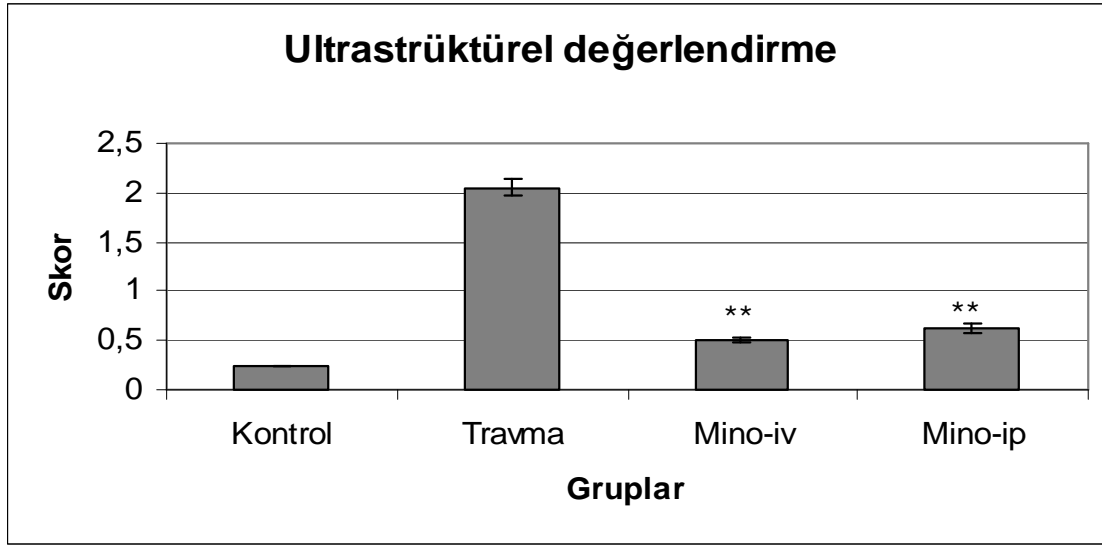
Ultrastrüktürel yapı skorlama yöntemi ile yapılan ölçümler sonucu kontrol, travma, minosiklin (iv) ve minosiklin (ip) grupları için elde edilen sonuçlar sırasıyla ortalama 0.25, 2.05, 0.51 ve 0.63 olarak bulundu. Elektron mikroskopik inceleme sonucunda kontrol grubu ve travma grubu ile diğer gruplar arasında yüksek derecede anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,001$). İntravenöz ve intraperitoneal minosiklin verilen gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$).

Sonuçta deneysel akut omurilik yaralanmasında intravenöz ve intraperitoneal verilen minosiklin tedavisinin ultrastrüktürel yapının korunmasında önemli derecede etkili olduğu tespit edildi (Tablo 4.3) (Şekil 4.3).

Tablo 4.3. Ultrastrüktürel skorlama

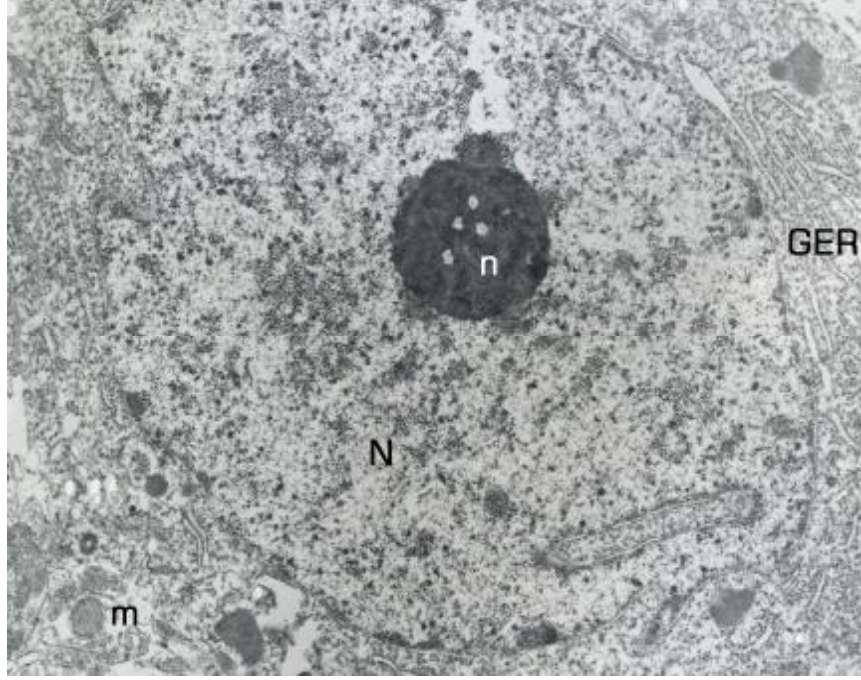
Ultrastrüktürel skorlama	Denek Sayısı	Ort±SS	Min	Max	Median
Kontrol	4	0,25±0,00	0,25	0,25	0,25
Travma	4	2,05±0,18	1,73	2,21	2,10
Minosiklin (iv)	4	0,51±0,09	0,44	0,61	0,49
Minosiklin (ip)	4	0,63±0,12	0,49	0,79	0,60

Ort: ortalama SS: Standart sapma Min: minimum Max:Maximum Median: Ortanca



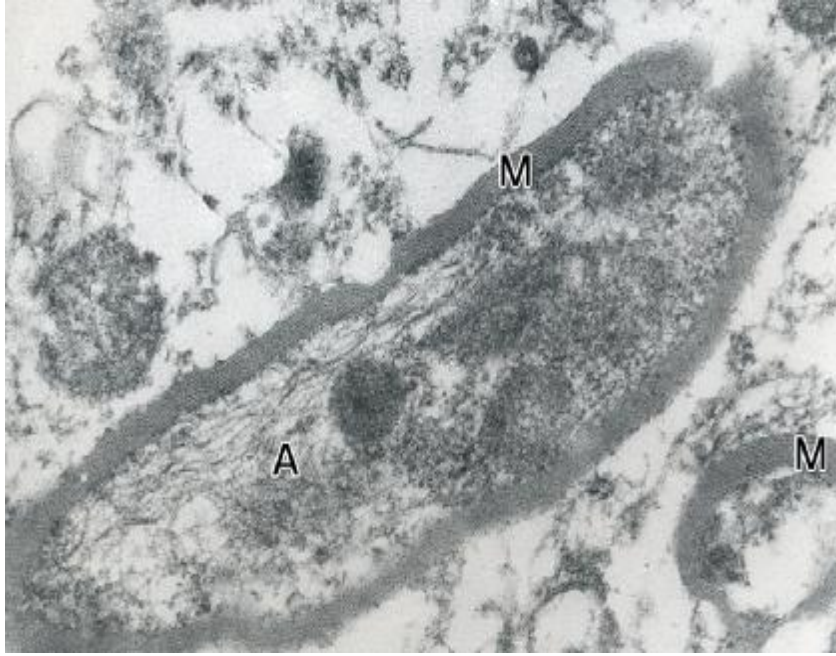
Şekil 4.3 Ultrastrüktürel değerlendirme

Değerler ortalama değerleri, y hata çubukları ise standart hata değerlerini göstermektedir. **: p<0,001



Şekil 4.4. EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)

Motor nöron nükleusu (N), nukleolusu (n), bol miktarda bulunan Nissl cisimcikleri (GER: Granüllü endoplazma retikulumu+serbest ribozomlar) ve mitokondriyonları ile normal yapıda görülüyor. (uranil asetat+kurşun sitrat, x4646 büyütme)



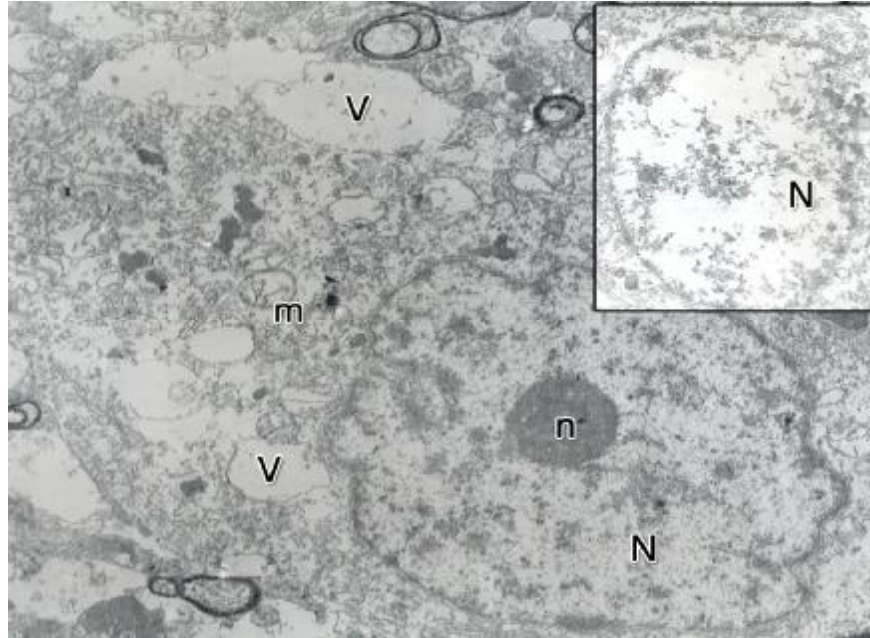
Şekil 4.5. EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)

Akson (A) miyelin kılıfı (M) ile normal yapıda görülüyor. (uranil asetat+kurşun sitrat, x21560 büyütme)



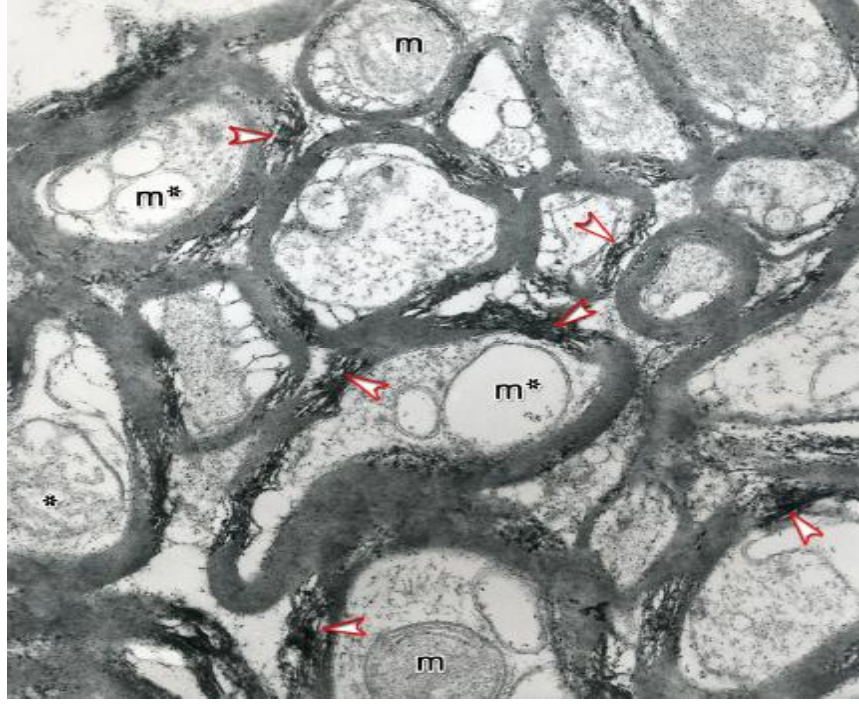
Şekil 4.6. EM incelemesi kontrol grubu (Grup I)

