



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA AKUT SPİNAL KORD YARALANMASINDA
NÖROPROTEKTİF ERİTROPOETİNİN HEM OKSİJENAZ-1
(HO-1) VE NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMLERİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özgen ÖZMETE

Antalya, 2012



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA AKUT SPİNAL KORD YARALANMASINDA
NÖROPROTEKTİF ERİTROPOETİNİN HEM OKSİJENAZ-1
(HO-1) VE NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMLERİ
ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özgen ÖZMETE

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Neval BOZTUĞ UZ

‘Kaynakça gösterilerek Tezimden Yararlanılabılır’

Antalya, 2012

‘Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetimi Tarafından 2011.04.0103.016 numaralı proje ile desteklenmiştir’

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalında uzmanlık eğitimim süresince eğitimime katkıda bulunan, tezimin planlanması ve gerçekleşmesi aşamasındaki katkılarından dolayı öncelikle tez danışmanım Doç. Dr. Neval Boztuğ Uz ve tüm hocalarıma,

Tezimin deneysel kısmında yardımcı olan Deneysel Hayvan Laboratuvar sorumlusu Vet. Dr. Doğa Besne ve teknikerler Erol Nizamoğlu ile İbrahim Çalışkan'a,

Tezimin biyokimyasal olarak değerlendirme kısmında katkılarından ve yardımlarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalından Prof. Dr. Mutay Aslan'a,

Tezimin patolojik olarak değerlendirme kısmında katkılarından dolayı Tıbbi Patoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Elif İnanç Gürer'e,

Çalışmamın deney bölümünde desteklerinden dolayı Doç. Dr. Suat H. Sanlı, Araş. Gör. Dr. Seçkin Saraçoğlu ve Günübirlük Cerrahi Merkezi anestezi teknikeri arkadaşlarıma ve Uzm. Dr. Akın Bıyık'a,

İstatistiksel analizlerdeki katkılarından dolayı Araştırma Görevlisi Dr. Anıl Aktaş Samur'a,

Bana her zaman destek olan canım anneme ve her zaman kalbimde olan babama...

Teşekkür ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	vi
Çizelgeler Dizini	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Spinal Kord Anatomisi	3
2.1.1. Spinal kordun kan dolaşımı	4
2.2. Spinal Kord Travmasının Tarihçesi	8
2.3. Deneysel Spinal Kord Yaralanma Modelleri	10
2.3.1. Kliple Bası Modeli	11
2.3.2. Ventral Bası Modeli	11
2.3.3. Kontrollü Kontüzyon	11
2.3.4. Yüksekten Ağırlık Düşürme Modeli	11
2.3.5. Kesi Modeli	12
2.3.6. Spinal Kord İskemi Modeli	12
2.3.7. Radyofrekans Akımla Segmental Spinal Kord Yaralanması	12
2.4. Spinal Kord Travmasında Hasar Mekanizmaları	13
2.4.1. Primer Hasar Mekanizmaları	13
2.4.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları	14
2.4.2.1. Sistemik ve Lokal Vasküler Etkiler	16
2.4.2.2. Eksitotoksisite ve Elektrolit Bozuklukları	17
2.4.2.3. Serbest Radikal Oluşumu ve Lipid Peroksidasyonu	20
2.4.2.4. İnflamatuar/İmmunolojik Yanıt	25
2.4.2.5. Apoptoz	27
2.5. Spinal Kord Hasarının Patolojisi	28
2.5.1. Akut Faz	28
2.5.2. Subakut Faz	29
2.5.3. Kronik Faz	29
2.6. Modern Farmakoterapi Çalışmaları	31
2.6.1. Kortikosteroidler	31
2.6.2. Gangliozidler	33
2.6.3. Opioid Reseptör Antagonistleri	33
2.6.4. Aminosteroidler	34
2.6.5. Serbest Radikal Tutucular	34
2.6.6. Glutamat Reseptörü ve İyon Kanalı Antagonistleri	35
2.6.7. Magnezyum	36

2.6.8. İmmüsupresanlar	37
2.6.9. Non-steroidal Antiinflamatuvar Ajanlar	37
2.6.10. Nörotransmitter Reseptör Antagonistleri	38
2.6.11. Nörotropik Faktörler	38
2.6.12. Sistemik Hipotermi	38
2.6.13. Antikoagulan Ajanlar	38
2.6.14. Minosiklin	39
2.6.15. İmmüsupresanlar	39
2.6.16. NOS (Nitrik Oksit Sentaz)	39
2.7. Hem Oksijenaz Enzim Sistemi	40
2.7.1. Hem oksijenaz izoformları ve moleküler özellikleri	40
2.7.2. Hem oksijenaz ve nitrik oksit sentaz arasındaki ilişki	42
2.8. Eritropoetin (EPO)	42
2.8.1. Yapısı ve Fizyokimyasal Özellikleri	42
2.8.2. Yapım Yeri ve Etki Mekanizması	43
2.8.3. EPO Reseptörleri	45
2.8.4. EPO Farmakokinetiği ve Metabolizması	45
2.8.5. EPO ve Santral Sinir Sistemi	46
3. ARAÇLAR VE YÖNTEM	48
3.1. Gruplar ve Yöntem	48
3.2. Biyokimyasal Değerlendirme	52
3.2.1. Nitrit ve Nitrat Ölçümü	52
3.2.2. Hem Oksijenaz-1 Ölçümü	53
3.2.3. Protein Miktarının Tayini	53
3.3. Patolojik Değerlendirme	54
3.4. İstatistik	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	67
7. ÖZET	68
8. ABSTRACT	69
9. KAYNAKLAR	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMPA	Delta-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionik asit
ATP	Adenozin trifosfat
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
Ca	Kalsiyum
CaM	Kalmoduline
Cl	Klor
cNOS	Konstitütif NOS
CO	Karbon Monoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
eNOS	Endotelyal NOS
EPO	Eritropoetin
HO	Hem Oksijenaz
iNOS	İndüklenebilir NOS
K	Potasyum
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
NMDA	N-metil D-aspartat
nNOS	Nöronal NOS
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
O ₂	Oksijen
SKH	Spinal Kord Hasarı
SSS	Santral Sinir Sistemi
TRH	Tirotropin Releasing Hormon

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Spinal kordun transvers kesiti	4
2.2. Spinal kordun arteryal dolaşımını sağlayan radiküler arter, anterior spinal arter ve posterior spinal arterin kesiti	6
2.3. Anterior spinal arter, posterior spinal arter ve radiküler arter arasındaki anastomoz	7
2.4. Spinal kord venleri	7
2.5. Nitrik Oksit sentezi	21
2.6. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları	23
2.7. Akut spinal kord hasarının mekanizmaları	25
2.8. Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları	41
3.1. Ratların preoperatif hazırlığı	49
3.2. Cilt insizyonu ve diseksiyon	49
3.3. Laminektomi sonrası spinal kord görünümü	50
3.4. Spinal kordun klemlenmesi	51
3.5. Cerrahiden 2 saat sonra spinal kord görünümü	51
3.6. Örneklenen spinal kord görünümü	52
4.1. Gruplara göre rat ağırlıklarının karşılaştırılması	56
4.2. Gruplara göre patolojik değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması	57
4.3. Nöronlarda hafif iskemik değişiklik	58
4.4. Nöronlarda şiddetli iskemik değişiklik	58
4.5. Gruplara göre Hem Oksijenaz 1 sonuçlarının karşılaştırılması	59
4.6. Gruplara göre Nitrit ve Nitrat sonuçlarının karşılaştırılması	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>		<u>Sayfa</u>
2.1.	Spinal kord yaralanma modellerinin tarihsel gelişimi	9
2.2.	Deneysel spinal kord yaralanma modelleri	10
2.3.	Primer hasar mekanizmaları	13
2.4.	Spinal kord yaralanmasında sekonder hasar mekanizmaları	15
2.5.	Akut histopatolojik değişiklikler	28
2.6.	Kronik dönemdeki patolojik değişiklikler	30
4.1.	Ratların ağırlıklarının (gr) ortalama ve \pm SS değerleri	56
4.2.	Gruplara göre patolojik değerlendirme sonuçları	57
4.3.	Ratların Hem Oksijenaz 1 (ng/mg protein) ortalama ve \pm SS değerleri	59
4.4.	Ratların Nitrit ve Nitrat (μ mol/mg protein) ortalama ve \pm SS değerleri	60

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Santral sinir sisteminin (SSS) travmatik hasarlanması elli yaş altındaki ölüm ve fonksiyonel kayıpların en önemli nedenlerindedir [1]. Özellikle travmatik spinal kord hasarının (SKH) travmaya uğramış kişi üzerindeki fiziksel ve emosyonel etkileri sonucu kişinin yaşam kalitesindeki bozulma ve toplum üzerindeki sosyoekonomik etkileri çok ciddi problemler olarak karşımıza çıkmaktadır [2].

Yıllık insidans çoğu ülkede 15- 40 /1.000.000 arasında değişmekte ve tüm yaş gruplarını etkilemekle beraber ortalama 16-30 yaşlarında görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 12.000 yeni parapleji veya kuadripleji olgusu ortaya çıktığı tahmin edilmekte, 4.000 olgu hastaneye yetiştirilemeden ölürken, 1.000 olgu hastane izlemi sırasında kaybedilmektedir [3]. Bu değerler akut SKH'nın toplum üzerinde yarattığı etkinin büyüklüğü hakkında çok net bilgi vermektedir.

Tedavideki araştırmalar, modern yaklaşıma değerli katkılarda bulunmaktadır, ancak kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve aynı zamanda evrensel bir tedavi protokolü halen geliştirilebilmiş değildir [2, 4, 5].

Travmatik SKH'nda patofizyolojik süreçleri daha iyi anlamak, tedavide yeni seçenekler geliştirebilmemize katkı sağlar. Yapılan deneysel çalışmalar, travma sonrası oluşan hasarın; birincil ve ikincil olarak iki aşamada geliştiğini ortaya koymuştur. Birincil yaralanma, travma anında gerçekleşmekte olup, doku hasarı ve hücre ölümü sonucu meydana gelir. İkincil yaralanma ise endojen hücre ölümü yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan, birincil yaralanma ile başlatılmış hücre ölüm kaskatının bir sonucudur. Deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler spinal kord lezyonlarının daha çok ikincil hasar mekanizmasıyla genişlediğini göstermektedir. Geçerli olan kanıtlar, serbest radikallerin oluşmasının ve hücre membranı lipid peroksidasyonunun ikincil hasar sürecinde önemli rol oynadıkları yönündedir [6]. Günümüzde ikincil hasarlamadan, apoptozis, intraselüler protein sentezi ve glutaminerjik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır [7].

Spinal kordda iskemik hasarın önlenmesi amacı ile yapılan deneylerde polietilen glikol, superoksid dismutaz, desferroksamin, papaverin, hidroklorid,

kalsiyum kanal blokerleri, barbitüratlar, kortikosteroidler, perflorokarbonlar, naloksan gibi farmakolojik ajanlar, topikal veya sistemik olarak uygulanmıştır [8-20].

Son yıllarda tavşanlarda oluşturulan deneysel spinal kord iskemi modellerinde siklohegzimid, caffeik asit, fenil ester, riluzole, ketamin, memantin, aktive protein C, intratekal tetrakain, iloprost, trimetazidin gibi maddelerin spinal kord hasarlanması üzerine etkileri araştırılmış ve sistemik kan basıncının artırılması, Tirotropin Releasing Hormon (TRH), hipotermi, BOS basıncının azaltılması gibi pek çok tedavi şekli denenmiştir [13, 21-28].

Eritropoezisi uyaran bir sitokin hormon olması nedeniyle günümüzde kronik böbrek yetmezliği olan ve diyaliz uygulanan hastalarda aneminin tedavisi için kullanılmakta olan eritropoetin (EPO), SSS'nde fizyolojik ve patolojik olaylardaki rolü yakın zamanda araştırılmaya başlanmıştır. EPO reseptörlerinin hipokampal ve kortikal nöronlarda saptandığı ve kemirgenlerde astrositlerin EPO ürettiği bildirilmiştir. EPO nöronlar üzerinde in vitro trofik etki göstermektedir. EPO'nin in vivo ve in vitro global ve fokal serebral iskemi modelinde nöron koruyucu etkisi olduğu da kanıtlanmıştır [29-31].

Travmatik SKH çalışmalarında hayvan modellerinin kullanımı, uygulamanın basit ve ucuz olması, neden-sonuç ilişkisi açısından insanlarla benzerlik göstermesi nedeniyle oldukça yaygındır [32]. Deneysel hayvan modelleri içinde klip kompresyon metodu insanlarda spinal kordun akut kompresyon travmasını en iyi biçimde taklit edebilen model olarak seçilmiştir [33, 34]. Sıçanlar, temin edilmelerinin kolay olması, yapılan cerrahi müdahalelere oldukça dirençli olmaları ve spinal kord vasküler sisteminin insanlara son derece benzerlik göstermesi nedeniyle deneysel SKH'ında son yıllarda tercih edilen deney hayvanı olmuştur [6, 32, 35, 36].

Günümüze kadar elde edilen bilgiler ışığında çalışmamızda sıçanlarda klip kompresyon metoduyla gerçekleştirilen deneysel SKH modelinde intraperitoneal (İP) uygulanan EPO'nin, HO-1 ve NOS enzimlerine olan etkinliği ile nöronal koruma sağladığını göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Anatomisi

Spinal kanal, vertebra korpus ve arkusları tarafından oluşturulur. Spinal kordu ve sinir köklerini, damarları, spinal kordu saran zarları, yağ ve destek dokusunu çevreleyerek korur.

Vertebral kolon 33 vertebradan oluşur. Erişkinde sakral ve koksigeal vertebraların birleşmesi nedeniyle 24 vertebra fonksiyon görür. Her vertebra korpus, arkus, eklem çıkıntıları ve eklem yüzeylerinden oluşur. Dört eklem çıkıntısının aşağı ve yukarı çıkıntılar ile oluşturduğu faset eklemler, posterior stabilite yanında vertebranın fleksiyon, ekstansiyon ve lateral rotasyonunu da sağlar. Anterior ve posterior ligamentler, vertebra ön elemanlarını kafa kaidesinden sakruma kadar uzanarak sararlar ve vertebral kolonun fleksiyon ve ekstansiyonda stabilitesini sağlarlar. Yaklaşık 40-50 cm. uzunluğunda, 1 cm. çapında, 30 gram ağırlığında olup, en kalın olduğu yerde el başparmağı genişliğindedir.

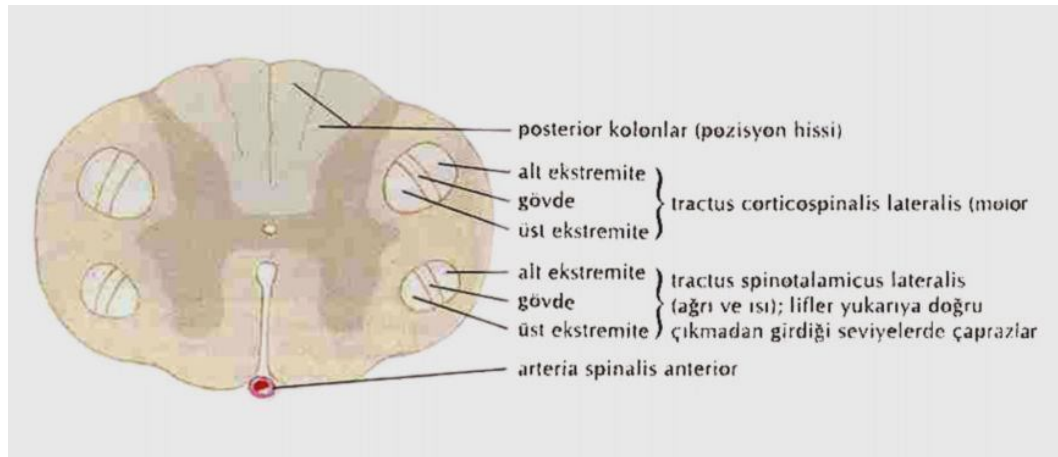
Spinal kord, beyin sapından başlayıp erişkinde L1-2, bebekte L3 seviyesinde bulunan konus medullaris kadar uzanır. Bu düzeyden sonra filum terminale olarak 1.koksigeal segmente kadar devam eder. Spinal korddan çıkan kanalis vertebralis içinde bulunan ön ve arka kökler (radix anterior ve posterior), foramen intervertebrale'de biraraya gelerek spinal siniri oluşturur. 3 koksigeal segmentin son ikisi rudimenter olduğu için spinal sinir çıkmaz. Bu nedenle 33 medulla spinalis segmentinden 31 çift spinal sinir çıkar. 31 çift spinal sinirin dağılımı 8 servikal, 12 torasik, 5 lumbal, 5 sakral ve 1 koksigeal sinir şeklindedir [37].

Segmental spinal sinirler korda her iki taraftan girer ve ayrılırlar. Spinal kordun her segmenti sol ve sağda bir ventral bir de dorsal kök olmak üzere dört köke sahiptir. Birinci servikal segment genellikle dorsal köklerden yoksundur. Spinal korddan çıkan 31 çift spinal sinirin her biri ventral ve dorsal köke sahiptir. Her kök 1-8 ince sinir lifi demetinden yapılmıştır. Spinal sinirin dorsal kökünde, ventral kökle birleşme yerine yakın olarak, içinde sinir hücre gövdelerini bulunduran dorsal kök ganglionu (ganglion spinale) bulunur.

Kolumna vertebralisin dışındaki bir spinal sinir parçasına periferik sinir denir. Spinal sinirler, medulla spinalis segmentlerine karşılık gelen gruplara bölünür.

Gri cevher spinal nöronları içerir ve santral kanalı "H" şeklinde çevreler. Arka boynuz, sensoriyel fonksiyondan (ağrı, pozisyon hissi, dokunma ve ısı) sorumlu iken; ön boynuz, motor fonksiyon ve spinal reflekslerden sorumludur. (Şekil 2.1). Çevrede yer alan beyaz cevher ise, miyelinli ve miyelinsiz lifler aracılığı ile aşağı ve yukarı merkezlerin ilişkisini sağlar.

Spinal sinirler, vertebra ile özel bir ilişki içindedir. Sinir kökleri, foramen intervertebrale aracılığı ile kolumna vertebralisten çıkar. Sekiz servikal sinir ve sadece yedi servikal vertebra olduğu için segmental spinal sinirler, 7. servikal vertebraya kadar aynı numaralı vertebraın üzerindeki forameninden, bu seviyenin altında 8. servikal sinir 7. servikal vertebraın altından çıkar [38]. Omurganın alt parçasında numaralandırılmış kökler, kendilerine karşılık gelen vertebraların altından çıkarlar.



Şekil 2.1. Spinal kordun transvers kesiti.

2.1.1. Spinal Kordun Kan Dolaşımı

Gri ve beyaz cevher içerisindeki kan damarlarının segmental dağılımı vasküler yapıları dışardan gelecek travmaya karşı duyarlılığını arttırdığından, spinal kordun damarsal yapısı önemlidir. Aynı zamanda vasküler yapıların anatomisi spinal kordun tüm eksenini boyunca ikincil hasar gelişmesi hakkında ipucu sağlar.

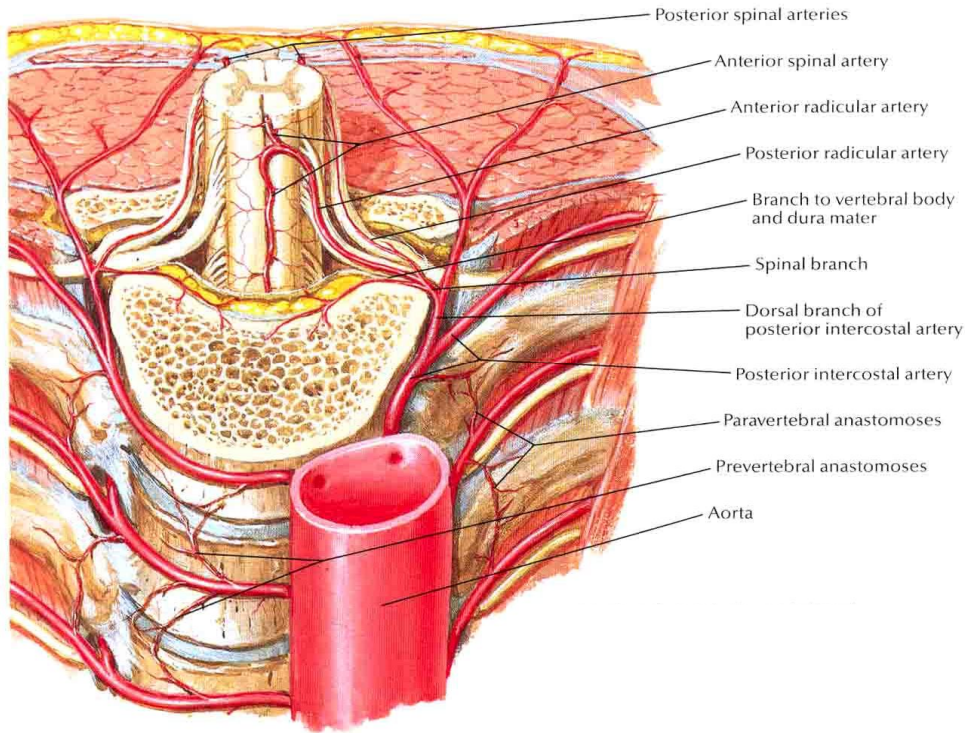
Spinal kord kan akımı serebral kan akımının yaklaşık %40' ı, servikal ve lumbosakral bölgelerdeki kan akımı ise torasik bölgedekinin iki katı kadardır. Otoregülasyon ve kimyasal regülasyon yönünden spinal kord kan akımının düzenlenmesi serebral kan akımına benzerlik gösterir. Otoregülasyon; perfüzyon basıncının 60-150 mmHg sınırları arasında kaldığı zaman mümkün olup, bu sınırlar dışında kan akımı basınca bağımlı hale gelir. Spinal kordun perfüzyon basıncı otoregülasyon sınırının altında tutulursa iskemi gelişebilir. Aynı şekilde spinal kord kan akımı, oksijen ve karbondioksit parsiyel basınçlarındaki değişimlerden serebral kan akımına benzer şekilde etkilenir. Kan akımı hipokapnide azalırken, hipokside vazodilatasyon sonucu artar. Bunların dışında spinal kord kan akımını etkileyen başka faktörler de vardır. Bunlar anestezik ajanların etkisi, travma ve şiddeti, fokal kanama alanları, ödem varlığı ve hasarlı nöronlardan vazokonstriktör nörotransmitterlerin saliverilmesidir [38, 39].

Omuriliğin ana besleyici arteri olan arteria spinalis anterior, her iki vertebral arterden çıkan iki dalın 2. servikal vertebra seviyesinde birleşmesiyle meydana gelir. Arteria spinalis anterior orta servikal ve torakal bölgelerde segmental radiküler arterlerle anastomoz yapar. Omuriliğin posteriorunu besleyen posterolateral arterler de her iki posterior inferior serebellar arter ya da her iki arteria vertebralisten çıkarlar ve aşağıya doğru seyrederek. Arteria spinalis anterior ve posteriorlar foramen intervertebralislerden vertebral kanala giren arteria radikularislerce desteklenirler [39].

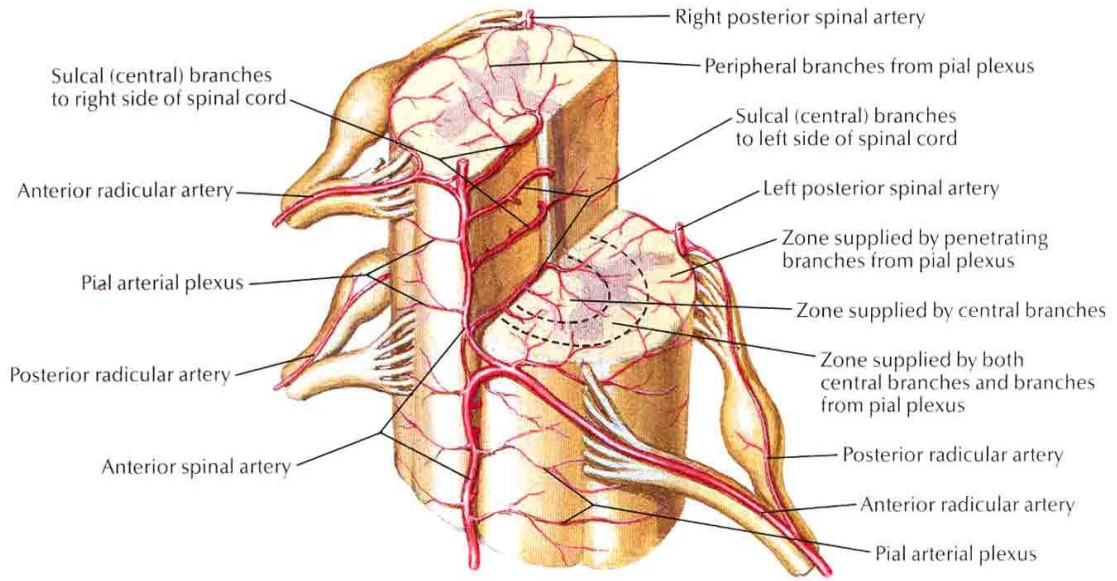
Radiküler arterler, servikal bölgede omurganın iki yanında vertebral foramenlerde seyreden vertebral arterlerden, tiroservikal ve kostoservikal trunkustan kan alırlar. Torakolomber bölgede lomber ve interkostal arterden, sakral bölgede lateral sakral ve iliolumber arterden beslenirler [39] (**Şekil 2.2. ve Şekil 2.3.**).

Omuriliğin dorso-lumbosakral bölümü (T8-konus medullaris) Adamkiewicz adı verilen en büyük anterior radiküler arter ile beslenir. Adamkiewicz % 80 sol interkostal lomber arterden köken alıp T9-L2 sinir köklerine kadar ulaşır. Büyük bir anterior, daha küçük posterior bir dalı vardır. Anterior radiküler dal omuriliğin anterior bölümüne ulaşarak yukarı doğru yükselir [39].

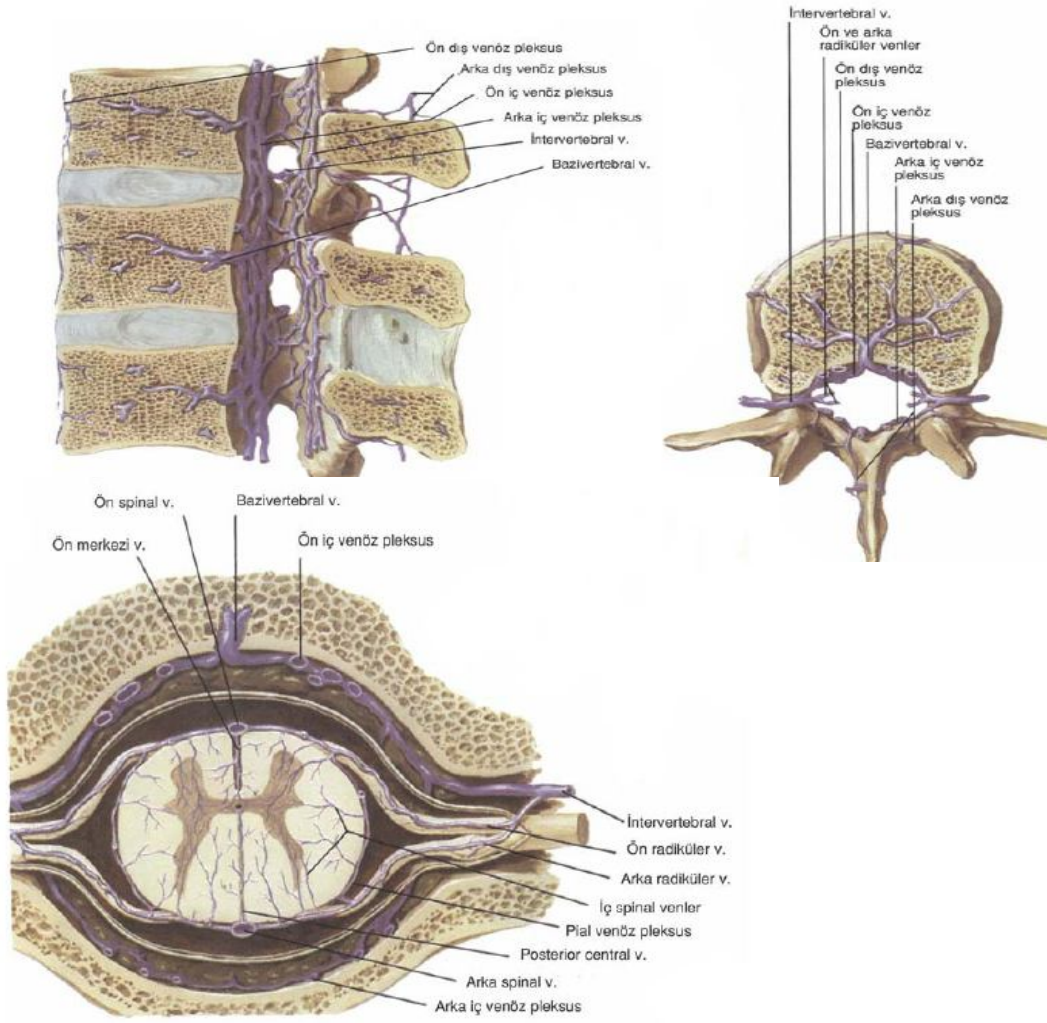
Spinal venler, spinal arterlere benzer bir dağılım gösterir. Anteromedian ve anterolateral venler, spinal kordun ön yüzü boyunca 6-11 tane anterior radiküler vene açılır, oradan da epidural venöz pleksusa boşalırlar. Epidural venöz pleksus (internal vertebral venöz sistem), eksternal vertebral venöz sisteme ve kaval venlere açılır (**Şekil 2.4**). Epidural sistemdeki venlerde valvler bulunmadığından gebelik, şişmanlık, intraabdominal basınç artışı veya inferior vena kavada obstrüksiyon gibi bazı durumlarda venöz göllenme kaçınılmazdır. Spinal kordun bazı bölgeleri azalmış kan akımına özellikle hassastır. Anterior spinal arter için T1 ve L1 seviyeleri, posterior arterler için ise T1-4 seviyeleri en fazla risk altında bulunan bölgelerdir [11, 38].



Şekil 2.2. Spinal kordun arteriyel dolaşımını sağlayan radiküler arter, anterior spinal arter ve posterior spinal arterin kesiti,



Şekil 2.3. Anterior spinal arter, posterior spinal arter ve radiküler arter arasındaki anastomoz.



Şekil 2.4. Spinal kord venleri.

2.2. Spinal Kord Travmasının Tarihçesi

Akut SKH yüzyıllardır bilinen bir patolojik durum olup, toplumu sosyal ve ekonomik açıdan derinden etkilemektedir. SKH, ciddi ve harap edici bir nörolojik problem olması ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün düzenlenememesi nedeniyle günümüzün en ciddi sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir [2, 40]. Hayvan modellerinde fizyopatolojik süreçlerle ilgili toplanan bilgi birikimine ve tedavide başarılı ilaçların geliştirilmesine karşın, klinik planda sonuçlar hala tatmin edici değildir.

Spinal kord yaralanmalarıyla ilgili ilk yazılı belge 5000 yıl önce (M.Ö.3000–2500 yılları arasında) yazılmış olan ve 1930 yılında Bearsted'in tercüme ettiği Edwin Smith papirusudur. Bu papirusta eski Mısırlı cerrahlar spinal kord yaralanmalı bir olguda motor, total duyu ve idrar kontrolünün kaybı olduğu ve tedavisinin olmadığından bahsetmişlerdir. Spinal travma ve hasarlanması konusunda Hipokrat ve Galen dönemine kadar önemli bir gelişme söz konusu değildir. Hipokrat paraplejiyi tarif etmiş, kırık ve dislokasyonları redükte etmek için kendine özgü bir traksiyon cihazı geliştirmiştir [41].

SKH'nın patofizyolojisini araştırmak ve nöroprotektif ajanların etkilerini değerlendirmek amacıyla çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir.

Bilinen ilk omurilik insizyonunu M.Ö 2. yy'da Galen yapmıştır [42]. 1911 yılında Allen'in deneysel spinal kord travma modelini geliştirmesi ile konuya ilgi artmıştır. Köpeklerde laminektomi sonrası spinal kord üzerine ağırlık düşürerek kontüzyon tipi omurilik hasarı oluşturmuş ve uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomiyelinin kaldırılmasının, nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını ortaya koymuştur. Bu çalışma daha önce yapılmış olan deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasını sağlamış, ayrıca sekonder hasar konseptinin de öncülüğünü yapmıştır [43-45].

Rivlin ve Tator tarafından 1978 yılında geliştirilen anevrizma klipi ile ekstradural kompresyon modelinde, spinal kord çeşitli zaman aralıklarında anevrizma klipleri ile kliplenmekte ve bu sayede değişik miktarlarda travma oluşturulabilmektedir. Bu modelde, klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir [44, 45].

Watson, 1986'da lazer ile omurilik kesisi yapmıştır [46]. Stokes ve Reier, 1990'da omuriliğe yapılacak darbenin şiddetini ve hızını önceden belirleyip darbe sonunda öngörülen travmanın olup olmadığını denetleyen elektromekanik bir cihaz geliştirmiştir [47]. Omurilik yaralanması modellerinin tarihsel gelişimi **Çizelge 2.1**'de görülmektedir.

Çizelge 2.1. Spinal kord yaralanma modellerinin tarihsel gelişimi

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

2.3. Deneysel Spinal Kord Yaralanma Modelleri

Omurilik yaralanma modelleri Tator tarafından sınıflandırılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Deneysel spinal kord yaralanma modelleri

A-TRAVMATİK YARALANMA

1. Akut kinetik kompresyon
 - Kaf
 - Klip
 - Balon
 - Vertebral dislokasyon
 - İmpaktör
2. Akut statik kompresyon
 - Ağırlık uygulanması
3. Ağırlık düşürme
4. Akselerasyon – deselerasyon
5. Distraksiyon
6. Transeksiyon
 - Parsiyel, komplet
 - Lazer, bisturi

B- NON-TRAVMATİK YARALANMA

1. İskemi
 - Aort oklüzyonu
 - Selektif arter ya da ven oklüzyonu
 2. Tümör kompresyonu
 3. Kimyasal
-

2.3.1. Kliple Bası Modeli

Rivlin ve Tator tarafından 1978’de geliştirilmiş olup, mekanik travma yanında damarsal etkilenme ile iskemiye yol açar. Laminektomi sonrası lateralden konulan anevrizma klipi ile belli bir süre spinal kord sıkıştırılır. Klip kapanma gücü ve bası süresi değiştirilerek farklı şiddetlerde yaralanma oluşturulabilir. Klip basısı insandaki travma tipine daha uygundur. Küçük hayvanlara uygulanabilir [48].

2.3.2. Ventral Bası Modeli

İnsan spinal kord yaralanmasında omurga ve bağ dokusunun etkisi olduğu düşünülerek omurganın da hasar gördüğü bir model olarak öngörülmüştür. L1 düzeyinde lateral yaklaşımla vena kava ve abdominal aorta omurgadan sıyrılır. aort klempsi yerleştirilir. Bu modelde kompresyon gücü sabittir. Farklı tür deneklerde farklı yaralanma yaratır [49-51].