Kapiller: Endotel hücresinin nükleusu (N), nükleolusu (n) ile normal yapıda görülüyor. Altta bulunan bazal membran (asteriks) ve kapiller lümeni(L) de normal yapıda bulunuyor. (uranil asetat+kurşun sitrat, x10000 büyütme)



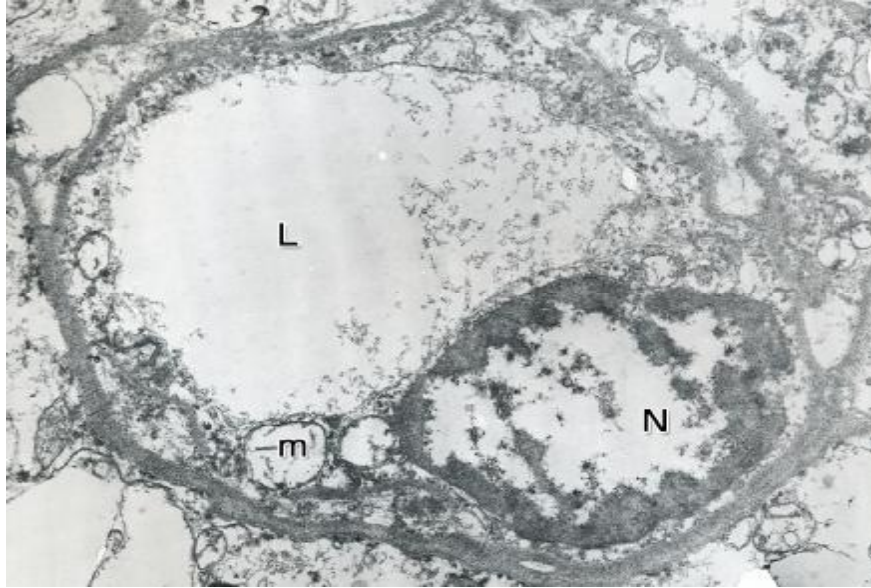
Şekil 4.7. EM incelemesi travma grubu (Grup II)

Motor nöron nükleusunun (N), sınırlarında düzensizlik, kromatinde erime (karyolizis) (üst resim), SRP'de (small ribosome particule) kayıp, mitokondriyonlarında (m) kristalizis, vakuolizasyon görülmekte. (uranil asetat+kurşun sitrat, x3597 büyütme, üst resim x4646 büyütme)



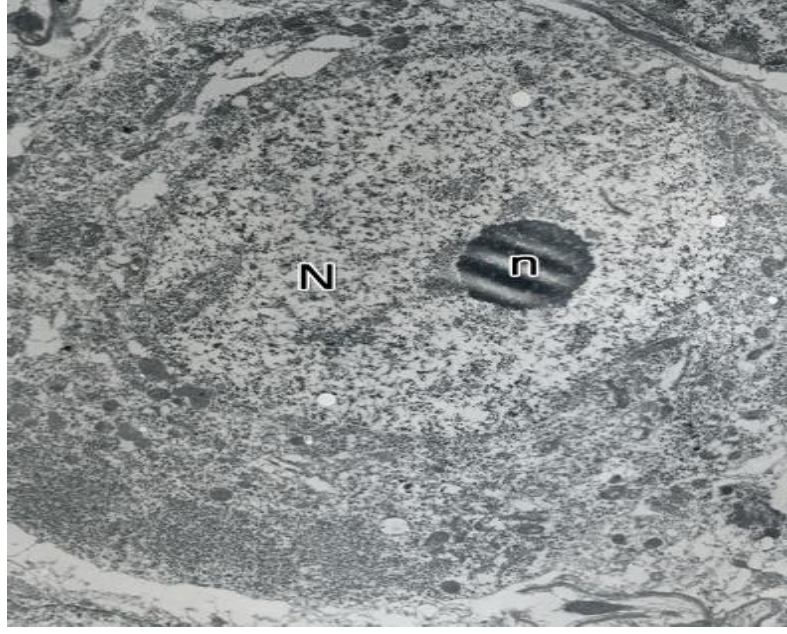
Şekil 4.8. EM incelemesi travma grubu (Grup II)

Akson (A) mitokondriyonlarında (m^{*}) kristalizis ve şişme son derece belirgin. Miyelin kılıflarında (M) ise dejeneratif değişiklikler görülüyor. . (uranil asetat+kurşun sitrat, x3597 büyütme, üst resim x12930 büyütme)



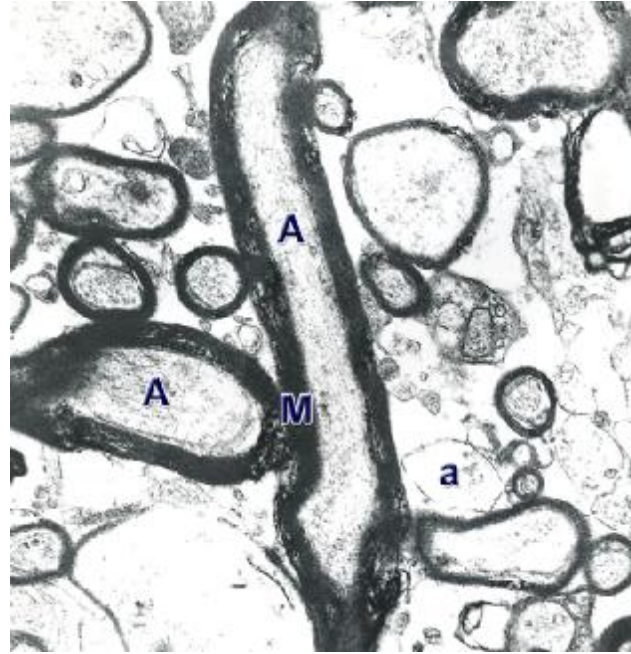
Şekil 4.9. EM incelemesi travma grubu (Grup II)

Kapiller endotel hücre nükleusunda (N) dejenerasyon ve mitokondriyonlarında (m) kristalizis ve şişme ile dejenerasyon yapıda görülüyor (uranil asetat+kurşun sitrat, x6000 büyütme)



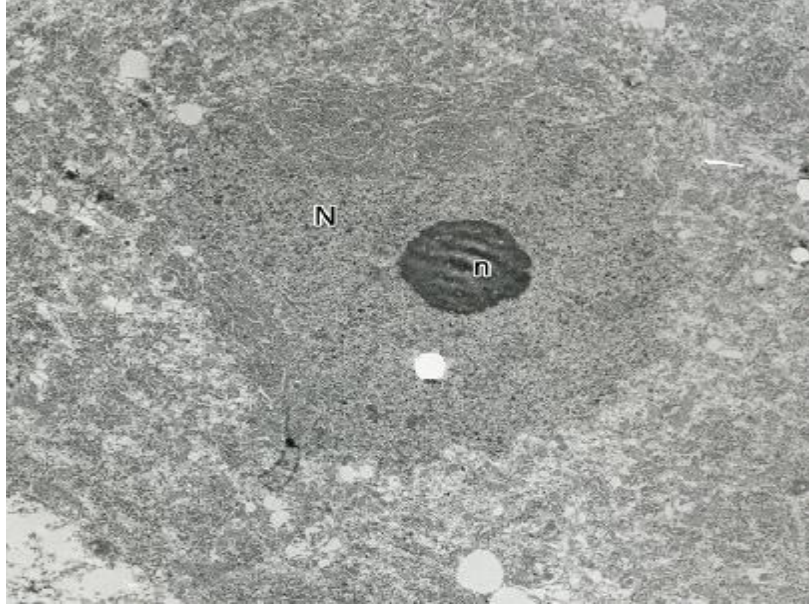
Şekil 4.10. EM incelemesi mino-iv grubu (Grup III)

Motor nöron nükleusu (N), nükleolusu (n) ve organelleriyle normale yakın yapıda görülüyor. (uranil asetat+kurşun sitrat, x2784 büyütme)



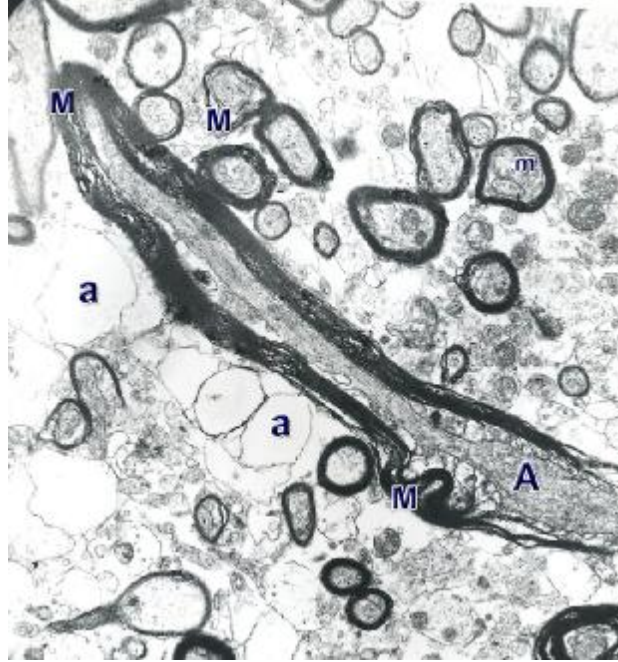
Şekil 4.11. EM incelemesi mino-iv grubu (Grup III)

Çoğu akson (A) myelin kılıfları (M), aksoplazması ve mitokondriyonları (m) ile normal yapıda gözlemlendi. Arada bulunan myelinsiz sinir liflerinin (a) de çoğunluğu normal yapıda bulunurken, bazı sinir lifleri dejenere yapıda görüldü. (uranil asetat+kurşun sitrat, x12930 büyütme)