2.3.3. Kontrollü Kontüzyon

Spinal kordda oluşturulacak yaralanmanın şiddeti ve hızı değiştirilebilir. C6 ve C7 spinöz çıkıntıları klemplerle sabitlenip laminektomi yapmadan interlaminer aralıktan spinal kord yaralanması oluşturulur. Travmanın süresi ve hızı sabittir. İkincil travmaların önlenmesi, transduserlerin kullanılması ile her hayvan için travma şiddetinin nicel olarak belirlenmesi avantajdır.

2.3.4. Yüksekten Ağırlık Düşürme Modeli

Allen, 1911’de ilk kez kedi spinal korduna ağırlık düşürmüştür. Kinetik enerjinin tamamı spinal korda aktarılamamaktadır. Cismin cam tüpte sürtünmesi, çevre dokulara enerji dağılımı, cismin omuriliğe birden çok çarpması, omuriliğin farklı hayvanlarda, farklı segmentlerde farklı çapa, kan akımına ve BOS dolaşımına sahip olması ağırlık düşürme yönteminin dezavantajlarıdır.

Ağırlık düşürme modeli en yaygın kullanılan, kolay, nispeten tüm deneklerde değişmez yaralanma yaratan bir modeldir.

Klip ve balon ile bası modellerinde mekanik travma yanında damarsal yaralanma da söz konusudur [48].

2.3.5. Kesi Modeli

Spinal kordun bistüri ya da lazer ile yatay düzlemde kısmi ya da tam olarak kesilmesidir. Kordun rejenerasyonunu inceleyen araştırmalar için daha uygun olup klinik spinal kord yaralanmalarına benzememektedir. Lazer ile yapılan kesilerde cerrahi travma sabittir.

Bazı kesi modelleri özel traktusların kesilmesini hedefleyecek şekilde özelleştirilmiştir. Li ve ark. dorsal kolon lezyonu oluşturmak için elektrolitik teknik ile spinal kordun bir tarafındaki kortikal traktusu kesmişler ve trasplante ettikleri olfaktor hücrelerin bu traktusta rejenerasyona neden olup olmadığını araştırmışlardır [52].

2.3.6. Spinal Kord İskemi Modeli

Spinal kord iskemisi ile ilgili çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Sol renal arterin hemen distalinde aortun kapatılması spinal kord iskemisi oluşturur.

2.3.7. Radyofrekans Akımla Segmental Spinal Kord Yaralanması

Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha az invazdir. Mekanik olarak spinal kord elemanlarında tahribat oluşturmaz.

2.4. Spinal Kord Travmasında Hasar Mekanizmaları

Araştırmacılar çeşitli yöntemler kullanarak insan spinal kord yaralanmasına benzer deneysel model oluşturmaya çalışmaktadırlar. Çeşitli yöntem ve deney hayvanlarının denenmesi ile dokunun travmaya yanıtı incelenmiştir. Bu deney modellerinden elde edilen sonuçlar ile SKH'nın patofizyolojisi anlaşılmaya çalışılmıştır.

Hasarın fizyopatolojisi, primer ve sekonder olarak iki mekanizma ile oluşmaktadır.

2.4.1. Primer Hasar Mekanizmaları

Primer spinal kord hasarının 4 karakteristik mekanizması vardır (**Çizelge 2.3**).

Çizelge 2.3. Primer Hasar Mekanizmaları

Mekanik Güç	Hasar Mekanizması
1. Persistan kompresyon ile darbe	Patlama fraktürü, fraktür-dislokasyon
2. Transient kompresyon ile darbe	Hiperekstansiyon
3. Distraksiyon	Hiperfleksiyon
4. Laserasyon ve transeksiyon	Patlama fraktürü, laminar fraktür, ateşli silah yaralanması

SKH'nda en sık görülen mekanizma persistan kompresyon ile darbedir. Akut disk rüptüründe, fraktür-dislokasyonda ve retropulse kemik fragmanın spinal korda bastığı patlama kırıklarında belirgindir. İkinci mekanizmada (transient kompresyon ile darbe) geçici bir süre kompresyon mevcuttur ve altta yatan dejeneratif servikal omurga hastalığı ön plandadır.

Spinal kordun aksial planda kuvvetle gerilmesine yol açan distraksiyon tipi üçüncü mekanizmada, spinal kordun gerilmesi ve yırtılması söz konusudur. Son mekanizma laserasyon ve transeksiyondur.

Laserasyon, mermi ile yaralanma, kemik fragmanların dislokasyonu veya spinal korda ciddi gerilme sonucu meydana gelir ve minör hasardan komplet kesiye kadar çeşitli derecelerde olabilir [40].

Spinal kord içindeki kanama, mekanik hasar sonrası erken dönemde ortaya çıkarken, kan akımının kesintiye uğraması daha geç oluşur, hipoksi ve iskeminin neden olduğu lokal enfarkt ile sonuçlanır. Gri cevherin hasarlanması, nöronların fiziksel olarak kesintiye uğraması ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Hasarlanan alandaki ödem ve makrofajlar, sinir iletisinin bozulmasında diğer etkenlerdir [53].

2.4.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları

Sekonder hasar, vasküler değişiklikleri (ödem, iskemi, hipoksi), eksitotoksik biyokimyasal olayları (serbest radikaller ve NO formasyonu, proteaz salınımı) ve hücrel cevabı (immün hücrelerin invazyonu, glial hücrelerin aktivasyonu, nöronların ölümü) içerir. Travma sonrası oluşan sekonder hasar, başlangıçtaki primer hasarın çevresindeki alanda nöral dokunun hasar görmesine ve ölümüne neden olur. Travma çevresinde yer alan bu risk altındaki alanın sekonder hasardan kurtarılması veya sekonder hasarın en alt düzeye indirilmeye çalışılması, spinal kord hasarı için geliştirilen tedavilerin temel hedefidir.

Sekonder hasar oluşumunda etkili olan mekanizmalar **Çizelge 2.4**'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Spinal kord yaralanmasında sekonder hasar mekanizmaları

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)

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

Lokal Vasküler Hasar

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

Biyokimyasal Değişiklikler

Eksitotoksitite-glutamat
Nörotransmitter birikimi
Ketakolaminler-noradrenalin, dopamin
Araşidonik asit salınması
Serbest radikal üretimi
Eikosonoid üretimi
Prostaglandinler
Lipid peroksidasyonu
Endojen opioidler
Sitokinler

Elektrolit Değişiklikleri

İntrasellüler kalsiyumda artış
Ekstrasellüler potasyumda artış
İntrasellüler sodyumda artış

İnflamatuvar Yanıt

Serbest radikal üretimi
Makrofajlar
Aksonal yıkım, miyelin artıklarının salınımı
Sitokinlerin salınması
Glial hücre aktivasyonu
Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler
Wallerian dejenerasyon

Ödem

Apoptozis

Enerji metabolizmasında kayıp

ATP üretiminde azalma

2.4.2.1. Sistemik ve Lokal Vasküler Etkiler

Nörojenik şok, vazomotor yanıtın ciddi paralizisinin neden olduğu yetersiz doku perfüzyonu olarak tarif edilmektedir ve kardiyak output'un depresyonu ve periferik rezistanstaki azalma ile oluşan hipotansiyon ve bradikardi ile karakterizedir. Bu etkiler sempatik tonusun azalması ve artan vagal tonusa bağlı miyokardiyal fonksiyon bozulması ile ilişkilidir. Nörojenik şok tablosu, tedavi edilmezse nöral doku hasarını şiddetlendirir [40].

SKH'ında, erken ve geç safhalarda vasküler hasara bağlı ciddi değişiklikler oluşmaktadır. En sık görülen etki, özellikle gri cevher ve spinal kord santralinde görülen hemorajidir.

Başlangıçta vasküler hasar, hemorajik ve iskemik zedelenmeyi beraberinde getirmektedir. Mekanik travmaya bağlı olarak mikrosirkülasyonu oluşturan venüller ve kapillerdeki hasar, özellikle travma bölgesinde oluşmakta ve rostral-kaudal olarak uzanım göstermektedir. Nöronların yüksek metabolik ihtiyaçları gri cevheri iskemik hasara son derece duyarlı hale getirir. Bununla birlikte normalde spinal kord mikrovasküler hemodinamiklerin sıkı kontrolünü sağlayan otoregülatuar mekanizmaların kaybı, bu hassasiyeti daha da şiddetlendirir. Mikrosirkülasyonun bozulmasına, direkt mekanik etkiye bağlı ortaya çıkan vazospazm yanında, travma sonrası açığa çıkan katekolaminler, glutamat ve prostoglandinlere bağlı ortaya çıkan vazospazm da etkili olmaktadır. Spinal kord hasarında ortalama sistemik arteriyel kan basıncında ani fakat geçici bir artışı derin bir hipotansiyon takip eder. Travma sonrası 2 saat içinde kan akımı önemli şekilde düşmekte ve spinal kord iskemisini arttırmaktadır. Kan basıncı arttırılmaya çalışılırken normal sınırların üzerine çıkarılmasından kaçınılmalı, intramedüller hiperemi ve hemorajiyi önlemek amacıyla kan basıncı normotansif seviyede tutulmalıdır [54].

İskemik hasar;

1. Kan- Spinal kord bariyerinin bozulmasına bağlı vazojenik ödem
2. Dokuların doğrudan basısı
3. Gri cevherin çoğunu besleyen arteriyel damar ağının vazospazmı
4. Tromboz veya trombosit agregasyonu
5. Eksitatör aminoasitler

nedenleri ile ortaya çıkabilir.

İskemi dönemini takiben spinal kord reperfüzyon dönemine maruz kalır. Bu dönemde fagositik hücrelerin aktivasyonu ve hemoglobin degradasyonu sırasında yüksek konsantrasyonda bulunan metal iyonlarının serbestleşmesi ile sekonder hasarı daha da alevlendiren serbest radikaller belirgin biçimde artar. Hücre membranları, serbest radikal hasarına duyarlı olan çoklu doymamış zincirli yağ asitleri açısından zengindirler.

Hem oksijenaz (HO) hem'in biliverdin, CO ve demire degradasyonunda yer alan hız kısıtlayıcı bir enzimdir. Bu arayol safra pigmentlerinin güçlü bir antioksidan olduğunun gösterilmesi açısından önemlidir. Safra pigmentlerinin serbest radikal hasarına bağlı hücre hasarına karşı hücrel savunmada önemli fonksiyonları vardır [55]. SSS'de HO'ın alt tipleri; mikrogial formu olan HO-1, yapısal formu olan HO-2 ve HO-3 formu bulunur. Spinal kord hasarına bağlı posttravmatik kanama HO-1'in güçlü bir indükleyicisidir [56]. HO-1 overekspresyonu yapan transgenik farelerde serebral iskemiden sonra hücre hasarında bir azalma olduğu bildirilmiştir [55, 57].

2.4.2.2. Eksitotoksisite ve Elektrolit Bozuklukları

Glutamat SSS'nin en önemli eksitator nörotransmitteridir. Sinaptik aralığa salınan glutamat postsinaptik uçta bulunan spesifik reseptörleri aktive ederek etkilerinin ortaya çıkmasını sağlar. Sinaptik aralığa salınan glutamat normal koşullarda geri alım taşıyıcılarla hızla ortamdaki uzaklaştırılır. Bu taşıyıcılar nöron ve glial hücrelerin membranlarında bulunur. Glial hücre içine alınan glutamat glutamin sentetaz enzimi aracılığı ile glutamine dönüştükten sonra tekrar glutaminerjik sinir uçlarına gönderilir.

Glutamat spinal kordda arka köklerde yüksek konsantrasyonda bulunur. Glutamatın duyuşal iletimin sağlanmasında, motor aktivite ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Aspartatın da spinal kordda eksitator nöronlarda iletilmesi, motor ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol alması olasıdır [58].

Glutamatın hücre membranındaki reseptörleri aktive etmesi ile hücre içine sodyum girişi artar, sitotoksik ödem başlar.

Bunun yanı sıra kalsiyumun hücre içine akımı artar. Hücre içi kalsiyumun artması, kalsiyuma bağımlı proteazların ve lipazların aktivasyonuna yol açar. Bu enzimlerin aktivasyonu hücre membranının ve nöroflamanların hasarına neden olur.

Glutamat reseptörleri metabotropik ve iyonotropik reseptörler olmak üzere ikiye ayrılır. Metabotropik reseptörler uyarıldıklarında hücre depolarından kalsiyum serbestlenmesine yol açar. İyonotropik reseptörler ligand kapılı iyon kanallarıdır. Bu reseptörler kendilerini selektif olarak aktive eden bileşiklere göre 3 alt tipe ayrılır:

1. N-metil D-aspartat (NMDA),
2. Delta-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol-propionik asit (AMPA),
3. Kainat reseptörleridir (Quisqualat reseptörleri).

NMDA reseptörleri temel olarak hücre içine kalsiyum iyonunun girişine aracılık eder. AMPA reseptörleri GLUR1-4 (Glu RA-D) adlandırılan 4 alt üniteden oluşur. Bu alt grup esas olarak sodyum iyonu geçişine aracılık eder.

En aktif olanı NMDA reseptörüdür. Travma sonucu fazla miktarda eksitotoksik aminoasit salınımı, akut hücre şişmesine yol açan sodyum ve klorun hücre içi artışı ve hücre içi kalsiyum artışı izlenir. Bu durum lipolitik (lipaz ve fosfolipaz) ve proteolitik (Calpain I ve diğer kalsiyum bağımlı proteazlar) enzimleri aktive eder. Proteolitik enzimler plazma membranını ve hücre iskeletini yıkar. Lipolitik enzimlerin aktivasyonu ise nöral membrandaki fosfolipidlerden araşidonik asit salınmasına, yani araşidonik asit döngüsünün başlamasına neden olur. Bu döngüde prostoglandinler, lökotrienler ve tromboxanlar ortaya çıkar. Serbest radikal ve lipid hidroksiperoksidlerin yapımıyla kısır bir döngü içinde ilerleyerek nöron ölümüyle sonuçlanır.

Sodyum dengesinin bozulması beyaz cevherin aksonal ve glial yapılarının hasarında önemlidir. Aksiyon potansiyeli voltaj kapılı sodyum (Na) kanallarının aktivasyonu aracılığıyla geçici olarak sodyumun hücre içine akışına yol açar. Hücre içine klor (Cl) iyonu suyu da beraberinde çekerek akut hücre şişmesine neden olur. Değişen membran polarizasyonu kalsiyumun (Ca) hücre içine girmesine ve eksitatör aminoasitlerin sinaptik veziküllerden salınmasına yol açar [6].

Hücre fonksiyonları için hücrenin Na-K gradyanlarının dengelenmesi gerekir. İntrasellüler Na konsantrasyonu ekstrasellüler alandan daha düşükken, K konsantrasyonu yüksektir. Gradyentin devamı için hücre membranı ve bu membrana bağlı enzim olan Na/K ATPase aktivitesinin normal olması gerekir. SKH'nda aksonal iletim kesintiye uğrar. Akut evrede iletimin kesintiye uğraması özellikle elektrolit değişikliklerine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ekstrasellüler K artışı aşırı depolarizasyon ve spinal şoktan sorumlu tutulmaktadır. Membran bozukluğu ile birlikte olan daha şiddetli mekanik aksonal yaralanmada kalıcı iletim bozukluğu görülebilir [59].

Spinal kord hasarı, doku magnezyum (Mg) konsantrasyonunu da etkiler. Mg yaklaşık 300 enzimin maksimum aktivitede çalışabilmesi için gerekli olan bir iyondur. Oksidatif fosforilasyonla yüksek enerji metabolitlerinin üretimi için gereklidir. Fosfolipidlerle stabil kompleksler oluşturarak, hücre membranının hareketini, permeabilitesini ve hücre membranına bağlı enzimlerin aktivitesini etkiler. Protein sentezinde temel bir role sahiptir ve doğal bir Ca iyonu antagonistidir.

Kalsiyumun hücre içi artışı, iskemi ve travmada daha fazla olmak üzere, tüm nöral yaralanmalarda başrol oynamaktadır. Ca iyon konsantrasyonu ekstrasellüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Spinal kord yaralanmasında, bu büyük gradient farkı ile hücre içine Ca iyon girişi olur.

Hücre içinde aşırı Ca birikimi sonucunda, serbest yağ asitlerinin salınımı, fosfolipaz A2 aktivasyonu, Ca bağımlı Adenozin 5'trifosforilaz aktivasyonuna bağlı enerji rezervlerinin tükenmesi, toksik eikozonoid sentezi, serbest radikal oluşumu, reseptör proteinlerin kovalent modifikasyonu, hücre iskeletinin mikrotübül ve nörofilament komponentlerinin modifikasyonu, mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması, aksonal dejenerasyon, proteaz, fosforilaz, endonükleaz gibi litik enzimlerin aktivasyonu meydana gelir.

2.4.2.3.Serbest Radikal Oluşumu ve Lipid Peroksidasyonu

Serbest radikaller dış yörüngelerinde çiftlenmemiş elektron bulunduran moleküllerdir. Bu tek elektron, çiftlenme eğiliminde olduğu için reaktiftir ve canlı hücrede bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir.

Normal koşullarda oksijene dört adet elektron eklenebilir. Bir elektron eklenmesi süperoksit anyonun (O_2^-) oluşumuna neden olur. İki elektron eklenmesi hidrojen peroksit (H_2O_2), üçüncü elektronun eklenmesi hidroksil radikalinin ($\bullet OH$) oluşmasına neden olur. Son olarak, dördüncü elektron eklenirse su (H_2O) oluşur. Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali, enerji ihtiyaçlarını diğer moleküllerden elektron alarak giderdikleri için, bunlara okside edici ajanlar adı verilir. Bu üç serbest radikalın oluşmasını serbest veya proteine bağlı demir katalizleyebilir. Oksijenin (O_2) nitrik oksit (NO) ile birlikte interaksiyonuyla yapılanan diğer bir yüksek düzeyde reaktif madde peroksinitrittir.

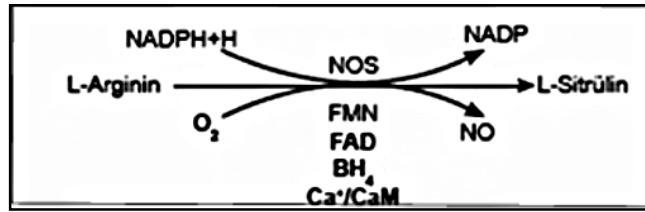
Reaktif oksijen türevleri arasında süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH), peroksil radikali ($RCOO$), Nitrik Oksit (NO) ve peroksinitrit ($ONOO$) sayılabilir. Vücudumuzda oluşabilen bu radikaller içinde O_2^- ve NO devamlı ve yoğun olarak üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler.

NO , küçük molekül ağırlıklı ve renksiz, kokusuz, kısa yarı ömre sahip toksik bir gazdır. Küçük boyutu ve nötral yükünden dolayı, NO hücre zarından içeriye girer, otokrin ve parakrin davranış göstererek efektör molekül olarak rol oynar. Bazı metal kompleksleri (hemoglobin/miyogloblin, guanilat siklaz, sitokrom p450) ve yüksek enerjili radikallerle direkt olarak tepkimeye girer. Endotelial hücre relaksasyonunun fizyolojik mediatörü olarak tanımlanmış ve trombosit agregasyon ve adezyonunu önlemede, vazodilatasyonda, nörotransmisyon ve nöromodülasyonda rol aldığı ve mikrobisitik, sitostatik, sitotoksik etkileri olduğu gösterilmiştir. NO , O_2 radikali veya moleküler O_2 ile reaksiyona girerek reaktif nitrojen türleri ($RNOS$) adı verilen çeşitli reaktif ara ürünlerin oluşumuna neden olur.

NO 'ın, $RNOS$ oluşumu aracılığı ile indirekt etkileri ortaya çıkar. Biyolojik moleküllerin oksidasyonu, nitrozasyonu, nitrasyonu ve nitrolizasyonu şeklinde olabilir.

Oluşan bu RNOS, oksidatif ve nitrozatif stres oluşturarak toksik sonuçlara neden olarak inflamasyon, dolaşımsal şok ve iskemi-reperfüzyon fizyopatolojisinde NO'nun yol açtığı sitotoksisitenin temelini oluşturur.

Oksijen radikallerinin aksine, insan vücudunda NO sentezini sağlayan mekanizmalar oldukça kısıtlıdır. Vücuda giren nitro bileşiklerinin metabolize edilmesi haricinde, endojen NO oluşturan tek kaynak nitrik oksit sentaz (NOS) enzimleridir. NO endotelyum ve sinir hücreleri olmak üzere makrofajlar, trombositler ve düz kas hücrelerinde meydana gelir. Sentezi sırasında kalmoduline (CaM), substrat olarak O₂ ve NADPH'a, kofaktör olarak ise tetrahidrobiopterin (BH₄), FAD (flavin adenin dinükleotid), FMN (flavin mononükleotid) ve hem'e (protoporfirin IX) ihtiyaç vardır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Nitrik Oksit sentezi

Bu enzimatik reaksiyonu katalizleyen NOS sitokrom p-450 homologudur ve Konstitütif NOS (cNOS), Nöronal NOS (nNOS; Tip I), Endotelyal NOS (eNOS; Tip III), İndüklenebilir NOS (iNOS; Tip II) olmak üzere izoformları mevcuttur.

Artmış hücre içi kalsiyum cNOS aktivasyonuna yol açar ve düşük miktarda kısa süreli NO sentezine yol açar. iNOS endotel hücreleri, makrofajlar, hepatositler ve vasküler düz kas hücrelerinde bulunur. Özellikle septik şok patogenezinde önemlidir. Protein sentez inhibitörleri ve antiinflamatuvar ilaçlar (glukokortikoidler) indüksiyonu yavaşlatabilir ya da durdurabilir.

SSS tüm nöronlarında nNOS bulunmaktadır. Bazı astrositlerin eNOS aktivitesine sahip olduğu ve hipokampal ve striatal nöronlarda eNOS'un bulunduğu gösterilmiştir. Normal beyin fonksiyonu için iNOS gerekli değildir. Fakat serebral iskemi gibi patolojik durumlarda astrositlerden, nöronlardan ve endotelyal hücrelerden iNOS aracılı NO salınmaktadır [60].

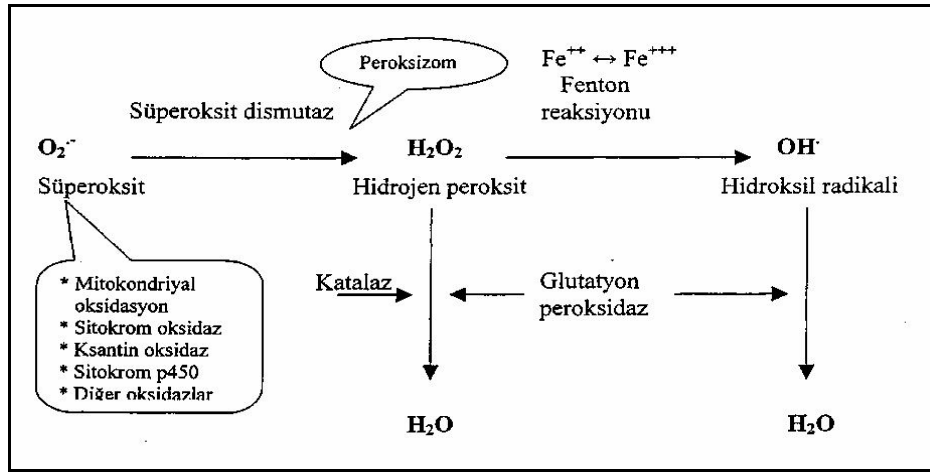
iNOS aracılığı ile üretilen NO'nin daha yüksek miktarlarda olduğu ve oksidasyon, nitrozasyon ve nitrasyon olan indirekt etkilerinin buna bağlı olarak ortaya çıktığı gösterilmiştir. nNOS ve eNOS aracılığı ile NO radikalinin kısa süreli ve az miktarlarda üretildiği, dolayısıyla direkt etkilerinin görüldüğü bildirilmiştir.

iNOS patolojik süreçlerde inflamatuvar mediatörler ve sitokinler tarafından stümülasyonu sonucu makrofajlar ve glial hücreler, endotelial hücreler, fibroblastlar, nöronlar ve vasküler düz kas hücreleri tarafından üretilir. Özellikle patolojik koşullarda iNOS'a bağlı NO radikalinin aşırı üretimi ve peroksinitrit oluşumu; protein hasarı, lipid peroksidasyonunun artışı, DNA hasarıyla birlikte "Poly-ADP Riboz Sentetaz" (PARS) aktivasyonu ile hücrel enerji kaybı, mitokondrial elektron transport zinciri enzimleri olan kompleks 1-2 ve akonitaz'ın demir sülfür merkezlerine etki ederek inhibisyonu ile mitokondrial respirasyonun durması, DNA replikasyonunun inhibisyonu ile hücre ölümüne neden olur [61]. Peroksinitrit ve konjuge asidi, lipidler, tiyoller, aminoasit rezidüleri, DNA bazları, çinko yapılar ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar reaksiyona girebilen okside edici ajanlardır. Bunların sonucunda da lipid peroksidasyonu başlar.

Serbest radikaller sinyal iletiminde hücrel iletilci, apoptoz ve fizyolojik proteolizin mediatörleri olup kemotaksisi, sitokin üretimini, mikrovasküler tonüsü düzenlerler. Bu nedenle gerek enfeksiyöz gerekse de enfeksiyöz olmayan inflamasyonda hücre savunma sisteminin önemli mediatörleridir. Ama belirli durumlarda doku ve hücrelere zarar verme potansiyeline sahiptirler. Çoğu durumlarda antioksidanlarla nötralize edilirler. Serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirilme hızı dengede olduğu sürece, organizma bu bileşiklerden etkilenmez. Buna karşılık, savunma azalır veya bu zararlı bileşiklerin oluşum hızı sistemin savunma gücünü aşarsa, denge bozulur ve serbest radikallere bağlı zararlı etkiler ortaya çıkar. Oksijen radikallerinin fazla yapımının neden olduğu etkiler oksidatif stres olarak adlandırılır.

Antioksidanlar, okside edilebilir substratlarla kıyaslandığında çok düşük konsantrasyonlarda olduklarında bile substratın oksidasyonunu önleyen ya da geciktirebilen maddelerdir.

Temel antioksidan savunma enzimleri süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz'dır. Enzimatik savunma sistemi ilk basamağında süperoksit dismutazın yer aldığı bir dizi reaksiyonla hücreleri oksidatif strese karşı korur (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Oksidatif strese karşı enzimatik savunma mekanizmaları

İskemi sırasında dokuda Adenozin trifosfat (ATP) kullanılmakta ve Adenozin monofosfata (AMP) dönüşmekte, bu da nükleotidlerine yıkılarak hipoksantin oluşmaktadır. Ksantin Dehidrogenaz (XD) ile ksantine sonrasında ürik asite çevrilebilmektedir. Fakat iskemi sırasında ATP depoları tükenir böylece hücre dışına Ca pompalanması çalışmamaktadır. Hücre dışına pompalanamayan Ca proteazları aktive ederek ksantin dehidrogenazı (XD) ksantin oksidaza (XO) çevirmektedir. XO tekrar oksijenli ortam oluştuğunda hipoksantinle reaksiyona girerek ksantini oluşturmakta fakat bu sırada O_2 ortaya çıkmaktadır. Bu da süperoksit dismutaz (SOD) katalizörlüğü ile hızla dismutasyona uğrararak hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüşmektedir. H_2O_2 de katalazla suya dönüşmektedir. Fakat H_2O_2 aşırı miktarda oluşursa ortamdaki demir iyonları ile hidroksil radikallerini oluşturmakta daha sonra bu radikal de başta lipidler olmak üzere ortamdaki organik bileşikler okside edip parçalamaktadır.

Patolojik durumda serbest radikaller antioksidan aktivitenin üzerine çıkmakta, hücre ve dokuların ana yapımında zedelenmeye neden olmaktadır.

Biyomembranlar ve hücre içi organeller membran fosfolipidlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara karşı hassastırlar. Hidroksil radikalının membran fosfolipidlerinden çoklu doymamış yağ asitleri üzerindeki etkisi, hücresele oksidatif hasarda başlıca etkin faktör olarak yorumlanmaktadır. Serbest radikal hasarının en önemlilerinden olan lipid peroksidasyonu sonucunda membran fonksiyonu bozular, lizozomal frajilite artar, mikrozomal enzimlerde değişiklik ile membrandaki iyon pompaları ve permeabilite değişir. Sonuçta membrana bağlı enzimler inaktive olur, protein sentezi inhibe olur, DNA replikasyonu önlenir, mitokondrial solunum durur. Membranda yağ asidi yan zincirinin devamlı aldehit ve pentan gibi hidrokarbonlar üretmesi membran bütünlüğünün tamamen kaybolmasına yol açar. Bu yolla lizozom membranlarının yırtılmasıyla hidrolitik enzimler hücrenin geri kalan kısmına boşalır ve hasarın daha da artmasına yol açar [6].

Lipid peroksidasyonunun yapısal hasara yol açmasının yanı sıra yapısal hasarların da lipid peroksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Travmanın etkisi ile membran stabilizasyonunu sağlayan Na/K-ATPaz enziminin yıkılması sonucunda, hücre içinde Ca artar ve mitokondride oksidatif fosforilasyonunun durmasına, ATP yapımının azalmasına, fosfolipazların aktivasyonuna neden olur. Ayrıca primer hasar bölgesinde biriken lökositlerden fosfolipazların aktivasyonu membran fosfolipidlerinden araşidonik asidin salınmasına neden olur. Araşidonik asitten lipooksijenaz ve siklooksijenaz yolları ile lökotrienler, prostoglandinler ve tromboksan oluşur. Oluşan bu eikozonoidler, vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu tetikleyerek iskemiye neden olurlar. İskemi ise serbest radikallerin oluşmasına ve lipid peroksidasyonu ile hasarın ilerlemesine yol açar [62].

Bir grup araştırmacı makrofaj ve mikrogliaların Tumor Nekrozis Faktör (TNF) ve NO sentezini arttırarak oligodendrosit lizisi, nöronal ölüm ve demiyenilizasyona yol açtığını savunurken; diğer bir grup ise bu hücrelerin nöronal rejenarasyona katıldıklarını savunmaktadır [40].

SKH sonrası nötrofiller ve diğer reaktif hücreler TNF- α , interlökinler ve interferonlar gibi inflamatuvar yanıtta aracılık eden sitokinleri üretirler. Fosfolipazlar araşıdonik asidi hücre membranından ayırabilir. Araşıdonik asidin siklooksijenaz metabolizması tromboksan, prostasiklin ve prostoglandinlerin meydana gelmesine neden olur ki bu ürünlerin hepsi inflamatuvar süreçlere etki eder. Tromboksan A2 (TxA2) trombosit agregasyonu ve vazokonstriksiyon ile venöz tromboz ve iskeminin kötüleşmesine neden olurken, Prostrasiklinin (PGI2) inflamasyonun olduğu bölgede damar geçirgenliğini ve ödemi arttırma gibi vazodilatatör özellikleri vardır.

Sitokinler Siklooksijenaz-2 (COX-2) salınımına neden olarak, araşıdonik asidin, damar geçirgenliği ve trombosit agregasyonuna aracılık eden proinflamatuvar prostanoidlere (prostaglandinler, prostasiklin ve tromboksanlar) yıkılmasını sağlar. Ayrıca artmış hücre içi Ca fosfolipazları aktive edebilir. Bu da hücre membranındaki fosfolipidlerden araşıdonik asitin oluşmasına neden olur. Spinal kord hasarından sonra hem COX-1 hem de COX-2'nin arttığı gösterilmiştir. Ancak yüksek düzeyde indüklenebilir COX-2 izoformunun üzerinde daha fazla durulmuştur [6].

Sitokinlerden TNF- α aktive lökositlerin kandan spinal kord içine migrasyonuna aracılık eder ve ilave sitokin üretimini stimüle eder. Hayvan deneylerinde TNF- α 'nın hem nörotoksik hem de nöroprotektif özelliklerinin olduğu açığa çıkmıştır. Örneğin SSS hasarından sonra TNF- α 'nın antikorlarla veya diğer sitokinlerle inhibisyonunun fonksiyonel iyileşmeye katkı sağladığının gösterilmiş olması TNF- α 'nın sitotoksik bir rolünün olduğunu akla getirir. Tersine in vitro yürütölen bazı çalışmalarda ise TNF- α 'nın eksitotoksik ölüme karşı nöroprotektif etkisinin olduğu gösterilmiştir [6].

2.4.2.5. Apoptoz

Apoptoz ölen hücrenin fagositozu ile sonuçlanan, nükleer kromatinin kondensasyonu, sitoplazmik organellerin paketlenmesi ve plazma membranında değişiklikler ile karakterize bir hücre ölümü şeklidir. Apoptoz intrasellüler proteolitik bir süreç tarafından regüle edilir. Apoptoz, protein sentezi ve enerji gerektiren hücrenin aktif ölümüdür [63]. Primer olarak sistein proteaz enzimi olan kaspaz ailesinin üyelerinin, proteolitik olarak birbirlerini ve birçok intrasellüler anahtar hedef proteinini bölerek aktiflemesi ile hücre ölümünün gerçekleştirilmesi esasına dayanır. Apoptoz sitokinlerin salınımı, inflamatuvar hasar, serbest radikal hasarı ve eksitotoksiteteyle bağlı olarak tetiklenebilir. İnsanlarda travmatik SKH sonrası apoptozun varlığı gösterilmiştir. SKH, özellikle kaspaz enzim aktivasyonunu anlamlı derecede arttırmaktadır [40].

Kaspaz 1 akut SSS hasarında (iskemi ve travma) olduğu gibi kronik nörodejenerasyon (Amyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson, Huntington hastalığı) modellerinde de kritik bir apoptoz mediyatörüdür. Hayvan modellerinde kaspaz-1 aktivasyonu gösterilmiştir ve kaspaz inhibisyonunun doku hasarını azaltmakla kalmayıp nörolojik fonksiyonları düzelttiği de görülmüştür. Kaspaz-3 aktivasyonunun SKH sonrası iskemi ve travmada rol aldığı gösterilmiştir.

Nöronal koruma çok önemlidir, çünkü spinal korddaki nöronların rejenerasyon yeteneği yoktur. Glialın rejenerasyon olabileceğine rağmen glial ölümü inhibe etmek nöronal korunmayı en azından iki benzer mekanizma ile destekler. Birincisi; glia hasarlı nöronlara nörotrofik ve metabolik destek sağlar. İkincisi; apoptoz önlenerek ölen hücrelerden; sitokinler, serbest radikaller gibi ek apoptoz mediyatörlerinin salgılanması ve diğer komşu hücrelere fazladan toksik etki oluşması önlenir [64].

2.5. Spinal Kord Hasarının Patolojisi

Spinal kord hasarında nöropatolojik bulgular hasarı oluşturan etkenin şiddetine, süresine ve yaralanmadan sonra geçen zamana bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Patolojik süreç akut, subakut ve geç faz olarak 3 kısımda incelenir.