Şekil 4.12. EM incelemesi mino-ip grubu (Grup IV)

Motor nöron nükleusunun (N) şeklinde düzensizlik ve kromatininde yoğunlaşma, sitoplazmada vakuolizasyon (uranil asetat+kurşun sitrat, x2156 büyütme)



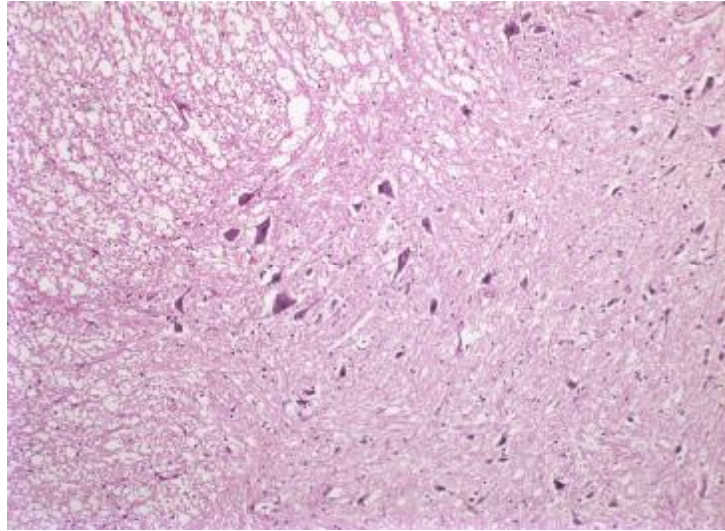
Şekil 4.13. EM incelemesi mino-ip grubu (Grup IV)

Beyaz cevherde çoğu akson aksoplazma, myelin kılıfı ve mitokondriyonları ile normal yapıda gözlenirken bazı aksonların myelin kılıfında açılmalar (M), katlanmalar ve kopup ayrılmalar(M) görüldü. Mitokondriyonlarında(m) dejenerasyon (kristalizis) görüldü. Myelinli sinir liflerinde bazı aksonlarda dejeneratif değişiklikler gözlenirken, myelinsiz sinir liflerinin(a) çoğu dejenere yapıda bulundu. (uranil asetat+kurşun sitrat, x7750 büyütme)

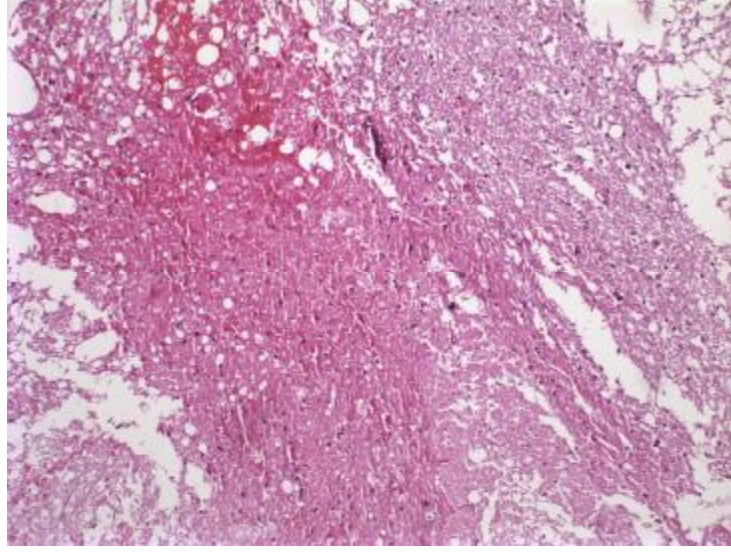
4.2.2. Işık Mikroskopisi İnceleme Sonuçları

Erken dönemde -travma sonrası 1. gün- yapılan incelemelerde kontrol grubunda normal histolojik yapı görüldü (Şekil 4.14). Travma grubunda, özellikle gri cevherde daha belirgin olmak üzere diffüz hemoraji, yaygın ödem ve fokal nekroz alanları görüldü (Şekil 4.15). Beyaz cevherde ise belirgin histiyosit ve yangısal hücre infiltrasyonu ile aksonal hasar dikkat çekti. Tedavi gruplarında –iv ve ip- travma grubuna göre daha az kanama alanları ve daha az ödem görüldü. Yangısal hücre infiltrasyonu ise belirgin olarak çok daha hafifti (Şekil 4.16). Tedavi gruplarının kendi aralarında yapılan karşılaştırılmalarında belirgin bir fark tespit edilmedi.

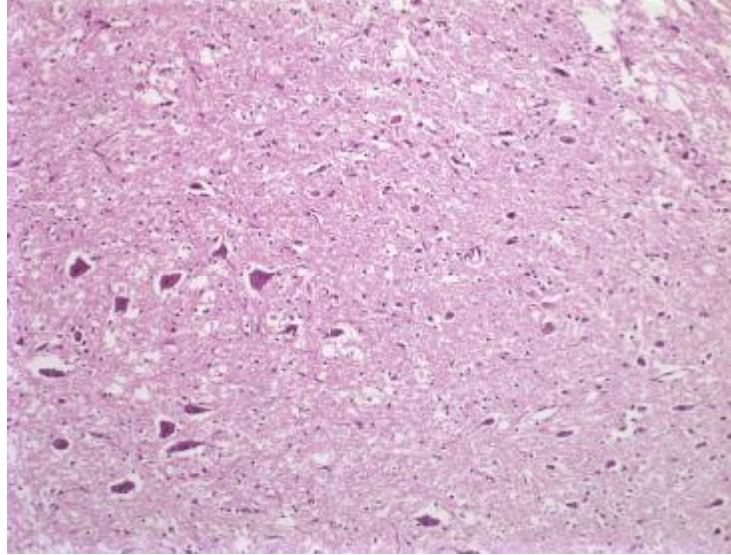
Geç dönemde –travma sonrası 28. gün- yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda kontrol grubunda herhangi bir patolojiye saptanmadı. Normal histolojik yapı görüldü. Travma grubunda ise nekroz, nöron kaybı ve kistik vakuoler dejenerasyon dikkat çekti. Vasküler trombüs tespit edildi. Tedavi gruplarında travma grubu ile karşılaştırıldığında daha az kaviteasyon saptandı. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında anlamlı bir fark bulunmadı.



Şekil 4.14. Kontrol grubu. (H&E X100)



Şekil 4.15. Travma grubu. (H&E X100)



Şekil 4.16. Tedavi grubu. (H&E X100)

4.2.3. TUNEL boyama ve apoptoz değerlendirme sonuçları

Yapılan TUNEL boyama sonucunda kontrol grubunda az sayıda TUNEL pozitif hücre izlenirken, travma grubunda çok sayıda TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 4.17).

Tedavi verilen gruplarda ise travma grubundan çok daha az TUNEL pozitif apoptotik hücre görüldü (Şekil 4.18, Şekil 4.19).

Erken dönemde yapılan boyamalar sonucunda, apoptotik indeks kontrol grubunda %1.33 saptanırken travma grubunda %73.33 olarak saptandı. Tedavi gruplarında ise iv ve ip gruplar için sırasıyla ortalama %10 ve %16,66'lık değerler elde edildi. Kontrol grubu ile diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($Z>1,96$). Benzer şekilde travma grubu ile kontrol ve tedavi grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($Z>1,96$). Bununla beraber, tedavi grupları arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı ($Z<1,96$).

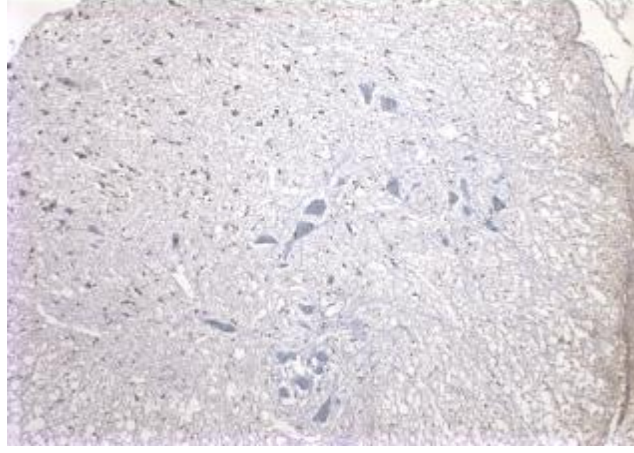
Geç dönemde yapılan boyamalarda da erken dönemle benzer sonuçlara ulaşıldı. Apoptotik indeks değerleri kontrol, travma, minosiklin (iv) ve minosiklin (ip) grupları için sırasıyla %1, %70, %3 ve %3,66 olarak bulundu. Travma grubu ile kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı istatistiksel fark varken ($Z>1,96$), tedavi gruplarının kendi aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Grupların erken ve geç dönem sonuçları karşılaştırıldığında, intravenöz ve intraperitoneal tedavi grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol ve travma grupları arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı (Tablo 4.4).

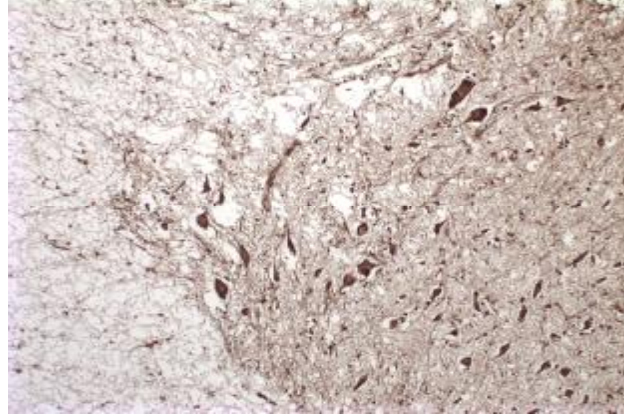
Sonuç olarak ortalama apoptotik indeks değerleri göz önüne alındığında minosiklin tedavisinin, hem erken hem de geç dönem apoptozu azalttığı ve bu antiapoptotik etkinin geç dönemde daha belirgin olduğu tespit edildi (Şekil 4.20).