2.5.1. Akut Faz

Akut hasarın en erken makroskopik bulguları zedelenmenin şiddetine bağlı olarak kordda yumuşama, yuvarlaklaşma ve pembe-kırmızı renk değişikliği oluşmasıdır. Bu renk değişikliği mikro kanamalara ve venöz staza bağlıdır. Erken döneme ait morfolojik değişiklikler travmayı takiben 4. saatte başlar, 8 ila 24 saat arasında nekroz ışık mikroskobu ile görülebilir düzeydedir. İlk belirtiler gri cevherde peteşial kanamalar, beyaz cevherde ödemdir (**Çizelge 2.5**).

Çizelge 2.5. Akut histopatolojik değişiklikler.

Akut Histopatolojik Değişiklikler

1. Santral hemoraji (özellikle gri maddede kapiller, venüller ve arteriollerden kaynaklanır. Nadiren büyük hematomiyeli oluşur)
 2. Uzak kanamalar
 3. Santral hemorajik nekrozis
 4. Posttravmatik infarkt
 5. Subaraknoid kanama
 6. Subdural veya ekstradural hematomlar
 7. Ödem (lokal veya yaygın)
 8. Aksonal hasarlanma [transeksiyon, aksolemma yırtılması, şişme, dev aksonların oluşması, granüler kayıp (Kromatolizis), organellerin toplanması]
 9. Myelin kılıfı hasarı [rüptür, veziküler hasar (vakuolizasyon), periaksonal boşluklar]
 10. İnflamasyon (makrofaj ve mikroglia)
-

2.5.2. Subakut Faz

Subakut dönem 5. gün ile 3 ay arasındaki dönemi kapsar. Ödem bu dönemde büyük oranda azalmıştır. Küçük boyuttaki kanamalar geri emilmiştir. Büyük alanları işgal eden kanamalar ise organizasyonla giderilmeye çalışılır. Bu nedenle mevcut damarlarda rekanalizasyon izlenir. Eğer santral hemorajik nekroz oluşmuşsa, onarım boru şeklinde kistik boşluk olarak gerçekleşir. Nekrotik dokuların rezorbsiyonu ile Lückenfelder denilen boş kistik alanlar oluşur [59]. Damarların çoğunun lümeninde fibrin trombüsleri vardır.

Akut dönemdeki Polimorf Nüveli Lökosit (PNL) infiltrasyonunun yerini lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu almıştır. Lipit yüklü (ölen nöron ve parçalanmış myelini fagosite etmiş) veya kanamayı fagosite etmiş hemosiderin yüklü makrofajlar çoğunluktadır. Fagositik hücreler hasarın olduğu alanda özellikle damarlar çevresinde rozetler halinde gruplanırlar [65].

Onarım dokusu hem glial hücrelerin hem de genç myofibroblastların üremeye başlamasıyla gelişir. Genç myofibroblastlar zamanla kollajen üreten olgun fibrositlere dönüşür ve ortamda nedbe dokusu meydana gelir. Aktive olmuş mikroglia ve astrositler reaktif gliosis oluşturmaya başlarlar. Mikroglia, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Hasara cevap olarak astrositler hipertrofi ve proliferasyon gösterir. Reaktif astrositler lezyon yanında birinci haftada birikmeye başlar 14. günde pik yapar ve 28. güne kadar görülebilir [66].

Nöronda sitoplazmanın belirgin homojenizasyona uğradığı ve şiştiği, çekirdeğin ise kenara itildiği santral kromatolizis görülür. Travmadan etkilenen nöronların aksonlarında kesi olduğunda aksonun distal kısmında Wallerian dejenerasyon oluşur. Wallerian dejenerasyon da parçalanmış akson ve myelinin makrofajlar tarafından fagosite edilerek ortamdaki uzaklaştırılmasıdır [32, 59, 66].

2.5.3. Kronik Faz

Hasar sonrası 3-9 ay arasında izlenen değişikliklerdir. Travma bölgesinde duramater ve araknoidal membran kalınlaşmıştır.

Eski hemorajiler nedeniyle kahverengi-gri renk almıştır. Mikroskopik olarak fibrozisin geliştiği ve meninjal hücrelerin proliferere olduğu görülür. Adheziv araknoidit tabloya daima eşlik eder.

Polimorf nüveli lökositler kronik fazda yerlerini makrofajlara bırakırlar. Makrofajlar da oluşan debris fagosite eder. Travmanın olduğu yerde kaviteler gelişir, bunlar birleşerek santral kavitasyonu oluştururlar. Değişik derecelerde intramedüller skar ve fibrozis gelişir. Travmanın en ciddi hasar oluşturduğu bölgede glial ve nöronal hücreler hasara uğramış olduğundan iyileşme yalnızca genç bağ dokusu hücreleriyle yani skar dokusu ile gerçekleşir. Travma hasarının daha hafif olduğu durumlarda ise skar dokusunun çevresinde astrositlerin artışına bağlı astrogliozis meydana gelir.

Wallerian dejenerasyon bu dönemde de devam eder. Geç lezyonun önemli bir komponenti miyelin kaybıdır. Demiyelinizasyon ilk 24. saatte başlar, 2. haftada maksimum seviyesine ulaşır. Remiyelinizasyon ise 3. haftada başlar ve rejenerasyon üç yıla kadar yavaş hızla devam eder [59, 66] (**Çizelge 2.6**).

Çizelge 2.6. Kronik dönemdeki patolojik değişiklikler

Kronik Dönemdeki Patolojik Değişiklikler

1. Santral kavitasyon
 2. Aksonların subpial rimlerinin kalıcı olması
 3. Post-travmatik infarkt (hasarlı bölgede veya uzağında)
 4. Post-travmatik siringomiyeli
 5. Kistik miyelomalazi
 6. Demiyelinizan ve diskomplet nekrotizan alanlar
 7. İnflamasyon-makrofaj
 8. Wallerian dejenerasyon
 9. Skar ve gliozis
 10. Araknoidit
 11. Atrofi
 12. Rejeneratif süreç (aksonlarda, schwann ve ependim hücrelerde proliferasyon)
-

2.6. Modern Farmakoterapi Çalışmaları

Spinal kord yaralanmaları üzerine yapılan araştırmalar olmasına rağmen, tedavi seçeneği halen bulunamamıştır. SKH patofizyolojisinin iyi anlaşılması, hasardan geriye kalan spinal kordun fonksiyonel bütünlüğünü azami düzeye çıkarmak için birçok nöroprotektif tedavinin klinik uygulamalarına hız kazandırmıştır. Birincil hasar beklenmedik nedenlere bağlı olduğu için genellikle engellenemez ve şiddeti değiştirilemez. Bu nedenle birincil hasarın medikal ya da cerrahi tedavisi yoktur, ancak ikincil hasarı engellemek teorik olarak mümkündür. Günümüzde akut spinal kord yaralanması olan hastalara medikal ve cerrahi müdahalelerin amacı ikincil hasarı en aza indirerek mekanik hasardan kurtulan nöronal yapıların korunmasıdır [59].

Birçok ajanın tedavide ümit verici etkilerine rağmen, yalnızca metilprednizolon geniş klinik çalışmalarda kabul gören tedavi şekli olmaya devam etmektedir [67].

Spinal kord travması, sempatik tonus kaybına bağlı olarak, vasküler tonusta azalma ve kanın periferde göllenmesi ile birlikte hipotansiyon, bradikardi ve soğuk ekstremitelerden oluşan triad tablosu ile karşımıza nörojenik şok tablosu ile çıkabilir [1]. Bu aşamada etkili tedavi, iskemik hasarın şiddetlenmesine neden olabilecek sistemik hipotansiyon ve hipoperfüzyondan korunmaya yönelik olmalıdır [1, 67]. İnvaziv hemodinamik monitörizasyon ile vasopressör destek ve sıvı tedavisinin özenle uygulanması, tedavi sürecinin ilk basamağını oluşurmaktadır [67]. Resüsitasyon sonrasında nörolojik fonksiyonları geliştirmeye, bu fonksiyonların devamına yönelik cerrahi ve/veya spesifik patofizyolojik hedeflere yönelik farmakolojik tedavi yöntemleri değerlendirilmelidir [1].

2.6.1. Kortikosteroidler

Metilprednizolon (MP) sentetik bir glukokortikoid olup uzun zamandır beyin ödemi ve kord yaralanmasında kullanılmaktadır [68]. MP'un SKH'nda radikal kurtarıcı, anti lipid peroksidasyon ve nöroprotektif etkilerinden dolayı yararlı olduğu gösterilmiştir [69].

Kortikosteroidlerin nöroprotektif etkilerinin kesin mekanizmaları tamamen anlaşılmamış olmasına karşın bu mekanizmaların lipid peroksidasyonunun inhibisyonu, inflamatuvar sitokinlerle birlikte inflamatuvar ve immün cevapların modülasyonu, vasküler perfüzyonun iyileştirilmesi ve hücre içine Ca girişinin ve birikiminin engellenmesi olduğu sürülmektedir [70]. Lipid peroksidasyonunun inhibisyonunun glukokortikoidlerin en etkili nöroprotektif özelliği olduğu varsayılmaktadır. Bu bakımdan MP diğer glukokortikoidlerle karşılaştırıldığında özellikle etkili görünmektedir. Klinik çalışmalarda MP, diğer kortikosteroidler olan Deksametazon ve Hidrokortizon'a göre daha güçlü antioksidan özelliğine sahip olması ve hücre membranından daha kolay geçmesi nedeniyle ön plana çıkmıştır [71]. Glukokortikoid etkisi MP'dan fazla olan deksametazonun sadece nötrofillerin perisit bazal membranının penetrasyonunu inhibe ettiği ancak endotel hücreleri üzerine adhezyonunu inhibe etmediği gösterilmiştir [72].

Anderson ve ark. MP'un spinal kord travmasında mikrovaskülarite ve metabolizmaya etkilerini incelemişlerdir. Yüksek doz MP (HDMP, 15 mg/kg/24 saat) alan kediler tedavi almamış grupla karşılaştırıldığında 8.saatte hasarlı spinal kordun mikrovasküler perfüzyonunun önemli ölçüde korunduğu gösterilmiştir [73]. MP'un 30 mg/kg dozda IV bolus uygulanmasından sonra iyileşme gözlenmiş ve bu miktarın vücuttaki glukokortikoid reseptörlerini aktive etmek için gereken dozun 1000 katı olduğu bildirilmiştir [74]. Terapötik sonuçlar için gereken klinik kullanımdaki dozlar ile hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu ve nörofilamentlerin inhibisyonunda en etkili olduğu gösterilen dozlar birbirine benzerdir [75].

SKH'ndan sonra yüksek bir dozda (intravenöz, 30 mg/kg) MP verilmesinin lipid peroksidasyonunu azalttığı ve ATPase gibi membrana bağlı enzimleri ve nörofilamentler gibi intrasellüler moleküler bağlantıları koruduğu ve laktik asidin biyolojik olarak zararlı artışını tersine döndürdüğü bulunmuştur.

MP'un belirgin bir antioksidan etkinliğinin olduğu, insanlara ve hayvanlara antioksidan dozlarda verildiği zaman spinal kord hasarında nörolojik iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir. MP'un bu etkisi steroidlerin glukokortikoid reseptörlerine bağlı etkilerinden bağımsızdır [32].

MP ile ilgili ilk klinik çalışma National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) dir. Bu çalışmada MP'un klinik yararının olmadığı görülmüştür. Bu çalışmaya yönelik eleştiriler olmuş, travmadan 24 saat sonra da uygulamaların başlatıldığı, dozun düşük olduğu, plasebo grubunun olmadığı belirtilmiştir. Bu eleştiriler göz önüne alınarak 1985'te NASCIS 2 planlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları 1990'da yayınlanmış ve spinal kord yaralanmasında devrim olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma sonrasında travmadan sonraki ilk 8 saat içinde 30 mg/kg İV metilprednizolon bolus uygulanması, daha sonra da 5,4 mg/kg İV infüzyona 23 saat devam edilmesi omurilik yaralanmasında kabul edilen bir tedavi haline gelmiştir [76-78].

2.6.2. Gangliozidler

Gangliozidler sialik asit içeren bir glikosfingolipid grubudur ve SSS dokularında hücre dışı membranında özellikle sinaptik alanda yüksek konsantrasyonda bulunur [43].

Monosialotetraheksosilgangliozid (GM-1 Gangliozid), SSS'de nöronların aksonlarında, myelin kılıflarında ve beyaz cevher içerisindeki glial hücrelerde bulunur [79]. Deneysel SSS travmalarında GM-1 gangliozid'in sinir rejenerasyonunu stimüle ettiği ve anterograd-retrograd dejenerasyona karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. Protein kinaz C'nin inhibisyonu posttravmatik iskemiden korunmada önemli görünmektedir ve gangliozidlerinki mekanizmaları da eksitatör aminoasitlerin salınımını azaltmalarına, protein kinaz C regülasyonuna ve NO oluşumunu engellemelerine bağlıdır [67, 80].

2.6.3. Opioid Reseptör Antagonistleri

Deneysel modeller SKH sonrasında belirgin olarak bir endojen opioid peptidin lokal salınımı olduğunu göstermiştir. Bu peptid Dinorfin kappa reseptörleri üzerinden etkilidir. Mikrosirkülatuar kan akımını azaltır ve sekonder yaralanmayı arttırır. Naloksan ve TRH gibi endojen antagonistler bazı hayvan modellerinde spinal kord kan akımını artırıp nörolojik defisitleri azaltmıştır. Çalışmalarda opioid reseptör antagonistlerinin yararlı etkileri gösterilmiştir [80].

Naloksan, üzerinde en çok çalışılan opioid reseptör antagonistidir ve SKH sonrası nörolojik fonksiyonlarda iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir [67]. Sıçanlarda klip kompresyon metodu ile gerçekleştirilen omurilik yaralanması sonrası uygulanan Nalorfin'in faydalı etkisinin Na-K/Mg ATPaz inaktivasyonu ve lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yoluyla olduğu ileri sürülmüştür [81].

κ -reseptör antagonisti olan Norbinolterfimin'in kedilerde oluşturulan akut SKH sonrası sonuçları anlamlı derecede düzelttiği gösterilmiştir [82]. Opioid antagonistlerin ilaç doz programı ve tedavi zamanlamasının tespiti için başka çalışmalara ihtiyaç vardır [67].

2.6.4.Aminosteroidler

Yüksek doz MP ile oluşan lipid peroksidasyonu inhibisyonu, glukokortikoid reseptör bağımlı gibi görülmemektedir. Glukokortikoid reseptör aktivasyonu olmaksızın lipid peroksidasyonu inhibe edecek bir analog sentezlenebilir diye düşünülmüştür. Spinal kord travmasının sekonder hasarına karşı koruyucu olabilir ve glukokortikoidlerin klasik yan etkilerinden ve serbest mineralokortikoid aktiviteden sakınılabılır [67]. Bu 21-aminosteroidlerin (Lazaroidler) keşfini sağlamıştır. U-74600F, kafa travması, spinal kord yaralanması, subaraknoid kanama ve stroke tedavisi için parenteral bir ajan olarak geliştirilmiştir.

2.6.5.Serbest Radikal Tutucular

Travma sonrası nöronal harabiyette oksijen radikallerine bağlı oluşan lipid peroksidasyonu kritik bir faktör gibi görünmektedir.

SKH sonrası kanamayı takiben hemoglobin ürünleri açığa çıkar. Hemoglobin yıkılması ile demir iyonu serbestleşir. Polimorf lökositlerin etkinleşmesi, prostoglandin, lökotrien sentezi, araşidonik asit salınımı, serbest radikallerin oluşumuna yol açar. Serbest radikaller kararsız moleküller olup, hücre içinde ve zarında lipid peroksidasyonuna ve hücre ölümüne yol açarlar.

E vitamini serbest radikalleri indirger, hücre zarına girerek poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu engeller. Selenyum hidrojen peroksidi indirgeyen glutatyon peroksidazın kofaktörüdür. Hücre içindeki hidrojen peroksidi ve diğer bazı lipid peroksitleri temizler [39].

Travma sonrası α -tokoferol, retinoik asid, askorbik asid, selenyum, koenzim-q gibi antioksidanların seviyeleri hızla düşmektedir [83]. Bu nedenle antioksidanların replasmanı lipid peroksidasyonuna bağlı hasarın azaltılmasında etkili olabilir. Deneysel SKH çalışmalarında Vitamin A ve Vitamin C tedavisinin faydalı olduğu gösterilmiştir [67]. Yapılan SSS yaralanma modellerinde α -tokoferol tedavisinin doku hasarını azalttığı gösterilmiştir [80].

Melatonin antioksidan ajan olarak nöroprotektif etki gösterir. SKH'nda hem melatonin hem de MP'un nöron, akson ve mitokondri ve nukleusu içeren hücresel organelleri koruduğu, ayrıca melatoninin MP'dan daha nöroprotektif olduğu gösterilmiştir [84].

Dextrometorphan ve melatonin uygulamasının spinal kord travması sonrası ikincil hasarı azalttığı bildirilmektedir [85]. Resveratrol ve MP kombine tedavisiyle sadece yüksek doz MP tedavisine göre iyileşmenin daha iyi olduğu bulunmuştur [86].

2.6.6. Glutamat Reseptörü ve İyon Kanalı Antagonistleri

SKH'ndan sonra eksitotoksik hasarda NMDA ve non-NMDA (AMPA/kainate) reseptör aktivasyonunun mevcut olması üzerine farmakolojik müdahalelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır [87].

Selektif ve nonkompetitif NMDA reseptör antagonisti olan Dizocilpine (MK-801) ile yapılmış olan çalışmalarda lokal uygulamasının nörolojik defisiti kötüleştirdiği, sistemik uygulamasının ise klinik düzelmeyi arttırdığı ve histopatolojik değişiklikleri azalttığı bildirilmiştir [58, 88]. Dizocilpine hasarlı spinal korda kan akımını artırıp, ödemi azaltmaktadır [89]. Travma sonrası lipid peroksidasyonunu ve apoptozisi belirgin olarak azalttığı gözlenmiştir [90, 91]. Agmatin travma sonrası hem aşırı iNOS aktivasyonuna bağlı NO sentezini hem de NMDA reseptörleri üzerinden oluşan glutamat toksitesini azaltır [92].

Gacyclidine (GK-11) SKH'ndaki nörolojik defisiti Dizocilpine'den daha etkili olarak azalttığı gösterilmiştir [93]. Non-kompetitif antagonist Memantin, SKH sonrası oluşan nörolojik defisiti azaltırken, klip kompresyonu ile oluşturulan hasarda etkili olmamıştır [23].

SKH'ni takiben uygulanan NBQX'in (spesifik non-NMDA antagonisti) fonksiyonel defisiti düzelttiği ve doku kaybını azalttığı bildirilmiştir [94].

Hücre içi Ca aşırı artışı hücre ölümüne neden olmaktadır. Nimodipin, subaraknoid kanama sonrası oluşan vazospazm tedavisi için kullanılan Ca antagonistidir. Spinal kord travması sonucu Nimodipin kullanımı, lezyon merkezinde etki göstermezken, lezyonu çevreleyen penumbra alanında kalsiyumun hücre içine girişini azaltarak etki gösterir. Ayrıca spinal kord kan akımını arttırıp, hipoperfüzyonu tersine çevirdiği gösterilmiştir [95].

Potent güçlü bir voltaja bağlı Na kanal blokeri olan Tetrodotoxin'in spinal kord hasarından sonra verilmesi ile Na kanallarının bloke edilmesinin beyaz cevherde belirgin nöroprotektif etkisinin olduğu ve fonksiyonel sonuçları iyileştirdiği gösterilmiştir [96, 97]. Na kanal blokeri olan Riluzole'un benzer nöroprotektif etkileri bir sıçan modelinde spinal kord klip kompresyon hasarından sonra beyaz ve gri cevherdeki hasarını azaltmasıyla ve lökomotor fonksiyonları iyileştirmesiyle gösterilmiştir [98].

SKH sonrası miyelin kaybı olmaktadır. Demiyelinizasyon uzun dönemde motor ve duysal bozukluklara yol açan önemli bir faktördür. Miyelin kaybı aksonların internodal bölgelerinde K kanallarının açılmasına, nöron içine K akışına neden olur. Akson içinde K fazlalığı aksiyon potansiyelinin blokajına yol açar. Artmış ekstraselüler K nöronların depolarize olmasına yol açar. Bu da nöronal iletimi etkiler ki bu durum spinal şokun altta yatan kritik sebebidir. Potasyum kanallarının bloke olması demiyelinize internodlardan nöronöronal ve nöromuskuler akımı sağlamıştır [67]. 4-aminopyridin (4-AP), internodal bölgelerdeki K kanallarının blokeridir. 4-AP, aksiyon potansiyelinin süresini uzatarak demiyelinize alanlarda sinir iletisini arttırır. K kanal blokerlerinin kronik dönemde nöronal fonksiyonun yeniden sağlanmasında olumlu etkilerinin olduğuna inanılmaktadır.

2.6.7. Magnezyum

Magnezyum, SKH sonrası NMDA reseptör blokajı ile nöral yapılarda glutamat toksisitesini önler. Eksikliği endotel hücrelerinde serbest radikal kaynaklı intraselüler oksidasyon ve sitotoksositeye neden olmaktadır.

İskemi reperfüzyon hasarı glutamat ve serbest radikal oluşumunda belirgin yükselmeye neden olur. İskemide vasküler sistemde serbest radikallerin ilk hedefi özellikle endoteldir. Magnezyumun lipid peroksidasyon yan ürünlerini glutamat antagonizmasından kaynaklanan indirekt etkisi ile azalttığı bildirilmektedir. SKH'ndan sonra serbest radikal ve glutamatın vasküler yapıda hasarının yönlendirilmesinde anahtar rol oynar.

Serbest radikal düzenlenmesini azaltarak nöral yapılarda vazoproteksiyon sağlar. Ayrıca endotelyal prostasiklin salınımını stimüle ederek spinal kordu besleyen damarlarda dilatasyona neden olur [99].

İnkomplet serebral iskemi reperfüzyon sonrası iki NMDA antagonisti olan ketamin ve magnezyum karşılaştırıldığında magnezyum'un ketamine göre daha etkin nöroprotektif etkileri olduğu bildirilmiştir [100].

2.6.8. İmmüsupresanlar

Siklosporinin, apopitozis inhibisyonu için mitokondriyal membrana etki ettiği, beyin ve spinal kord travma modellerinde dokunun canlı kalmasını sağladığı ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Siklosporin-A'nın cNOS aktivitesiyle birlikte nNOS ve eNOS salınımını inhibe ettiği gösterilmiştir. FK506'nın ise fonksiyonel iyileşmeye neden olduğu ve SSS'nde aksonal yenilenmeyi arttırdığı gösterilmiştir [101, 102].

2.6.9. Non-Steroid Antiinflatuar Ajanlar

Membran fosfolipidlerinin fosfolipaz A2'nin kataliziyle hidrolizleri sonucunda araşidonik asit gibi serbest yağ asitlerinin ve lizofosfolipidlerin üretimi olmaktadır. Metabolitleri eikozonoidler veya güçlü bir inflamatuvar ajan olan Platelet-Activating Factor (PAF) gibi inflamatuvar mediatörlerin ön maddesi olarak görev yapar. Araşidonik asidin tromboksan, prostaglandinler ve lökotrienlere dönüşümünden sorumlu olan enzim inhibisyonunu hedef alan tedavi girişimleri incelenmiştir [67].

Prostasiklin (PGI2), vasküler endotelden salınan güçlü vazodilatatör ve platelet agregasyon inhibisyon etkisi olan doğal bir araşidonik asit metabolitidir [103].

Siklooksijenaz inhibitörleri, tromboksan sentetaz inhibitörleri ve prostoglandin I2 ile yapılan kombine tedavinin rat omurilik yaralanmasında nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir [67, 80].

2.6.10. Nörotransmitter Reseptör Agonistleri

Spinal aksonlar, GABA, Norepinefrin ve Serotonin gibi nörotransmitter reseptörlere sahiptir. Quipazine, çeşitli adrenerjik agonistler ve GABA antagonistleri gibi çeşitli sentetik reseptör agonistlerinin spinal aksonlar üzerinde kuvvetli eksitatör etkileri vardır ve nöroprotektif olduğu bildirilmiştir [104].

2.6.11. Nörotropik Faktörler

Nörotropik büyüme faktörünün, SKH sonrası nöronal dejenerasyondan korunmada etkin olabileceği gösterilmiştir [67]. NT3, hasar sonrası aksonlarda görülen atrofi ve retrograd hücre ölümlerinin önlenmesi amacıyla uygulanmıştır [104, 105].

2.6.12. Sistemik Hipotermi

Hipotermi'nin nöroprotektif mekanizmaları; serbest radikal üretiminin azaltılması, beyin ödeminin azaltılması, intraselüler Ca konsantrasyonunun azaltılması, artmış GABA salınımı ve glutamat salınımının engellenmesi, inflamatuvar cevapların engellenmesi, polimorf nüveli lökositlerin birikiminin engellenmesidir [106].

2.6.13. Antikoagülan Ajanlar

Tromboemboli SKH olan hastaların mortalite ve morbiditesinin önemli bir nedenidir. Serin proteazı olan Aktif Protein C (APC) önemli bir fizyolojik antikoagülandır [6, 85]. APC, faktör Va ve VIIIa'yı inaktive ederek pıhtılaşma sistemini düzenler. Ayrıca APC monositlerden TNF- α üretimini baskılayarak inflamatuvar sürecin düzenlenmesine de katılır.

TNF- α nötrofillerin kuvvetli bir aktivatörü olduğuna göre yine APC'nin nötrofil aktivasyonu inhibisyonu yoluyla travma nedenli spinal kord sekonder hasarını engellemesi mümkündür [107].

İlioprostun tedavisinin lökosit aktivasyonu üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı SKH'nı azalttığı ve bunu TNF- α üretiminin inhibisyonuyla gerçekleştirdiği bildirilmiştir [6, 108, 109].

Sentetik bir proteaz inhibitörü olan Gabexate Mesilate pıhtılaşma kaskadı ve inflamatuvar süreç sırasında ortaya çıkan çeşitli serin proteazlarını inhibe eder. SKH'nı da TNF- α üretimini baskılamasıyla önlediği düşünülmektedir [6].

2.6.14. Minosiklin

Tetrasiklin antibiyotik olan Minosiklin'in eksitotoksiteyi inhibe ettiği ve mikroglial aktivasyonun inhibisyonuyla nöroprotektif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. SKH bölgesindeki doku hasarını ve apoptotik hücre ölümünü azaltmakta ve lökomotor fonksiyonları iyileştirmektedir [110].

2.6.15. İmmüsupresanlar

Siklosporin ve FK506 (tacrolimus) periferik sinir hasarı durumlarında faydalı etkileri gösterilmiş olan immüsupresanlardır. Siklosporin apoptozisi engellemek için mitokondriyal membrana etki ettiği; dokunun canlı kalmasını sağladığı ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Siklosporin-A'nın cNOS aktivitesiyle birlikte nNOS ve eNOS salınımını inhibe ettiği bildirilmiştir [101]. FK506 ise hasar sonrası fonksiyonel iyileşmeye neden olduğu ve SSS içerisinde aksonal yenilenmeyi arttırdığı gösterilmiştir [102].

2.6.16. NOS (Nitrik Oksit Sentaz)

Nitrik oksit sentazın (NOS) selektif uzun dönem inhibitörleri SKH'nda nöroproteksiyonu indükleyebilir. NOS, hasarlı nöronlarda NOS upregülasyonunu gerçekleştirir. Bu da NO'nin nörotoksik olduğunu gösterir. Torasik spinal kordda NOS (+) hücreler dorsal boynuzda, dorsolateral funikulusta, lateral spinal nöronlarda ve santral kanal çevresinde bulunurlar. Dorsal boynuzun spinal kord lamina 1 ve 3 de NOS nöronları GABA, Glisin ve asetilkolin içerirler. Bu NO ve diğer nörotransmitterlerin etkileşiminin SSS regülasyonunda önemli rol oynadığını gösterir. NOS nöronları spinal kord kan akımına etki eder ve kan-spinal kord bariyeri fonksiyonunu regüle etmektedir.

Dorsal boynuzda spinal kord iskemisi veya periferik sinir yaralanmasını takiben NOS ekspresyonu görülür. Kord hemiseksiyonu ya da darbe yaralanması NOS(+) internöronlarda özellikle lezyon rostralinde upregülasyonla sonuçlanır. NOS ekspresyonunun selektif inhibitörlerle blokajı SKH'nın indüklediği kan-spinal kord bariyer tahribatı, ödem formasyonu, hücre reaksiyonlarının azaltılması ve düzelmiş motor fonksiyonlarla ilişkilidir [98].

2.7. Hem Oksijenaz Enzim Sistemi

2.7.1. Hem Oksijenaz İzofomları ve Moleküler Özellikleri

Hem yıkılım yolunda etkin mikrozomal bir enzimdir. Bu yolda üretilen karbonmonoksitin (CO) hız kısıtlayıcı enzimidir. NO üretimi gibi CO üretimi de guanilat siklaz tarafından düzenlenir. Sinyal iletim yollarının düzenlenmesinde HO-1 aktivitesi veya aktivitesi sonucu ortaya çıkmış CO miktarları bu proteinin antiinflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkilerine aracılık etmektedir [111]. Ayrıca ödem, lökosit adezyonu ve diğer inflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe edici etkileri vardır [112].

Hem oksijenazın genetik olarak farklı iki izoformu indüklenebilir HO-1 ve yapısal formu HO-2'dir. HO-1 ve HO-2 aynı reaksiyonları katalize ederler. Farklı enzim kinetikleri, *K_m* değerleri, termostabiliteleri ve immünoreaktiviteleri vardır. Bu enzimler farklı gen ürünleri olmalarına rağmen aminoasit veya nükleotid dizileri, amino asit kompozisyonları ve transkrip numaraları benzerlik gösterir. HO-1 aynı zamanda stress proteini HSP32 olarak da bilinir [113].

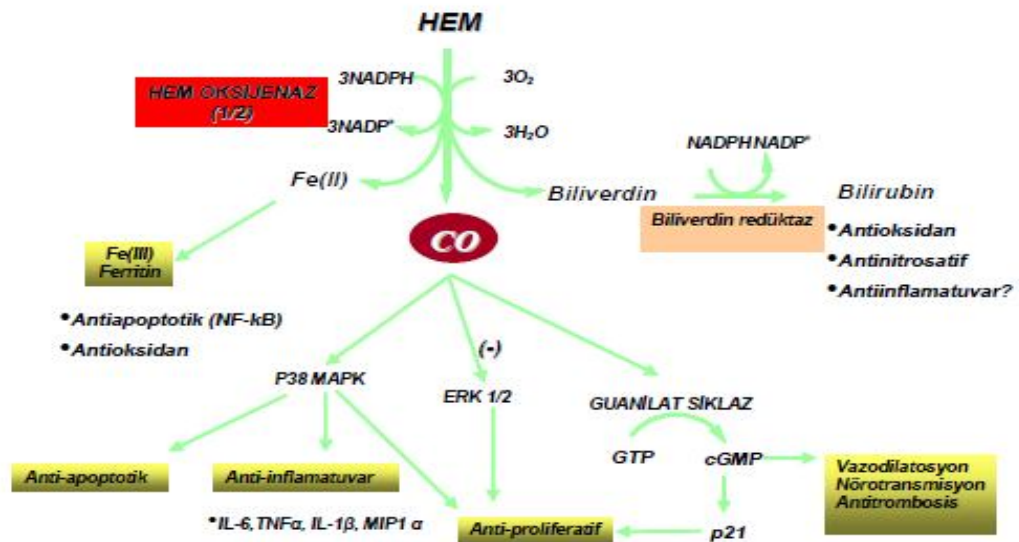
HO-1 büyük oranda eritrositlerin parçalandığı organ olan dalakta, karaciğer retiküloendotelyal hücrelerinde ve kemik iliğinde eksprese olmaktadır. Hemoliz gibi kan hemoglobin düzeyinin aşırı derecede arttığı durumlarda HO-1 enzimi böbrek, makrofaj ve karaciğer parankim hücrelerinde ciddi bir artış gösterir.

Yapısal izoform HO-2, en fazla testis ve beyinde bulunur. Ayrıca damarlar, merkezi sinir sistemi, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrekler de yüksek miktarda HO-2 içerir. HO-2, çevresel stres ile aktive olamaz ancak beyinde adrenal glukokortikoidlere cevap verebilir [114].

Hem oksijenaz endoplazmik retikulum ile ilişkili protein olarak kabul edilir. Mikrozomal hücre fraksiyonları yüksek oranda HO aktivitesine sahiptir. Yapılan çalışmalar HO enziminin diğer hücre kompartmanlarında da bulunduğunu göstermektedir [115].

Yapısal hem oksijenaz formu olan HO-2 sadece adrenal glukokortikoidlere yanıt verirken, HO-1 kimyasal ve fiziksel uyarılardan etkilenir. HO-1 ve HO-2 arasındaki bu farklılık enzimlerin promotör bölgelerinde regülatör elementlerden kaynaklanır. Örneğin nükleer faktör kappa B, heat shock faktör, aktivatör protein veya metal regülatör element gibi regülatör elementlerin bağlanma bölgeleri HO-1'in promotör bölgesinde bulunur. Buna karşın HO-2 geni sadece fonksiyonel glukokortikoid cevap elementi içerir. HO-1 geni reaktif oksijen türleri gibi hücresel oksidatif stres oluşturan ajanlar ve kimyasallar tarafından güçlü bir şekilde indüklenir. Bu nedenle strese yanıt veren gen olarak bilinir. H₂O₂, kinonlar, menadion bu şekilde etki gösteren indüktörler arasındadır.

HO, hem molekülünün parçalanması ile gelişen hücre farklılaşması, eritrosit döngüsü ve demir konsantrasyonunu dengede tutmak gibi etkilerinin yanısıra reaksiyon ürünleri üzerinden gelişen önemli sitoprotektif etkilere de sahiptir. **Şekil 2.8**'de CO, bilirubin ve Fe/Ferritin üzerinden gelişen etkiler kısaca özetlenmiştir.



Şekil 2.8. Hem molekülünün parçalanma ürünleri ve fonksiyonları

2.7.2. Hem Oksijenaz ve Nitrik Oksit Sentaz Arasındaki İlişki

HO ve NOS, aktivasyonları ve regülasyonları bakımından benzerlik gösterir. Reaksiyon ürünleri olan CO ve NO'de biyolojik etkilerini guanilat siklaz enzimini aktive ederek göstermektedir [116]. Ancak bu moleküller hedef proteinlere farklı şekillerde bağlanırlar. NO, CO molekülüne göre daha güçlü bir guanilat siklaz aktivatörüdür. Fizyolojik koşullarda ortamda bulunan NO, guanilat siklaz aktivasyonundan sorumlu ana moleküldür. NO biyoaktivitesinin azaldığı patolojik durumlarda ise CO devreye girerek guanilat siklaz aktivasyonu üzerinden regüle edici etkilerini gösterir.

NOS, aktif bölgesinde 2 adet hem molekülü içeren hemoproteindir. HO-1, NOS sentezi için gereken serbest heme parçalayarak veya NOS'un aktif bölgesinde bulunan heme direkt parçalanması ile enzim aktivitesini azaltabilir. Her iki enzim de katalize ettiği reaksiyonlarda kofaktör olarak NADPH kullanır.

Siklosporin toksisitesine maruz kalan, ancak HO-1 ekspresyon düzeyleri artırılmış transgenik farelerin bu ilacın nefrotoksik etkilerinden korunduğu gösterilmiştir [117].