Tablo 4.4. Apoptotik indeks (%)

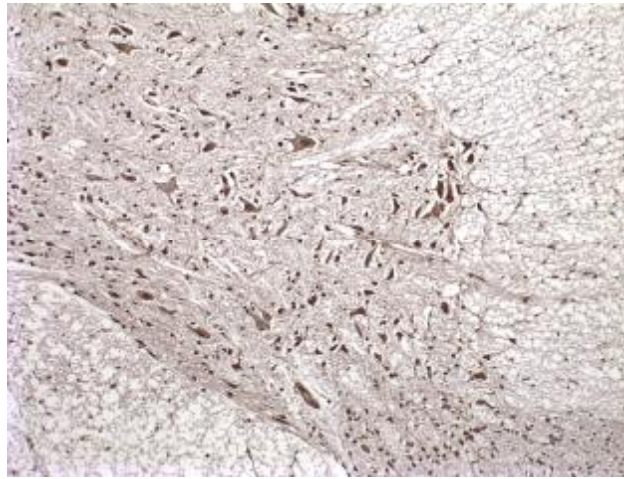
	Erken	Geç	Z değeri
Kontrol	1,33	1	0,298
Travma	73,33	70	1,835
Minosiklin (iv)	10	3	2,211
Minosiklin (ip)	16,66	3,66	3,307



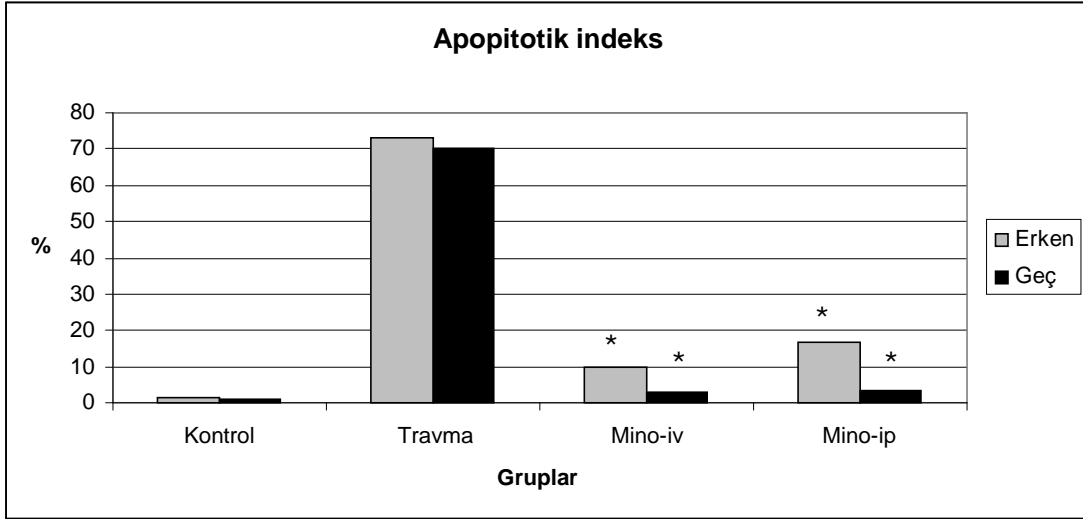
Şekil 4.17. Düşük apoptotik indeks (TUNEL X100) –Kontrol grubu-



Şekil 4.18. Yüksek apoptotik indeks. (TUNEL X100) –Travma grubu-



Şekil 4.19. Orta apoptotik indeks. (TUNEL X100) –Tedavi grubu-



Şekil 4.20. Apoptotik indeks

Değerler ortalama yüzde değerleri göstermektedir. *: $Z > 1,96$

4.3. Davranış Analizi Sonuçları

4.3.1. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) Lokomotor Değerlendirme Ölçeği

Travmadan sonraki 1. gün yapılan ölçümlerde her 3 gruptaki deneklerin hemen hepsinin arka ayaklarında ileri derecede paralizi görüldü. Takip eden haftalarda arka ayak fonksiyonlarında parsiyel gelişmeler kaydedildi (Tablo 4.5) (Şekil 4.21). Minosiklin tedavisi alan grup, travma grubu ile karşılaştırıldığında 7. günden başlayıp çalışmanın sonuna kadar devam eden, istatistiksel olarak anlamlı bir düzelme kaydetti ($p < 0,05$). İntravenöz ve intraperitoneal gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$).

4.3.2. Eğik Düzlem Değerlendirmesi

Eğik düzlem değerlendirmelerinde denekler, yukarı ve aşağı eğimlere doğru test edildiler. Yukarı çıkma testinde daha çok ön ayaklar test edilirken, aşağı inme testinde ise arka ayak koordineli motor fonksiyonlar test edildi. Yukarı çıkma testinde minosiklin grupları ve travma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 4.6). Aşağı inme testinde ise minosiklin grupları ve travma grupları arasında 1. günden başlayarak tüm çalışma boyunca devam eden, anlamlı istatistiksel fark saptandı ($p < 0,05$)

(Tablo 4.7). Minosiklin gruplarının kendi aralarındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.22, Şekil 4.23) .

Davranış analizi sonuçlarına göre, minosiklin tedavisinin omurilik yaralanmasına bağlı bozulan arka ayak fonksiyonlarını olumlu yönde etkilediği tespit edildi.

Tablo 4.5. BBB değerleri

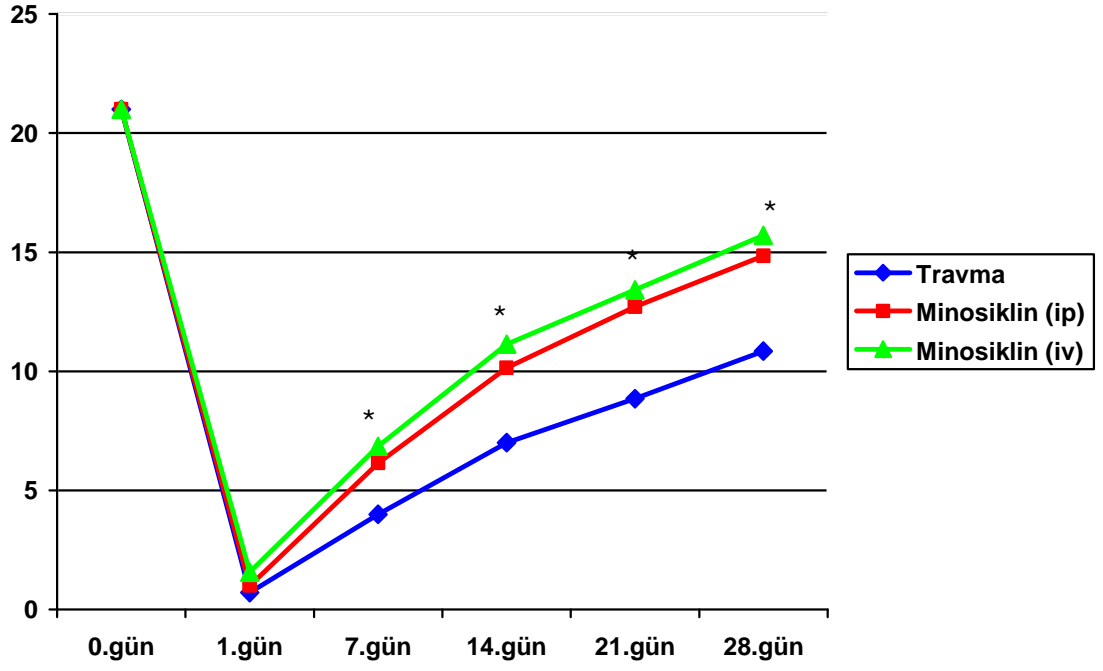
	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	0,71±0,285	4,00±0,377	7,00±0,308	8,85±0,340	10,85±0,340
Median	1,00	4,00	7,00	9,00	11,00
Min-Max	0,00-2,00	3,00-5,00	6,00-8,00	8,00-10,00	10,00-12,00
MİNOSİKLİN(iv)					
Ort±SH	1,57±0,202	6,85±0,340	11,14±0,340	13,42±0,297	15,71±0,184
Median	2,00	7,00	11,00	14,00	16,00
Min-Max	1,00-2,00	6,00-8,00	10,00-12,00	12,00-14,00	15,00-16,00
MİNOSİKLİN(ip)					
Ort±SH	1,00±0,218	6,14±0,340	10,14±0,260	12,71±0,359	14,85±0,340
Median	1,00	6,00	10,00	12,00	15,00
Min-Max	0,00-2,00	5,00-7,00	9,00-11,00	12,00-14,00	14,00-16,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

Tablo 4.6. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri

	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	48,57±2,608	54,28±2,542	58,57±2,369	62,14±2,142	64,28±2,542
Median	50,00	55,00	60,00	65,00	65,00
Min-Max	35,00-55,00	40,00-60,00	45,00-65,00	50,00-65,00	50,00-70,00
MİNOSİKLİN(iv)					
Ort±SH	53,57±0,922	59,28±0,714	62,85±1,010	66,42±0,922	68,97±0,922
Median	55,00	60,00	65,00	65,00	65,00
Min-Max	50,00-55,00	55,00-60,00	60,00-65,00	65,00-70,00	65,00-70,00
MİNOSİKLİN(ip)					
Ort±SH	51,42±2,608	57,14±1,010	61,42±0,922	65,71±2,020	67,85±1,010
Median	50,00	55,00	60,00	70,00	70,00
Min-Max	40,00-60,00	55,00-60,00	60,00-65,00	60,00-70,00	65,00-70,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

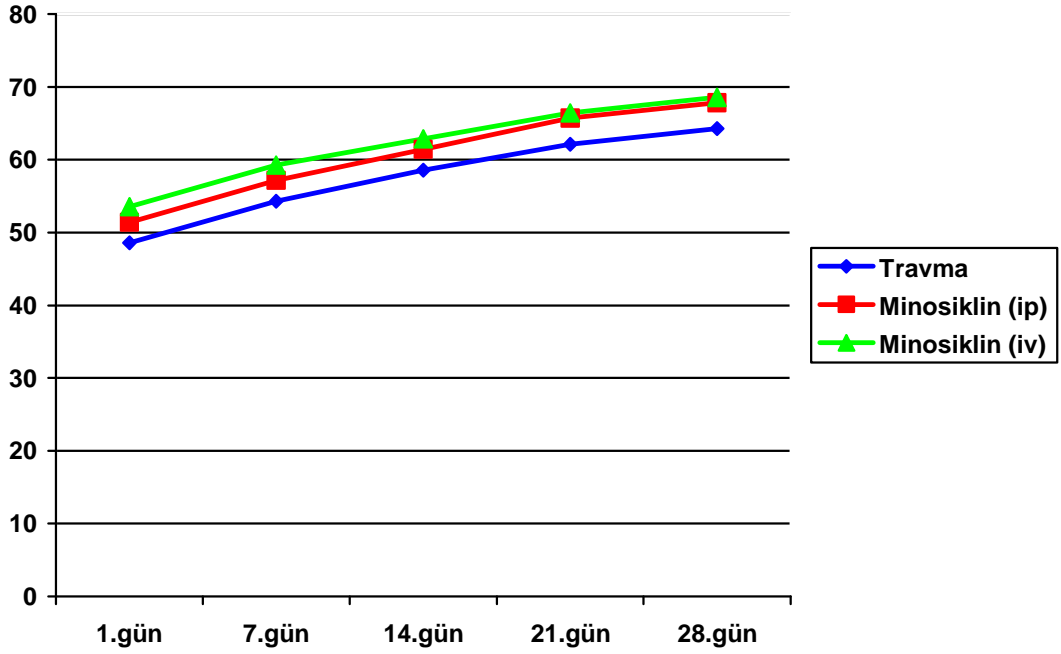
Tablo 4.7. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri

	1. gün	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
TRAVMA					
Ort±SH	12,85±1,844	17,14±2,640	21,42±2,102	26,42±2,102	31,42±2,608
Median	10,00	15,00	20,00	25,00	30,00
Min-Max	10,00-20,00	10,00-30,00	15,00-30,00	20,00-35,00	25,00-40,00
MİNOSİKLİN(iv)					
Ort±SH	41,42±0,922	46,42±0,922	51,42±0,922	57,14±1,010	62,85±1,010
Median	40,00	45,00	50,00	55,00	65,00
Min-Max	40,00-45,00	45,00-50,00	50,00-55,00	55,00-60,00	60,00-65,00
MİNOSİKLİN(ip)					
Ort±SH	40,00±2,182	44,28±1,700	49,28±2,020	54,28±2,020	59,28±2,020
Median	40,00	45,00	50,00	55,00	60,00
Min-Max	30,00-50,00	35,00-50,00	40,00-55,00	45,00-60,00	50,00-65,00
Ort: ortalama	SH: Standart hata	Min: Minimum	Max: Maximum	Median: Ortanca	

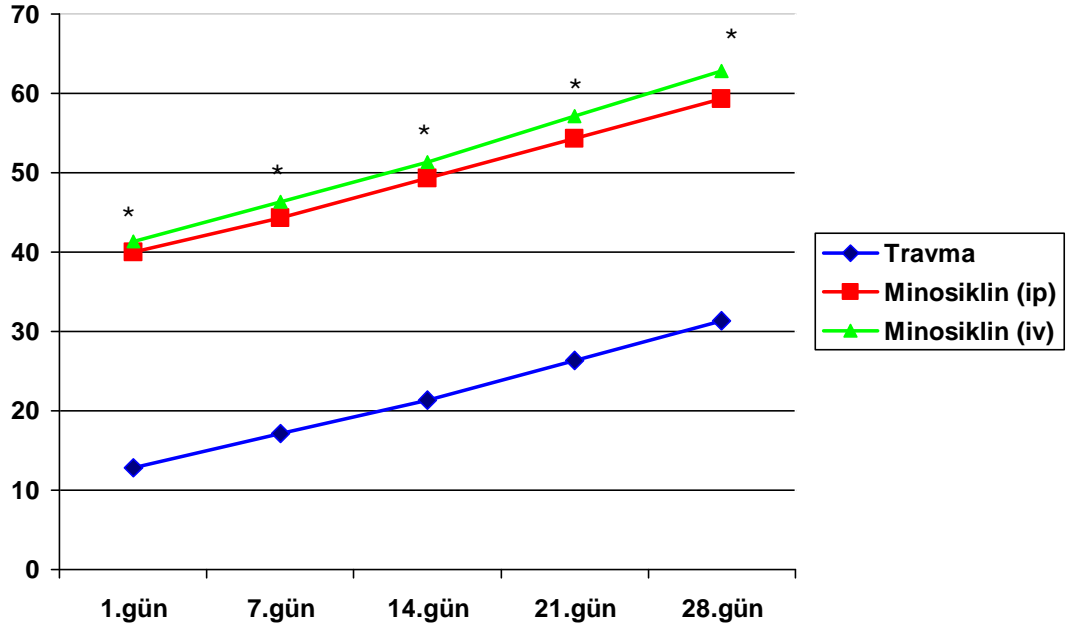


Şekil 4.21. BBB skoru

*: p<0,05



Şekil 4.22. Eğik düzlem –yukarı doğru- değerleri



Şekil 4.23. Eğik düzlem –aşağı doğru- değerleri

*: $p < 0,05$

5. TARTIŞMA

Son yıllarda omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi üzerine yapılan çok sayıda çalışma, ilk kez 1914 yılında Allen tarafından ortaya atılan iki basamaklı mekanizma kavramının - birincil ve ikincil yaralanma- önemini bir kez daha vurgulamıştır. O tarihten günümüze tüm çabalara rağmen yaralanmış omuriliğin rejenerasyonu insanda henüz başarılammıştır (5-17, 48-50, 53).

Birincil yaralanma, santral sinir sisteminde genel olarak travma anında ortaya çıkan ve nöral dokunun kompresyon, kontüzyon ve/veya laserasyonu ile sonuçlanan duruma verilen addır. Travmanın şiddetiyle orantılı olarak ortaya çıkan kaçınılmaz bir süreçtir. Birincil yaralanma ile ilgili yapılabilecekler ancak koruyucu yöntemlerdir. Eğitim ile kazaların meydana gelmesini engellemek ve yaralanma sırasında aktif ve pasif güvenlik önlemlerinin alınmasıyla vücudun stabilizasyonunu sağlamak birincil yaralanmanın şiddetini düşürebilir (2, 3, 53).

İkincil yaralanma ise birincil yaralanmayı takiben dakikalar, saatler içinde başlayıp haftalarca devam eden bir süreçtir. Vasküler bozukluklar, hemoraji, iskemi, metabolik yetmezlik, eksitotoksisite, serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu, sitokin salınımı ve inflamasyon gibi mekanizmaları içerir. Bu mekanizmalar nöronlarda ve oligodendrositlerde nekroza, apoptoza, demyelinizasyona ve aksonal hasara neden olurlar (53, 98). Bu nedenle, ikincil yaralanmanın önlenmesi tedavi denemelerinin asıl hedefini oluşturmaktadır (4-15, 114).

Çalışmamızda kullandığımız minosiklin, ülkemizde preparatı bulunmamasına rağmen, yaklaşık 35 yıldır ABD ve İngiltere'de akne vulgaris, rozasea ve romatoid artrit tedavisinde kullanılmakta olan yarı sentetik, ikinci kuşak bir tetrasiklin türevidir (19). İleri derecede lipofilik olan bu küçük (495 kDa) molekül kan-beyin bariyerini kolaylıkla geçebilmektedir. Minosiklinin yarılanma ömrü diğer tetrasiklerden daha uzun olmakla birlikte beyin omurilik sıvısına (BOS) geçişi de daha fazladır (115). Hepatotoksisite, serum hastalığı ve sistemik lupus eritematozus bildirilen en ciddi yan etkileri olmakla birlikte görülme sıklıkları çok nadirdir (19). Antimikrobiyal etkinliğinin yanısıra son zamanlarda

antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkilerinin de ortaya çıkmasıyla, nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yeni bir umut olmuştur (19, 38).

1998 yılında Yrjanheikki ve arkadaşları minosiklini ilk olarak, deneysel bir beyin iskemisi modelinde denemişlerdir (20). Araştırmacılar minosiklini, iskemik beyin dokusundan salınan bir takım inflamatuvar mediatörlerin salınımını ve aktivitesini inhibe ettiği için seçtiklerini belirtmişlerdir. Bu araştırmadan sonra minosiklin çok popüler olmuş ve hemorajik ve iskemik inme, MS, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, ALS, Alzheimer hastalığı, travmatik beyin hasarı ve travmatik omurilik yaralanması modellerinde kullanılmıştır (21-42). Bu çalışmaların büyük bir kısmında da minosiklinin nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.

Literatürde az sayıda olmakla birlikte minosiklinin etkinlik göstermediği çalışmalara ait yayınlar da bulunmaktadır. Saganova ve arkadaşları balon kompresyon tekniği ile oluşturdukları deneysel omurilik yaralanma modelinde minosiklinin, histopatolojik düzelme sağlamadığı gibi fonksiyonel bir düzelme de sağlamadığını bildirmişlerdir (116). Pinzon ve arkadaşları ise daha önce 2003 yılında Lee ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmayı kendi laboratuvarlarında tekrarlamışlar ve minosiklinin fonksiyonel ve morfolojik bir düzelme sağlamadığını bildirmişlerdir (36,117).

Çalışmamızda, modifiye Allen ağırlık düşürme yöntemi ile deneysel TOY oluşturduk. Kolay uygulanması ve insanlardaki yaralanma modeline benzerlik göstermesi bu yöntemi seçmemizin en önemli sebepleridir. Yaratılan travmanın subjektif olması ve şiddetinin homojen olarak ölçülememesi bu yöntemin başlıca dezavantajlarıdır (2, 4).

Şimdiye kadar yayınlanmış çalışmalarını incelediğimizde, standart bir minosiklin tedavi şeması ile karşılaşmadık. Çok çeşitli dozlarda ve sürelerde tedavi şemaları bulunmakla beraber genel olarak intraperitoneal tedavi tercih edilmektedir (20-42). Buna karşın minosiklin ile ilgili yapılan farmakodinamik çalışmalar, özellikle akut etkilerin araştırıldığı durumlarda intravenöz tedavi kullanılmasını tavsiye etmektedirler (118). İntravenöz olarak kullanılan minosiklinin serum plazma konsantrasyonu ve yarılanma süresi intraperitoneal yol ile kıyaslandığında daha doğru olarak hesaplanmaktadır (118). Fagan ve arkadaşları intravenöz olarak verilen minosiklinin yarılanma ömrünü yaklaşık 3 saat olarak belirtirken, intraperitoneal yol için net bir değer verememişlerdir. İnsanlarda antimikrobiyal ve antiinflamatuvar amaçlı kullanılan klasik minosiklin dozu 200 mg, maksimum etkinin

görüldüğü tepe konsantrasyon değeri 6 mg/l'dir. Sıçanlarda benzer değerlere ulaşmak istendiğinde intravenöz olarak verilmesi gereken değer 5-6 mg/kg olarak bulunmuştur (118, 119).