Anjiotensin II ve yüksek tuz diyeti ile koroner skleroz, damar duvar kalınlaşması ve inflamatuvar damar değişiklikleri oluşturulan HO-1 ekspresyonu artırılmış transgenik farelerin bu kardiovasküler değişikliklerden korunduğu gösterilmiştir. Bu farelerde oksidatif DNA hasarının göstergesi 8-hidroksi-deoksi-guanozin (8-OHdG) ve reaktif oksijen hasarının göstergelerinden olan 3-nitrotirozin düzeylerinin anlamlı olarak düşük çıktığı gösterilmiştir [118]. HO-1 ekspresyonu artırılmış transgenik farelerin yüksek glukoz düzeylerinin oluşturduğu oksidatif hasardan, tromboemboli ve vaskülit gibi inflamatuvar değişikliklerden korunduğu belirtilmiştir [111, 119].

2.8. Eritropoetin (EPO)

2.8.1. Yapısı ve Fizyokimyasal Özellikleri

EPO, temel olarak böbreklerden salgılanan glikoprotein yapısında bir hormon olup aynı zamanda SSS'nde bulunan ve doku koruyucu etkileri olan endojen sitokin mediyatörleridir [120].

Molekül ağırlığı 30.400 dalton ile 34.000 dalton olup, yapısında %30-49 oranında karbonhidrat bulunur. Bu karbonhidratın %11'ini sialik asit, %11'ini heksoz ve %8'ini N-asetilglukozamin oluşturmaktadır [121, 122]. Molekülün helikal yapısının, 2 uzun ve 1 kısa sarmal bağlantıyla birbirine paralel olmayan 4- α -heliksten oluşan bir globüler protein olduğu kabul edilmektedir [123].

Plazmadaki eritropoetin molekül ağırlığı 30400 dalton'dur. Ve gen aracılığı ile üretilen 193 aminoasitlik bir proteindir. Salgılanma öncesinde N terminalinden 23 aminoasitlik bir rezidüel bölümü ayrılarak periferik kana verilir. Periferik kana salgılandığında karboksil terminalinde 166. pozisyondaki arjininin uzaklaştırıldığı gösterilmiştir. Bu nedenle dolaşımdaki EPO 165 amino asit içermektedir.

Karbonhidrat kısmında terminal N-asetilnöraminik asit EPO metabolizması için önem taşımaktadır. Plazmadaki asialo-eritropoetin, galaktozun karaciğerdeki galaktoz reseptörlerine bağlanması nedeniyle dolaşımdan hızla uzaklaştırılır. Plazma EPO'ni göreceli olarak sıcaklığa karşı stabil olan α -2 globulin yapısında olup, pH 3-4 arasında izoelektrik noktada saptanır.

Eritropoetin α formu, klinikte EPOjen olarak kullanılmaktadır ve β formuna göre daha yüksek oranda karbonhidrat kompozisyonu içerir [124].

EPO'nun hematopoetik etkisi nöroprotektif etkilerinden farklıdır. Çünkü her bir fonksiyon için molekül konsantrasyonu ve reseptör afinitesi farklıdır. Sıçanda spinal kord yaralanmasında EPO lipid peroksidasyonunu azaltmış ve ultrastrüktürel nöroproteksiyon sağlamıştır. Apoptoz inhibisyonu, inflamasyon reduksiyonu, eksitabilite modülasyonu, ve nöronal kök hücrelerinin modülasyonu ve proliferasyonuna katkıda bulunur [125].

2.8.2. Yapım Yeri ve Etki Mekanizması

EPO, renal peritübüler interstisyel hücreler, hepatositler ve kupffer hücreleri tarafından sentezlenmektedir [126-128].

Bilateral nefrektomi yapılan ratlarda EPO üretiminin meydana gelmediği belirtilmiş, EPO'nun esas üretim yerinin böbrekler olduğu bildirilmiştir. Kronik böbrek yetersizliği (KBY) ve şiddetli anemisi olan hastalarda serum EPO seviyesinin oldukça düşük olduğu, bilinen klasik bilgiler arasındadır.

Ancak renal transplantasyondan sonra bu seviyenin normale döndüğü bir çalışma ile ortaya konulmuştur [129]. Anemi oluştuktan 1-1,5 saat sonra anemik fare ve ratların böbreklerinde ve karaciğerlerinde EPO-mRNA'sı tespit edilmiştir. Kanamadan sonra böbreklerde EPO-mRNA düzeyi, normale göre 200-1000 kat artış göstermiştir [130, 131]. Anemi oluşturulan ratlarda yapılan çalışmada karaciğerde eser miktarda EPO-mRNA belirlenmesine karşın dalak, beyin, kas ve akciğerlerde tespit edilmemiştir. Aneminin yanı sıra hipoksinin de EPO mRNA ve EPO düzeylerini etkilediği bilinmektedir [132, 133].

Anemide proksimal arterlerin daralması ve uç bölgelerde mevcut oksijenin kullanılamamasına bağlı olarak gelişen hipoksi sonucunda, renal tubulus hücrelerinin bulunduğu bölgede fokal hipoksi alanları ortaya çıkmaktadır. EPO, hipoksiye cevap olarak sentezlenir ve hormonun birikimi olmaması nedeniyle plazmada sadece biyolojik olarak aktif formda bulunmaktadır [134].

Karaciğerin total EPO üretimine katkısının %10-15 olduğu saptanmıştır [127, 135, 136]. EPO üretimi fetal dönemde böbrek ve karaciğer tarafından sentezlenirken, doğumdan sonra büyük oranda sentezlenme böbreklerde oluşmaktadır [137].

Yaş, cinsiyet, menstrüel siklus ve sigara içimi dolaşımdaki EPO seviyesini etkilememektedir. Serum seviyesi, hipoksi ya da kanama olmadıkça sabittir. Serumdaki EPO'nun sabah en düşük, akşam en yüksek seviyede seyrettiği, ancak klinik olarak önemli olmadığı bildirilmektedir [138, 139]. Dalakta da EPO aktivitesinin olduğu bildirilmiştir [140, 141].

Yıkım esas olarak karaciğer ve böbreklerde yapılmaktadır. Esas fonksiyon karaciğerde olmasına rağmen, nefrektomi yapılan ya da üreterleri bağlanan köpeklerde EPO'nun yarı ömrünün uzaması, böbreğin EPO metabolizmasında görev aldığını düşündürmektedir [129, 142].

Hematopoezis, hematopoietik kök hücrelerden olgun kan hücrelerinin oluşumuna kadar geçen süreçtir. İlk hematopoietik seri ön hücreler, çok yönlü (multipotent) farklılaşma kapasitesine sahiptir. Olgunlaşma ilerledikçe farklılaşma, tek bir yönde özelleşerek periferik kanda görülen olgun hücreleri meydana getirir [73].

EPO, primer olarak eritroid seri ön hücrelerin çoğalması ve olgunlaşmasını uyarmak için kemik iliği üzerine etki eder. En az iki büyüme faktörü (IL-3, GM-CSF) tarafından uyarılan çok yönlü (pluripotent) hematopoietik kök hücreler, EPO'ya cevap veren eritroid seri ön hücrelere dönüşürler [76].

2.8.3. Eritropoetin Reseptörleri

EPO, son zamanlarda tanımlanan büyüme faktörü reseptörleri ailesinin bir üyesi olan spesifik EPO reseptörüne bağlanır [143]. Yapılan ilk çalışmalarda reseptörler sadece insanlarda, sıçan eritroid hücrelerinde, eritrolökemik hücrelerde, eritroid elementlerinden zengin fetal karaciğer dokusunda, fare ve rat plasentasında ve megakaryositlerde tespit edilmiştir [144, 145].

İki tip EPO reseptörü bildirilmiştir [146]. İlk olarak eritroid seri ön hücrelerinde gösterilmiştir [147].

Eritroid hücrelerdeki EPO reseptörlerinin sayısı az ve değişkendir. Reseptörün ekstrasitoplazmik bölümü EPO bağlayıcı bölge özelliğine sahiptir. İntrasitoplazmik C terminali ise sinyal iletimi ile ilgilidir.

İnsan EPO reseptöründeki 508 ardışık aminoasit sırasının yaklaşık %80'inin fare EPO reseptörü ile homolog yapıda olduğu saptanmıştır. Reseptörlere bağlanmayı takiben EPO, endositoz yoluyla hızlı bir şekilde hücre içine alınır [144, 146]. Ardından hücre içi Ca konsantrasyonu, cAMP, cGMP, tirozin spesifik protein kinaz, fosfotidilinositol ve protein-kinaz C düzeylerinde artış görülmesi, EPO'nun bu yolla etkili olduğunu düşündürmektedir [127, 146].

Önceleri EPO'nun hematopoietik sistem hücrelerindeki reseptörlere spesifik olarak bağlandığı düşünülürken, epitelyal hücrelerde, nöral orijinli hücrelerde de EPO reseptörleri bulunduğu bildirilmiştir [148-150]. Ratlarda hipokampusta ve primer hipokampal nöron kültürlerinde EPO reseptörlerinin varlığı da gösterilmiştir [151, 152].

2.8.4. EPO Farmakokinetiği ve Metabolizması

EPO metabolizmasında primer organ karaciğer olup, böbreklerde ve karaciğerde depolanmamaktadır. Dolaşımdaki EPO'nun konsantrasyonu, üretim oranını etkilemezken, plazma klirensi çok yavaştır ve plazma EPO seviyesinden

bağımsızdır [153]. EPO 0.5 ml/dk oranında böbreklerden yavaş bir şekilde atılmaktadır [154].

EPO yarılanma ömrünün yaklaşık ratlarda 1,5-3,5 saat, tavşanlarda 8-10 saat, koyunlarda 11 saat ve köpeklerde 9 saat olduğu saptanmıştır. Normal insanlarda pürifiye rhEPO ve endojen EPO'nun yarılanma ömrü 4-12 saattir [155].

EPO'nun eliminasyon yarılanma ömrü sağlıklı insanlarda da, son dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda da 2-13 saat olarak bildirilmiştir. Plazma EPO klirensi yaklaşık 10 ml/dk'dan azdır.

EPO'nun %3-10 kadarı değişmeden idrarla atılır. Subkutan uygulamada daha düşük ancak, daha kalıcı EPO düzeylerinin olması, tedavide daha etkili olmaktadır. Subkutan verilen dozun sadece %25'i absorbe olur, intravenöz ve intraperitoneal uygulamadan daha etkindir [156, 157].

Ancak farelere haftada 3 kez İP olarak EPO enjekte edildiğinde hematokrit cevabının fazla olduğu tespit edilmiştir [158].

2.8.5. EPO ve Santral Sinir Sistemi

Eritropoetin, eritrosit üretiminin kontrolünü sağlaması nedeniyle doku oksijenizasyonunun temel belirleyicisidir [148]. Eritrosit formasyonunun stimülasyonu EPO'nun fizyolojik fonksiyonudur. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalarda EPO'nun nörotropik fonksiyonunun bulunduğu da söz edilmektedir [151, 152].

Glia ve nöronların EPO, makrofaj koloni stimülatör faktör (M-CSF) ve granülosit stimülatör faktör (G-CSF) gibi hematopoetik sitokinler ve çeşitli interlökinler ürettikleri bildirilmiştir. Bu hücrelerde beyin gelişimi süresince ve homeostazisin sağlanmasında parakrin ve otokrin etkileşim yeteneğinin her ikisinin de bulunduğunu düşündüren peptidlere ait reseptörlerin üretiminin varlığı bildirilmektedir [148].

Primer astrosit kültürlerinde, düşük oksijen basınçlarında EPO üretiminin mRNA'sının artışı ile stimüle edildiği, ayrıca travmatik beyin yaralanması olan hastalardan elde edilen BOS da EPO saptandığı rapor edilmiştir. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda serebral iskemide EPO'nun santral sinir sistemine direkt uygulanması ile nöron ölümünün anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir [31].

İnfantta BOS'da pikomolar miktarlarda EPO varlığı bildirilmiştir. Gelişmekte olan insan beyinde, diferansiye olmamış nöroepitelyal hücrelerde EPO ve EPO reseptör immünoreaktivite varlığı açığa çıkarılmıştır. Diferansiyasyon ile birlikte EPO reseptörlerinin astrositlerde ve nöronlarda saptandığı bildirilmiştir. Santral sinir sisteminde EPO'nun, hem astrosit hem de nöron kaynaklı olması, otokrin ve parakrin yollar aracılığı ile fonksiyon gösterdiğini düşündürmektedir. EPO ve EPO reseptörlerinin gelişmekte olan beyinde bulunması ve daha sonra da matür beyinde varlığını sürdürmesi nedeniyle EPO'nun gelişimsel ve daha sonra da homeostazisde rol aldığı görüşleri öne sürülmüştür [149].

3. ARAÇLAR VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Etik Kurulu onayı alınarak başlandı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında üretilmiş 33 adet erişkin dişi Wistar albino cinsi rat çalışmaya dahil edildi.

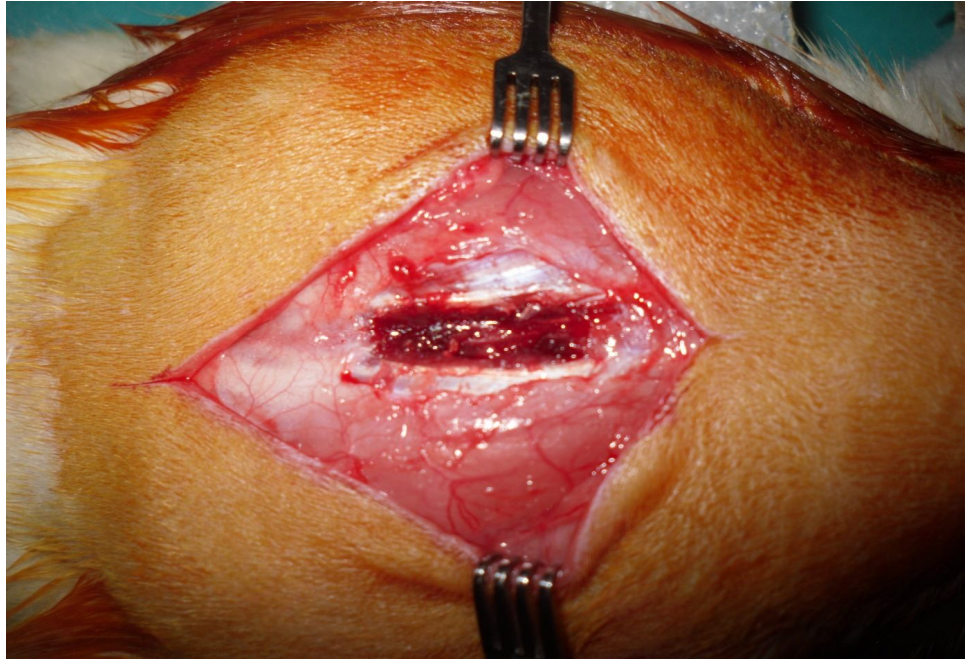
3.1. Gruplar ve Yöntem

- 1- Sham grubu (Grup S, n=3)
 - 2- İskemi grubu (Grup İ, n=10)
 - 3- Eritropoetin grubu (Grup E, n=10)
 - 4- Metilprednizolon grubu (Grup M, n=10)
- Ratlar randomize olarak dört gruba ayrıldı.

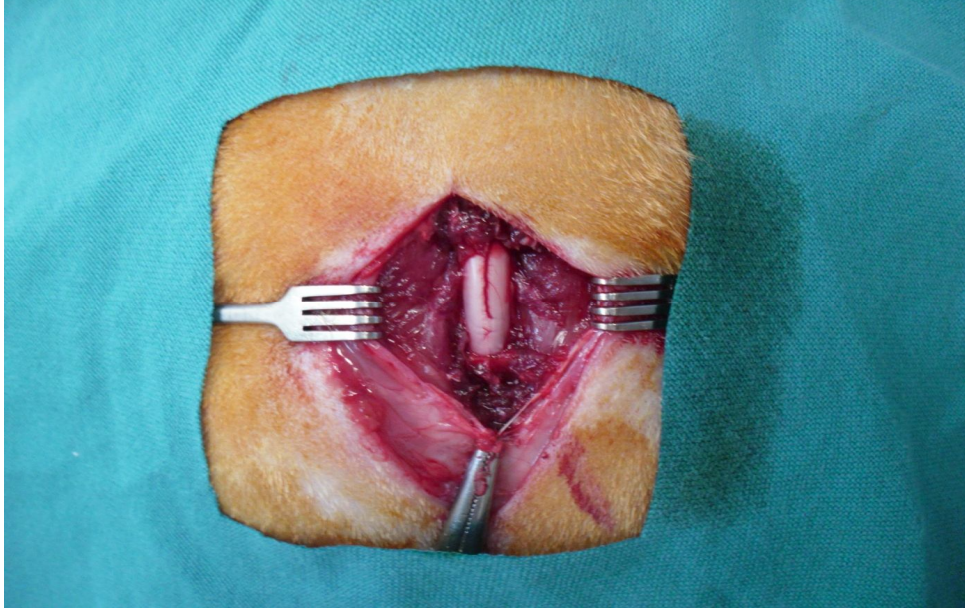
Ratlar intraperitoneal Etil karbamate [Ürethan] 1.2-1.4 gr/kg ile anestetize edildi. Ratların yanıtı ağırlı uyarın verilerek kontrol edildi. Ratlar tespit tahtalarına prone pozisyonunda yerleştirilip, el ve ayakları sabitlenip, torakal bölge önce povidon iyodin (Battikon, Adeka, Samsun) ile sterilize edildikten sonra traşlanıp tekrar povidon iyodin ile cilt silinerek lokal antisepsi sağlandı (**Şekil 3.1**). Vertebra prominens palpe edilip interskapular mesafe referans alınarak T5-T12 seviyesinde yaklaşık 3 cm'lik bir cilt insizyonu (15 nolu bistüri ile) ile cilt, cilt altı sıyrılıp, paravertebral kas fasyası geçilerek kaslar laterale doğru künt diseksiyon ile ayrıldı (**Şekil 3.2**). Torakal 6-10 laminaları görülecek şekilde spinoz proçesler ve laminar arkları mikrocerrahi ile çıkartılarak total laminektomi uygulandı (**Şekil 3.3**).