Literatürde intravenöz minosiklin tedavisinin kullanıldığı sadece iki adet çalışma bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi Pinzon ve arkadaşlarının yayınladığı deneysel bir TOY modelidir (117). Daha önce 2003 yılında Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmayı kendi merkezlerinde tekrarlamışlar, orijinal çalışmadan farklı olarak intravenöz ve intraperitoneal tedavinin birlikte olduğu bir grup daha eklemişlerdir. Sonuç olarak minosiklin tedavisinin deneysel TOY modelinde belirgin histopatolojik ve fonksiyonel bir iyileşme sağlamadığını bildirmişlerdir. Diğer çalışma ise Xu ve arkadaşları tarafından bildirilmiş bir deneysel serebral iskemi modelidir (120). Bu çalışmada, intravenöz minosiklin tedavisi ile, intraperitoneal tedaviden çok daha düşük dozlarda başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, minosiklinin yarılanma zamanı ve tepe konsantrasyon değerini dikkate alarak, insanlardaki klasik tedavi edici doza eşdeğer bir tedavi şeması -6 x 1 mg/kg iv- planladık. Diğer tedavi grubu olarak, önceki çalışmalarda kullanılan değerlere benzer intraperitoneal tedavinin verildiği bir grup oluşturduk (35-39). Minosiklin SF içinde çözüldüğü için çalışmamıza ayrı bir çözücü grubu dahil etmedik. Çalışmamız minosiklinin düşük dozda ve sadece intravenöz olarak kullanıldığı ilk deneysel TOY modelidir.

İntravenöz yol olarak kuyruk venini tercih ettik. Kuyruk ven kateterizasyonunun femoral ve juguler ven kateterizasyonuna göre teknik olarak daha kolay ve hızlı yapılması, işlemin daha az invazif olması ve 24 saat boyunca kalması gereken kateterin kuyruğa tespitinin daha sağlam olması kuyruk venini tercih etmemizdeki en önemli sebeplerdir. Kuyruk nekrozu ve hipertermi görülebilecek en ciddi komplikasyonlardır. (110). İntravenöz minosiklin tedavisinin kullanıldığı literatürdeki diğer iki çalışmada venöz yol olarak juguler ven seçilmiştir. Pinzon ve arkadaşları juguler venden sadece bir kez enjeksiyon yaparken, Xu ve arkadaşları dörder saat arayla toplam 3 kez enjeksiyon yapmışlardır. Herhangi bir komplikasyon bildirilmemiştir (117, 120).

Çalışmamızda, ön çalışmalar esnasında 90 mg/kg minosiklini 1 cc SF içinde kuyruk veninden yaklaşık 30 saniyede hızlı enjekte ettik. 2. dozdan sonra deneklerde uykuya meyil, solunum güçlüğü ve taşikardi ortaya çıktı. Ağız ve burunlarından gelen aşırı

miktardaki sekresyonlar sık aspire edildi fakat tablo genelde ölümcül seyretti. Yapılan otopside deneklerin akciğerlerinde ve bağırsaklarında ödem ve hemoraji dikkat çekti. Daha sonra 1 mg/kg minosiklin, 2 cc SF içinde kuyruk veninden yaklaşık 5 dakikalık yavaş infüzyonla verildi. Herhangi bir komplikasyon olmadı. Literatürde ki diğer iki yayında böyle bir yan etkinin bildirilmemiş olmasını deneklerin cins farkına ve enjeksiyon hızındaki farklılıklara bağlayabiliriz. Geç dönem takibi yapılan deneklerin 1 tanesinde kuyruk nekrozu görüldü. İntraperitoneal tedavi verilen deneklerin batinlarında erken dönemde sarı renkli ilaç birikimleri dikkat çekerken, geç dönem incelemelerinde herhangi patolojiye rastlanmadı. Teng ve arkadaşları intraperitoneal minosiklin tedavisi verdikleri çalışmalarında herhangi bir yan etki görmezken, Pinzon ve arkadaşları 7. günde tepe değerine ulaşan kilo kaybı bildirdiler (39, 117).

Yong ve arkadaşları minosiklinin serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (19). Fakat yaptığımız literatur taramasında, travmatik omurilik yaralanmasında minosiklinin bu etkisini gösteren herhangi bir yayına rastlamadık. Bunun üzerine biz de minosiklinin lipid peroksidasyon üzerine olan etkisini araştırdık. Parametre olarak spinal myelin, glial ve nöronal hücre membranlarının peroksidasyon ürünü olan MDA'yı ve vücuttaki en önemli antioksidan moleküllerden biri olan GSH'yı kullanmaya karar verdik (5, 121). Lipid peroksidasyonu parametreleri 1 ile 5 saat arasında tepe değerine ulaştıkları için, travmadan hemen sonra minosiklin tedavisine başlandı ve travma sonrası ikinci saatte de denekler sakrifiye edilip, analiz için doku örnekleri alındı (114). Doku MDA ve GSH düzeyleri ele alındığında, minosiklin tedavisinin akut omurilik yaralanmasının seyrini olumlu yönde etkilediği tespit edildi. İntravenöz tedavi verilen gruptaki MDA ve GSH sonuçları, intraperitoneal gruptan daha iyi olmasına rağmen, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Elektron mikroskopik inceleme ile doku örneklerinin kantitatif değerlendirilmesi için Kaptanoğlu ve arkadaşlarının tanımladığı yöntem –Deneysel omurilik yaralanmasında ultrastrüktürel yapı skorlama yöntemi- kullanıldı (10). Kaptanoğlu ve arkadaşları, bu yöntemin geç dönem analizlerde kistik kavite oluşumuna ikincil yanlış sonuç verme olasılığının yüksek olduğunu bildirdikleri için geç dönem kantitatif değerlendirme yapılmadı (62). Yapılan erken dönem incelemelerin sonunda, deneysel akut omurilik yaralanmasında minosiklin tedavisinin, ultrastrüktürel yapının korunmasında önemli

derecede etkili olduğu tespit edildi. İntravenöz ve intraperitoneal yol arasında anlamlı istatistiksel fark saptanmadı.

Stirling ve arkadaşları minosiklinin antiapoptotik etkilerinden detaylıca bahsetmişlerdir (38). Bunun üzerine biz de çalışmamızda TUNEL yöntemini kullanarak travma sonrası erken ve geç dönemde apoptotik hücreleri göstermeyi amaçladık. Çalışmamızda minosiklin tedavisinin, hem erken hem de geç dönemde apoptozu azalttığı ve geç dönemdeki antiapoptotik etkinin daha belirgin olduğu istatistiksel olarak gösterilmiştir. Bu çalışmanın, minosiklin tedavisi sonrası geç dönem apoptozun incelendiği ilk çalışma olması nedeniyle ayrı bir önemi bulunmaktadır. Lee ve arkadaşları da çalışmalarında erken dönem incelemelerde TUNEL yöntemini kullanmışlar ve bizim sonuçlarımıza benzer olarak minosiklin tedavisi alan grupta TUNEL pozitif hücrelerde belirgin bir azalma saptamışlardır (36).

Çalışmamızda davranış analizi için BBB lokomotor değerlendirme ölçeği ve eğik düzlem değerlendirilmesi kullanıldı (39, 113). Eğik düzlem değerlendirmesinde –aşağı doğru- minosiklin tedavisi alan denekler, travma grubu ile karşılaştırıldığında 1. günden itibaren postürün korunması ve koordinasyonlu arka ayak hareketlerinde daha hızlı ve daha iyi derecede düzelmeler gösterdiler. Oluşturduğumuz travmanın yerine bağlı olarak ön ayak fonksiyonları çok etkilenmediği için yukarı doğru eğik düzlem değerlendirmesinde minosiklin tedavisi alan grupta belirgin bir fark saptanmadı. BBB lokomotor değerlendirme ölçeği ile total arka ayak fonksiyonel iyileşmesini değerlendirildi. Minosiklin tedavisi alan denekler, travma grubu ile karşılaştırıldığında 7. günden itibaren istatistiksel olarak belirgin bir düzelmeler gösterdiler. Teng ve arkadaşları çalışmalarında, fonksiyonel iyileşmenin travma grubu ile karşılaştırıldığında eğik düzlem testinde –aşağı doğru- 7. günde, BBB testinde ise 21. günde belirginleştiğini bildirmişlerdir (39). Wells ve arkadaşları BBB testindeki istatistiksel anlamlı düzelmeyi 3. günde saptarlarken, Lee ve arkadaşları 24. günde saptamışlardır (35, 36). Pinzon ve arkadaşları ise BBB testinde travma grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadıklarını bildirmişlerdir (117). Doku rejenerasyonu için daha uzun bir zaman gerektiğinden, fonksiyonel iyileşmenin 7 gün gibi erken bir dönemde başlamasını, minosiklinin nöroprotektif etkinliğine bağlayabiliriz. Sonuç olarak davranış analizi sonuçlarımız daha önce yayınlanan çalışmalarla benzer şekilde minosiklinin nöroprotektif etkinliğini destekler niteliktedir (35, 39).

Çalışmamızda, travmatik omurilik yaralanması sonrası verilen minosiklin tedavisinin lipid peroksidasyonunu, apoptozu azaltırken, ultrastrüktürel yapıyı koruduğunu ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını gösterdik. Bu durumun, minosiklinin birden fazla mekanizma üzerinden çalışan nöroprotektif bir ajan olmasından kaynaklandığını düşünüyoruz. Minosiklinin, intravenöz yolla veya intraperitoneal yolla verilmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Çok daha düşük dozlarda, daha az yan etki yüzdesi ile intraperitoneal tedaviye benzer sonuçlara ulaşılması, intravenöz yolun kullanımını destekleyen en önemli faktörlerdir. Bu çalışmanın tek dezavantajı travmanın, travma şiddetini daha homojen bir şekilde ayarlayan bilgisayara bağlı ağırlık düşürme cihazı ile oluşturulmamasıdır.

Minosiklin, deneysel omurilik yaralanması modelinde kullanılmış ve etkinliği gösterilmiş bir ilaçtır. Sadece tek bir yola spesifik olmayıp, antiinflamatuvar ve antiapoptotik mekanizmaların her ikisi üzerinden etkili olması minosiklini travmatik omurilik yaralanması tedavisinde gelecek vaat eden bir ilaç haline getirmiştir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- Çalışmamızda minosiklin tedavisinin, travmatik omurilik yaralanması oluşturulmuş sıçanlarda lipid peroksidasyonunu ve apoptozu azalttığı, omurilik dokusunun ultrastrüktürel yapısını koruduğu ve fonksiyonel düzelmeye katkıda bulunduğu gösterilmiştir.
- İntravenöz ve intraperitoneal tedavi grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.
- Deneysel travmatik omurilik yaralanması modellerinde, Allen tekniğinin yerine bilgisayar destekli otomatik ağırlık düşürme cihazlarının kullanılması daha homojen, objektif travmalar yaratmak açısından önemli ve kullanışlıdır.
- Sıçanların kullanıldığı deneysel araştırma modellerinde kuyruk ven kanülasyonu, daha hızlı ve daha az invazif olması nedeniyle intravenöz kanülasyonda tercih edilebilecek bir yöntemdir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Gilbert RR. The Foundation for Spinal Cord Injury Prevention, Care & Cure (FSCIPCC) Erişim: (<http://www.fscip.org/>). Erişim tarihi: 25/11/2009.
- 2) Kaptanoglu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Temel Nöroşirürji (Aksoy K.), 1. Baskı, Ankara, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, Cilt 2, 1144-1155, 2005.
- 3) Akbay A, Bozkurt G, Palaoglu S, Spinal Travmalar, Temel Nöroşirürji (Benli K), 1. Baskı, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Basımevi, 293-307, 2004.
- 4) Tufan K. Deneysel akut omurilik yaralanmasında lamotrijinin etkisi. Uzmanlık tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, 2004.
- 5) Kaptanoglu E, Caner HH, Surucu HS, Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. J Neurosurg, 91 (2 Suppl): 200-204, 1999.
- 6) Kaptanoglu E, Sen S, Beskonakli E, Surucu HS, Tuncel M, Kilinc K. Antioxidant actions and early ultrastructural findings of thiopental and propofol in experimental spinal cord injury. J Neurosurg Anesthesiol, 14 (2): 114-122, 2002.
- 7) Kaptanoglu E, Beskonakli E, Okutan O, Surucu HS, Taskin Y. Effect of magnesium sulphate in experimental spinal cord injury: evaluation with ultrastructural findings and early clinical results. J Clin Neurosci, 10 (3): 329-334, 2003.
- 8) Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E., Akbiyik F, Solaroglu I, Kilinc A. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. J Pineal Res, 34 (1): 32-35, 2003.
- 9) Kaptanoglu E, Beskonakli E, Solaroglu I, Kilinc A, Taskin Y. Magnesium sulfate treatment in experimental spinal cord injury: emphasis on vascular changes and early clinical results. Neurosurg Rev, 26 (4): 283-287, 2003.

- 10) Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*, 27 (2): 113-120, 2004.
- 11) Kaptanoglu E, Okutan O, Akbiyik F, Solaroglu I, Kilinc A, Beskonakli E. Correlation of injury severity and tissue Evans blue content, lipid peroxidation and clinical evaluation in acute spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci*, 11 (8): 879-885, 2004.
- 12) Kaptanoglu E, Caner H, Solaroglu I, Kilinc K. Mexiletine treatment-induced inhibition of caspase-3 activation and improvement of behavioral recovery after spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*, 3 (1): 53-56, 2005.
- 13) Kaptanoglu E, Solaroglu I, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Blockade of sodium channels by phenytoin protects ultrastructure and attenuates lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Acta Neurochir (Wien)*, 147 (4): 405-412; discussion 412, 2005.
- 14) Solaroglu I, Kaptanoglu E, Okutan O, Beskonakli E., Attar A, Kilinc K. Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats. *Surg Neurol*, 64 Suppl 2: S17-21, 2005.
- 15) Beril Gok H, Solaroglu I, Okutan O, Cimen B, Kaptanoglu E, Palaoglu S. Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci*, 14 (2): 138-142, 2007.
- 16) Fehlings MG, Baptiste DC. Current status of clinical trials for acute spinal cord injury. *Injury*. Jul;36 Suppl 2:B113-22, 2005.
- 17) Hawryluk GW, Rowland J, Kwon BK, Fehlings MG. Protection and repair of the injured spinal cord: a review of completed, ongoing, and planned clinical trials for acute spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 25(5):E14, 2008.
- 18) Hurlbert RJ. The role of steroids in acute spinal cord injury: an evidence-based analysis. *Spine (Phila Pa 1976)* 26 (24 Suppl): S39-46, 2001.

- 19) Yong VW, Wells J, Giuliani F, Casha S, Power C, Metz LM. The promise of minocycline in neurology. *Lancet Neurol.* Dec;3(12):744-51, 2004.
- 20) Yrjanheikki J, Keinanen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 22;95(26):15769-74, 1998.
- 21) Yrjanheikki J, Tikka T, Keinanen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J. A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 9;96(23):13496-500, 1999.
- 22) Popovic N, Schubart A, Goetz BD, Zhang SC, Linington C, Duncan ID. Inhibition of autoimmune encephalomyelitis by a tetracycline. *Ann Neurol.* Feb;51(2):215-23, 2002.
- 23) Brundula V, Rewcastle NB, Metz LM, Bernard CC, Yong VW. Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain.* Jun;125(Pt 6):1297-308, 2002.
- 24) Nessler S, Dodel R, Bittner A, Reuss S, Du Y, Hemmer B. Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.* Nov;52(5):689-90; author reply 90, 2002.
- 25) Chen M, Ona VO, Li M, Ferrante RJ, Fink KB, Zhu S. Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med.* Jul;6(7):797-801, 2000.
- 26) Wang X, Zhu S, Drozda M, Zhang W, Stavrovskaya IG, Cattaneo E. Minocycline inhibits caspase-independent and -dependent mitochondrial cell death pathways in models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 2;100(18):10483-7, 2003
- 27) Du Y, Ma Z, Lin S, Dodel RC, Gao F, Bales KR. Minocycline prevents nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 4;98(25):14669-74, 2001.

- 28) Wu DC, Jackson-Lewis V, Vila M, Tieu K, Teismann P, Vadseth C. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci.* Mar 1;22(5):1763-71, 2002.
- 29) He Y, Appel S, Le W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* Aug 3;909(1-2):187-93, 2001.
- 30) Zhu S, Stavrovskaya IG, Drozda M, Kim BY, Ona V, Li M. Minocycline inhibits cytochrome c release and delays progression of amyotrophic lateral sclerosis in mice. *Nature.* May 2;417(6884):74-8, 2002.
- 31) Kriz J, Nguyen MD, Julien JP. Minocycline slows disease progression in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis.* Aug;10(3):268-78, 2002.
- 32) Van Den Bosch L, Tilkin P, Lemmens G, Robberecht W. Minocycline delays disease onset and mortality in a transgenic model of ALS. *Neuroreport.* Jun 12;13(8):1067-70, 2002.
- 33) Tikka TM, Vartiainen NE, Goldsteins G, Oja SS, Andersen PM, Marklund SL. Minocycline prevents neurotoxicity induced by cerebrospinal fluid from patients with motor neurone disease. *Brain.* Apr;125(Pt 4):722-31, 2002.
- 34) Sanchez Mejia RO, Ona VO, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery.* Jun;48(6):1393-9; discussion 9-401, 2001.
- 35) Wells JE, Hurlbert RJ, Fehlings MG, Yong VW. Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain.* Jul;126(Pt 7):1628-37, 2003.
- 36) Lee SM, Yune TY, Kim SJ, Park DW, Lee YK, Kim YC. Minocycline reduces cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury in the rat. *J Neurotrauma.* Oct;20(10):1017-27, 2003.

- 37) Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD. Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci*. Mar 3;24(9):2182-90,2004.
- 38) Stirling DP, Koochesfahani KM, Steeves JD, Tetzlaff W. Minocycline as a neuroprotective agent. *Neuroscientist*. Aug;11(4):308-22, 2005.
- 39) Teng YD, Choi H, Onario RC, Zhu S, Desilets FC, Lan S. Minocycline inhibits contusion-triggered mitochondrial cytochrome c release and mitigates functional deficits after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Mar 2;101(9):3071-6, 2004.
- 40) Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem*. Jun;97(5):1314-26, 2006.
- 41) Yune TY, Lee JY, Jung GY, Kim SJ, Jiang MH, Kim YC. Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *J Neurosci*. Jul 18;27(29):7751-61, 2007.
- 42) Hoang TX, Akhavan M, Wu J, Havton LA. Minocycline protects motor but not autonomic neurons after cauda equina injury. *Exp Brain Res*. Jul;189(1):71-7, 2008.
- 43) Goodrich JT. Landmarks in the history of neurosurgery. *Principles of Neurosurgery* (Rengachary S, Ellenbogen RG), Second edition, China, Elsevier-Mosby, 1-37, 2005.
- 44) Özsoy MK. Deneysel spinal kord yaralanması sonrası deferoksaminin süperoksit dismutaz ve histopatolojik değişiklikler üzerine etkisi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Adana, 2008.
- 45) Naderi S, Zileli M, Özer AF. Omurga cerrahisinin tarihçesi. *Omurga ve Spinal Kord Cerrahisi* (Zileli M, Özer AF), 2. Baskı, İzmir, Cilt 1, 1-13, 2002.
- 46) Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates. The father of spine surgery. *Spine* (Phila Pa 1976). Jul 1;24(13):1381-7, 1999.

- 47) Marketos SG, Skiadas PK. Galen: a pioneer of spine research. *Spine (Phila Pa 1976)*. Nov 15;24(22):2358-62, 1999.
- 48) Lifshutz J, Colohan A. A brief history of therapy for traumatic spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. Jan 15;16(1):E5, 2004.
- 49) Allen AR: Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. Preliminary report. *JAMA* 57:877- 880, 1911.
- 50) Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 37: 291-302, 1991
- 51) Yilmaz G. Deneysel spinal kord yaralanma modelinde clopidogrel'in koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması. Uzmanlık tezi, TC Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, 2007.
- 52) Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sumbuloglu G, Kirnap M, Dursun H. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord*. Nov;38(11):697-701, 2000.
- 53) Schwab ME, Bartholdi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev*. Apr;76(2):319-70, 1996.
- 54) Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. Jul;75(1):15-26, 1991.
- 55) Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 1: Normal spinal cord. *Neurosurgery*. Aug;33(2):277-83; discussion 83-4, 1993.
- 56) Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: Acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. Aug;33(2):285-91; discussion 92, 1993.

- 57) Ducker TB, Kindt GW, Kempf LG. Pathological findings in acute experimental spinal cord trauma. *J Neurosurg.* Dec;35(6):700-8, 1971.
- 58) Khan M, Griebel R, Rozdilsky B, Politis M. Hemorrhagic changes in experimental spinal cord injury models. *Can J Neurol Sci.* Aug;12(3):259-62, 1985.
- 59) Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol.* Oct;56(3):341-58, 1998.
- 60) Fehlings MG, Tator CH, Linden RD. The relationships among the severity of spinal cord injury, motor and somatosensory evoked potentials and spinal cord blood flow. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* Jul-Aug;74(4):241-59, 1989.
- 61) Kobrine AI, Evans DE, Rizzoli HV. The effects of ischemia on long-tract neural conduction in the spinal cord. *J Neurosurg.* May;50(5):639-44, 1979.
- 62) Kaptanoglu E, Palaoglu S, Surucu HS, Hayran M, Beskonakli E. Ultrastructural scoring of graded acute spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg.* Jul;97(1 Suppl):49-56, 2002.
- 63) Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* Oct 1;84(7):2068-101, 1994.
- 64) Hallenbeck JM, Jacobs TP, Faden AI. Combined PGI₂, indomethacin, and heparin improves neurological recovery after spinal trauma in cats. *J Neurosurg.* May;58(5):749-54, 1983.
- 65) Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery.* Jul;27(1):1-11, 1990.
- 66) Braughler JM, Hall ED. Lactate and pyruvate metabolism in injured cat spinal cord before and after a single large intravenous dose of methylprednisolone. *J Neurosurg.* Aug;59(2):256-61, 1983.
- 67) Braughler JM, Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma.* Mar;9 Suppl 1:S1-7, 1992.

- 68) Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braughler JM, Hall ED. Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. *Cent Nerv Syst Trauma*. Winter;2(4):257-67, 1985.
- 69) Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT. Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. Jun;16(6):511-21, 1999.
- 70) Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res*. May 3;547(2):344-8, 1991.
- 71) Greenamyre JT, Porter RH. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*. Nov;44(11 Suppl 8):S7-13, 1994.
- 72) Rothman SM, Olney JW. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic--ischemic brain damage. *Ann Neurol*. Feb;19(2):105-11, 1986.
- 73) Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci*. Feb 1;17(3):1055-63, 1997.
- 74) Yanase M, Sakou T, Fukuda T. Role of N-methyl-D-aspartate receptor in acute spinal cord injury. *J Neurosurg*. Nov;83(5):884-8, 1995.
- 75) McAdoo DJ, Hughes MG, Nie L, Shah B, Clifton C, Fullwood S. The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage --> glutamate release --> damage --> glutamate release --> etc. *Brain Res*. Mar 15;1038(1):92-9, 2005
- 76) Akins PT, Atkinson RP. Glutamate AMPA receptor antagonist treatment for ischaemic stroke. *Curr Med Res Opin*.;18 Suppl 2:s9-13, 2002.

- 77) Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*. May 10;252(5007):851-3, 1991.
- 78) Szatkowski M, Attwell D. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci*. Sep;17(9):359-65, 1994.
- 79) Hinwood BG, Yeo JD, Kidman AD. Monoamine and tissue fluid levels in contused spinal cord of sheep. *J Neurochem*. Oct;35(4):786-91, 1980.
- 80) Osterholm JL, Mathews GJ. Altered norepinephrine metabolism following experimental spinal cord injury. 1. Relationship to hemorrhagic necrosis and post-wounding neurological deficits. *J Neurosurg*. Apr;36(4):386-94, 1972.
- 81) Osterholm JL, Mathews GJ. Altered norepinephrine metabolism, following experimental spinal cord injury. 2. Protection against traumatic spinal cord hemorrhagic necrosis by norepinephrine synthesis blockade with alpha methyl tyrosine. *J Neurosurg*. Apr;36(4):395-401, 1972.
- 82) Hamilton AJ, Black PM, Carr DB. Contrasting actions of naloxone in experimental spinal cord trauma and cerebral ischemia: a review. *Neurosurgery*. Nov;17(5):845-9, 1985.
- 83) Sharma HS, Olsson Y, Nyberg F, Dey PK. Prostaglandins modulate alterations of microvascular permeability, blood flow, edema and serotonin levels following spinal cord injury: an experimental study in the rat. *Neuroscience*. Nov;57(2):443-9, 1993.
- 84) Winkler T, Sharma HS, Stalberg E, Olsson Y. Indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis attenuates alteration in spinal cord evoked potentials and edema formation after trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat. *Neuroscience*. Feb;52(4):1057-67, 1993.
- 85) Agrawal SK, Fehlings MG. Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: role of Na⁺, Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase, the Na⁽⁺⁾-H⁺ exchanger, and the Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger. *J Neurosci*. Jan 15;16(2):545-52, 1996.

- 86) Ildan F, Polat S, Oner A, Isbir T, Cetinalp E, Kaya M. The effect of the treatment of high-dose methylprednisolone on Na(+)-K(+)/Mg(+2) ATPase activity and lipid peroxidation and ultrastructural findings following cerebral contusion in rat. *Surg Neurol.* Dec;44(6):573-80, 1995.
- 87) Ildan F, Oner A, Polat S, Isbir T, Gocer AI, Kaya M. Correlation of alterations on Na(+)-K+/Mg+2 ATPase activity, lipid peroxidation and ultrastructural findings following experimental spinal cord injury with and without intravenous methylprednisolone treatment. *Neurosurg Rev.* ;18(1):35-44, 1995.
- 88) Nashmi R, Fehlings MG. Mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: with an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. *Brain Res Brain Res Rev.* Dec;38(1-2):165-91, 2001.
- 89) Tymianski M, Tator CH. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery.* Jun;38(6):1176-95, 1996.
- 90) Schanne FA, Moskal JR, Gupta RK. Effect of lead on intracellular free calcium ion concentration in a presynaptic neuronal model: ¹⁹F-NMR study of NG108-15 cells. *Brain Res.* 1989 Dec 4;503(2):308-11.
- 91) Schanne FA, Dowd TL, Gupta RK, Rosen JF. Lead increases free Ca²⁺ concentration in cultured osteoblastic bone cells: simultaneous detection of intracellular free Pb²⁺ by ¹⁹F NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Jul;86(13):5133-5
- 92) Guha A, Tator CH, Piper I. Increase in rat spinal cord blood flow with the calcium channel blocker, nimodipine. *J Neurosurg.* Aug;63(2):250-9, 1985.
- 93) Guha A, Tator CH, Piper I. Effect of a calcium channel blocker on posttraumatic spinal cord blood flow. *J Neurosurg.* Mar;66(3):423-30, 1987.
- 94) Guha A, Tator CH, Smith CR, Piper I. Improvement in post-traumatic spinal cord blood flow with a combination of a calcium channel blocker and a vasopressor. *J Trauma.* 1989 Oct;29(10):1440-7, 1989.

- 95) Aarsman AJ, Mynbeek G, van den Bosch H, Rothhut B, Prieur B, Comera C. Lipocortin inhibition of extracellular and intracellular phospholipases A2 is substrate concentration dependent. *FEBS Lett.* Jul 13;219(1):176-80, 1987.
- 96) Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH. Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 1;90(21):9808-12, 1993.
- 97) Liu J, Farmer JD, Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* Aug 23;66(4):807-15, 1991.
- 98) Hausmann ON. Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord.* Jul;41(7):369-78, 2003.
- 99) Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci.* May 1;6(5):712-24, 1994.
- 100) Bartholdi D, Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* Jul;9(7):1422-38, 1997.
- 101) Streit WJ, Semple-Rowland SL, Hurley SD, Miller RC, Popovich PG, Stokes BT. Cytokine mRNA profiles in contused spinal cord and axotomized facial nucleus suggest a beneficial role for inflammation and gliosis. *Exp Neurol.* Jul;152(1):74-87, 1998.
- 102) Taoka Y, Okajima K. Role of leukocytes in spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* Mar;17(3):219-29, 2000.
- 103) Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. Early anti-inflammatory treatment reduces lipid peroxidation and protein nitration after spinal cord injury in rats. *J Neurochem.* Mar;88(6):1335-44, 2004.
- 104) Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, Citron BA, Watanabe I, Berman NE. Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma.* Jul;15(7):459-72, 1998.

- 105) Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. Oct;17(10):915-25, 2000.
- 106) Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*. Dec;89(6):911-20, 1998.
- 107) Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*;25(5):E2, 2008.
- 108) David S, Aguayo AJ. Axonal elongation into peripheral nervous system "bridges" after central nervous system injury in adult rats. *Science*. Nov 20;214(4523):931-3, 1981.
- 109) Atalay B, Bavbek M, Cekinmez M, Ozen O, Nacar A, Karabay G. Antibodies neutralizing Nogo-A increase pan-cadherin expression and motor recovery following spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. Dec;45(12):780-6, 2007.
- 110) Harvey D. Tail vein injection in the mouse and rat. Erişim: (<http://www.animalcare.ubc.ca/>). Erişim Tarihi: 21/12/2009
- 111) Buege JA, Aust AD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 302-310, 1978.
- 112) Ellmann GL. Tissue sulphhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*, 82, 70-77, 1959.
- 113) Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. Feb;12(1):1-21, 1995.
- 114) Tufan K, Oztanir N, Ofluoglu E, Ozogul C, Uzum N, Dursun A. Ultrastructure protection and attenuation of lipid peroxidation after blockade of presynaptic release of glutamate by lamotrigine in experimental spinal cord injury. *Neurosurg Focus*. 25(5):E6, 2008.
- 115) Klein NC, Cunha BA. Tetracyclines. *Med Clin North Am*. Jul;79(4):789-801, 1995.

- 116) Saganova K, Orendacova J, Cizkova D, Vanicky I. Limited minocycline neuroprotection after balloon-compression spinal cord injury in the rat. *Neurosci Lett*. Mar 15;433(3):246-9, 2008.
- 117) Pinzon A, Marcillo A, Quintana A, Stamler S, Bunge MB, Bramlett HM. A re-assessment of minocycline as a neuroprotective agent in a rat spinal cord contusion model. *Brain Res*. Dec 3;1243:146-51, 2008.
- 118) Fagan SC, Edwards DJ, Borlongan CV, Xu L, Arora A, Feuerstein G. Optimal delivery of minocycline to the brain: implication for human studies of acute neuroprotection. *Exp Neurol*. Apr;186(2):248-51, 2004.
- 119) Colovic M, Caccia S. Liquid chromatographic determination of minocycline in brain-to-plasma distribution studies in the rat. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. Jul 5;791(1-2):337-43, 2003.
- 120) Xu L, Fagan SC, Waller JL, Edwards D, Borlongan CV, Zheng J. Low dose intravenous minocycline is neuroprotective after middle cerebral artery occlusion-reperfusion in rats. *BMC Neurol*. Apr 26;4:7, 2004.
- 121) Bilginer B, Onal MB, Narin F, Ustun H, Kilinc K, Akalan N. Antiapoptotic and neuroprotective effects of mycophenolate mofetil after acute spinal cord injury in young rats. *Childs Nerv Syst*. Dec;25(12):1555-61, 2009.