Şekil 3.1. Ratların preoperatif hazırlığı.



Şekil 3.2. Cilt insizyonu ve diseksiyon.



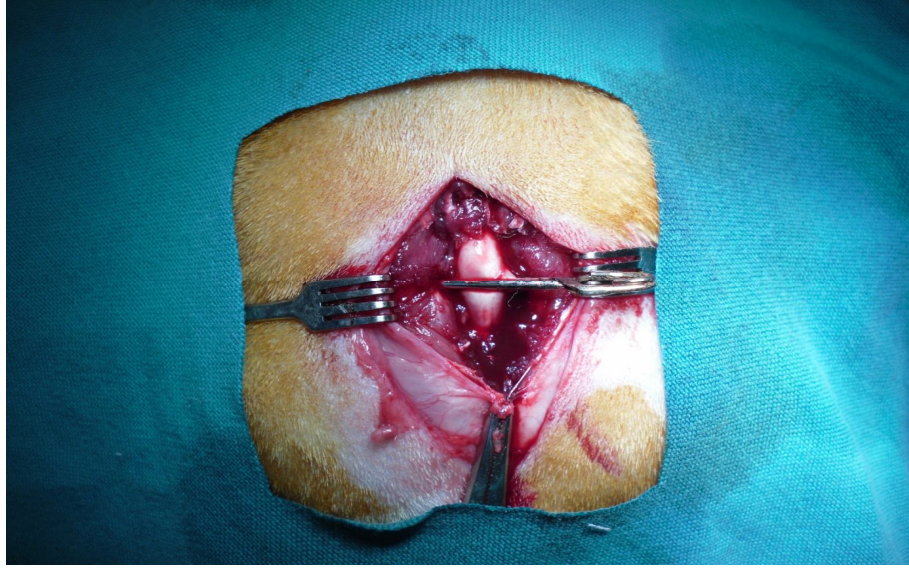
Şekil 3.3. Laminektomi sonrası spinal kord görünümü.

Grup S (Sham grubu n=3); Anestezi uygulandıktan sonra herhangi bir girişim yapılmadan T 6-10 seviyesinden laminektomi uygulandıktan sonra kanama kontrolü sağlanıp operasyon sahası kapatıldı. Operasyondan 2 saat sonra anestezi uygulanıp laminektomi yapılan saha açılıp, yaklaşık 2 cm. spinal kord örnekleme yapıldı.

Grup I (İskemi grubu n=10); Anestezi uygulandıktan sonra, Grup S'deki prosedürleri takiben spinal korda 11 mm. uzunluğunda ve 70 gr. kapanma basınçlı klip (sugita geçici anevrizma klipi) ile 3 dakika kompresyon uygulanarak travma oluşturuldu (**Şekil 3.4**), herhangi bir farmakolojik ajan verilmedi ve travmadan 2 saat sonra spinal kord örnekleme yapıldı.

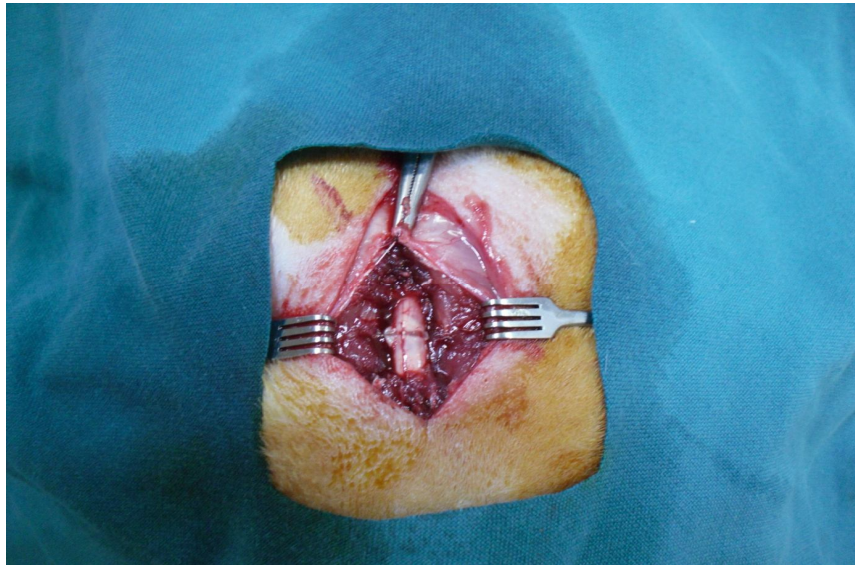
Grup E (Eritropoetin grubu n=10); Ratlara anestezi, laminektomi ve travma prosedürleri uygulandıktan ve klip çıkarıldıktan hemen sonra reperfüzyonun başlangıcında rekombinant insan eritropoetini (r-hEPO)'nin (Epobel 5000 I.U., epoetin zeta, Nobel İlaç San.A.Ş.) 5000 Ü/kg intraperitoneal (İP) olarak uygulandı. 2 saat sonra spinal kord örnekleme yapıldı.

Grup M (Metilprednizolon grubu n=10) ; Ratlara laminektomi ve travma prosedürleri uygulandıktan ve klip çıkarıldıktan hemen sonra 30 mg/kg İP. metilprednizolon (Prednol, metilprednisolon, Mustafa Nevzat İlaç San.A.Ş.) uygulandı. 2 saat sonra spinal kord örnekleme yapıldı.

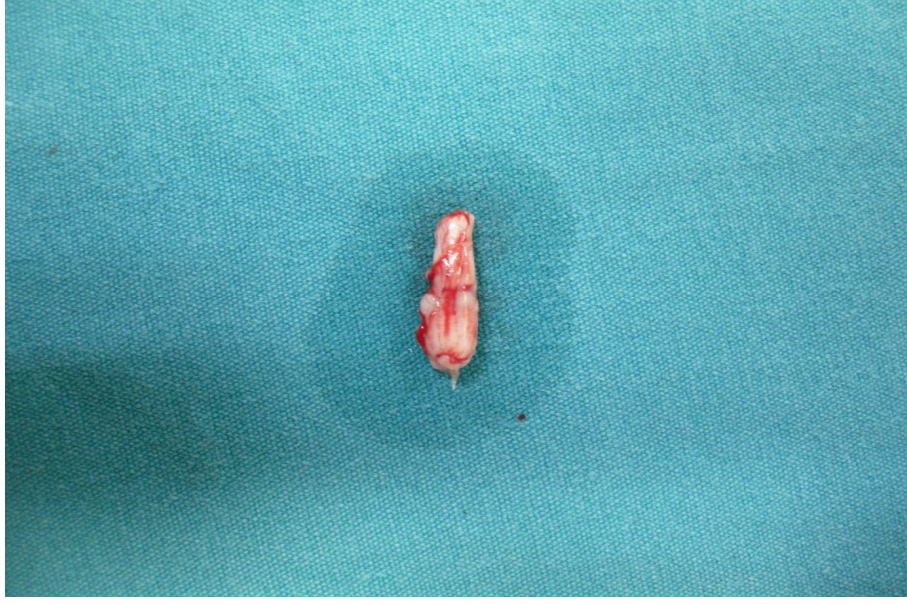


Şekil 3.4. Spinal kordun klemplenesi.

Spinal kord örneklemesinde sıçanlar pron pozisyonunda sabitlenerek daha önce kapatılmış olan cerrahi insizyon yeri tekrar açılarak hayvanların spinal kordları incelenmiştir (**Şekil 3.5**). Tüm sıçanların spinal kordları T 6-10 seviyesinde epicenterin 1 cm. rostral ve 1 cm. kaudal kısmından kesilerek çıkartılmıştır (**Şekil 3.6**). Histopatolojik inceleme için epicenterin 1 cm. rostral kısmı % 10'luk formaldehit içine konularak histopatolojik incelemelerin başlayacağı güne kadar +4° C'de saklanmıştır. Biyokimyasal inceleme için epicenterin 1 cm. kaudal kısmı sıvı nitrojende dondurularak -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.5. Cerrahiden 2 saat sonra spinal kord görünümü.



Şekil 3.6. Örneklenen spinal kord görünümü.

3.2. Biyokimyasal Değerlendirme

Tüm biyokimyasal analizler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. tarafından yürütülmüştür.

3.2.1. Nitrit ve Nitrat Ölçümü

Dokular fosfat buffer salin (PBS) tamponu içinde homojenize edilmiştir. Sonrasında 20 dakika süreyle 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant nitrit ve nitrat ölçümü için Amicon Ultra 0.5 (Millipore, Cork, Ireland, 780051) ile filtre edilmiştir. Nitrit ve nitrat ölçümü, elde edilen filtrattan Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman, MI, USA) ile yapılmış ve sonuçlar florometrik plate reader (Synergy Mx, BioTek Instruments Inc, Vermont, USA) ile okunmuştur. İn vivo olarak nitrik oksit son metabolik ürünleri nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) dır ve biyolojik sistemlerde genellikle bu şekilde tanımlanır. Nitrik oksit metabolitlerinin ölçülmesinde sistemde var olan tüm nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite dönüştürülür. Oluşan nitrit 2,3,-diaminoaphthalene (DAN) ile reaksiyona girerek 1-naphthotriazole oluşturur. Oluşan ürün florometrik olarak ölçülür.

3.2.2.Hem Oksijenaz-1 Ölçümü

Dokular fosfat buffer salin (PBS) tamponu içinde homojenize edilmiştir. Sonrasında 20 dakika süreyle 10.000 x g'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen süpernatant Hem Oksijenaz-1 (HO-1) ölçümü için kullanılmıştır. Ölçüm Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Heme Oxygenase, Decycling (HO1) Organism: Rattus norvegicus (Rat) (USCN Life Science Inc, Wuhan, China, E90584Ra) kiti ile yapılmış ve sonuçlar spektrofotometrik plate readerda (Biotek Micro Quant, BioTek Instruments Inc, Vermont, USA) okunmuştur. Kullanılan kit HO-1'in in vitro ölçümü için hazırlanmış bir sandviç enzim immünassaydır. Plate HO-1 için spesifik monoklonal antikorlar ile kaplı kuyucuklar içermektedir. Standart ve örnekler kuyucuklara HO-1 için spesifik olarak hazırlanmış biyotin-konjuge poliklonal antikorlar ile ilave edilir ve 1 saat süreyle 37°C'da inkübe edilir. Daha sonra avidin ile konjuge Horseradish Peroksidaz (HRP) kuyucuklara eklenir ve 30 dakika süreyle 37°C'da inkübe edilir.

İnkübasyon sonrasında TMB (tetramethylbenzidine) substrat eklenir ve enzim-substrat reaksiyonu sülfirik asit eklenerek durdurulur. Oluşan kromojen 450 nm'de okunur.

3.2.3.Protein Miktarının Tayini

Protein tayini modifiye Bredford yöntemine dayanan kit ile yapılmıştır. Reaktif olarak Standart solüsyon; 2 µg/ µl bovin serum albümin (Albümin Bovina, Sigma, A-8022) ve CPPA reaktifi (Coomassie Plus Protein Assay Reagent, Pierce-1856210) kullanılmıştır. Protein tayini için 1 µl doku süpernatantı 999 µl distile su ile sulandırıldıktan (1:1000) sonra üzerine 1 ml CPPA reaktifi eklenmiş ve 595 nm'de absorbans spektrofotometrik olarak okunmuştur. Standart çalışması ise, numune yerine artan konsantrasyonlarda 1:1000 sulandırmaya sahip BSA kullanılarak yapılmıştır.

3.3. Patolojik Değerlendirme

Çalışmamızdaki patolojik değerlendirmeler Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

Reperfüzyon sonrasında 2. saatte yapılan cerrahi işlem ile ratların spinal kordları T 6-10 seviyesinden çıkarılarak spinal kordun 1 cm. rostral kısmı %10 formalin içinde fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi tamamlandıktan sonra spinal doku, makroskopik transvers kesitleri alınarak parafin bloklara gömülmüştür. Standart patolojik yöntemle hazırlanan 4 µm kalınlıktaki ardışık kesitler, hematoxilen-eosin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopisi ile incelenmiştir.

Spinal kord %70, %80, %90'lık absölü (absolute) alkol ve ksilolden birer saat süreler ile geçirildikten sonra parafinde iki saat bekletildi. Her blok horizontal olarak 4 µm.'lik kesitler halinde kesildi. Deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemi için kesitler etüvde 60°C de 60 dakika bekletildikten sonra sırasıyla onar dakika süre ile üç kez taze ksilolden birer dakika süre ile ikişer kez absölü ve % 96'lık alkoller ile distile sudan geçirilerek kesitler hematoxilen eozinle boyandı.

Boyama yöntemi;

- 1) Deparafinize ve rehidrate edilen kesitler ilk olarak iki dakika süre ile hematoxilen boyasında bekletilmiştir.
- 2) Çeşme suyunda bir dakika yıkanmıştır.
- 3) % 1'lik asit alkol solusyonuna bir dakika batırılıp çıkarılmıştır.
- 4) Çeşme suyunda bir dakika yıkanmıştır.
- 5) % 1'lik amonyaklı suya bir kez batırılıp çıkarılmıştır.
- 6) Çeşme suyunda bir dakika yıkanmıştır.
- 7) % 96'lık alkolde 30 saniye bekletilmiştir.
- 8) Eozin boyasında bir dakika bekletilmiştir.

Dehidratasyon işlemi;

Boyanan kesitler sırasıyla onar saniye süre ile % 96'lık alkolden 30 saniye süre ile ikişer kez, absölü alkol ile 30 saniye süre ile bir kez, bir dakika süre ile iki kez ksilolden geçirilerek üzerlerine iki damla entellen damlatılıp lamelle kapatılmıştır.

Kesitlerde spinal kord hipoksik değişiklikleri gri-beyaz cevher ayırımı, glial hücrelerde kayıp ve parankimde vakuolizasyon değerlendirilerek noniskemik, hafif ve şiddetli iskemik değişiklikler olarak sınıflandırılmıştır.

3.4. İstatistik

Çalışmamızın istatistiksel değerlendirilmesi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı tarafından yapıldı. Sonuçlar SPSS 19.0 (Statistical Package for Social Sciences) kullanılarak analiz edildi. Örneklemi tanımlamak için frekans dağılımı, ortalama, standart sapma gibi tanımlayıcı istatistikler kullanıldı. Sürekli değişkenlerin gruplara göre karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Analizlerde farklılıkların belirlenmesi için % 95 anlamlılık düzeyi (ya da $\alpha=0.05$ hata payı) kullanıldı.

Biyokimyasal değerlendirmede ise gruplardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat software kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis tek yönlü ANOVA analizini takiben Dunn's Method ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Bütün gruplarda her rat için anestezi ve cerrahi işlemle birlikte takip edilen toplam süre 150 dakika olarak belirlendi.

Ratların ağırlıklarının gruplara göre dağılımı **Çizelge 4.1**'de gösterilmiştir. Ratların ağırlıkları gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermedi ($p>0.05$).

Grup S : Sham Grubu

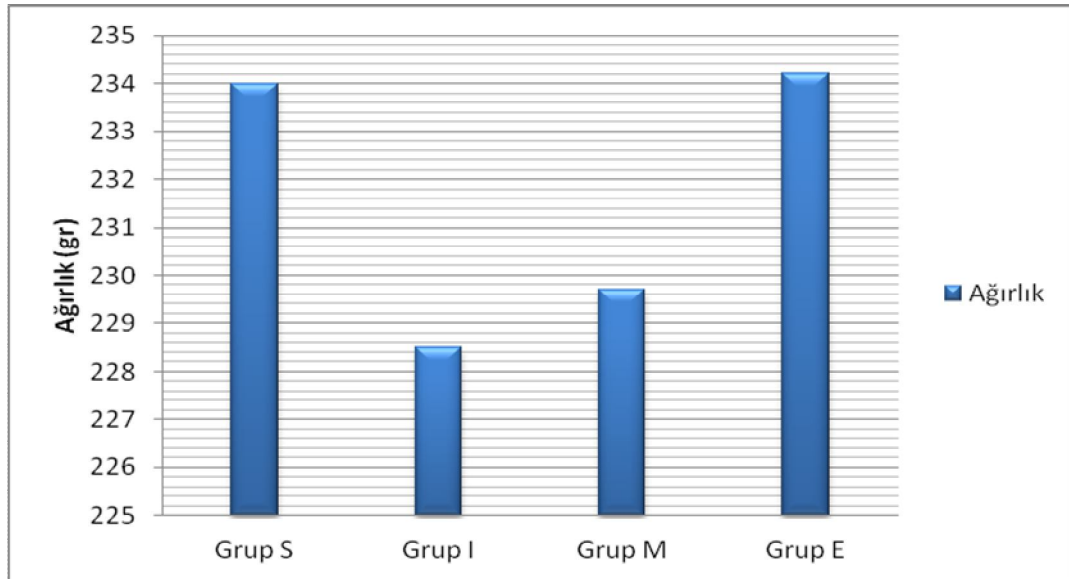
Grup M : Metilprednizolon Grubu

Grup I : İskemi Grubu

Grup E : Eritropoetin Grubu

Çizelge 4.1. Ratların ağırlıklarının (gr) ortalama ve \pm SS değerleri.

Grup	n	Minimum	Maximum	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca
Grup S	3	230	240	234	5,29	232
Grup I	10	200	260	228,5	17,6	225
Grup M	10	205	250	229,7	16,6	232
Grup E	10	200	260	234,2	18,6	237,5

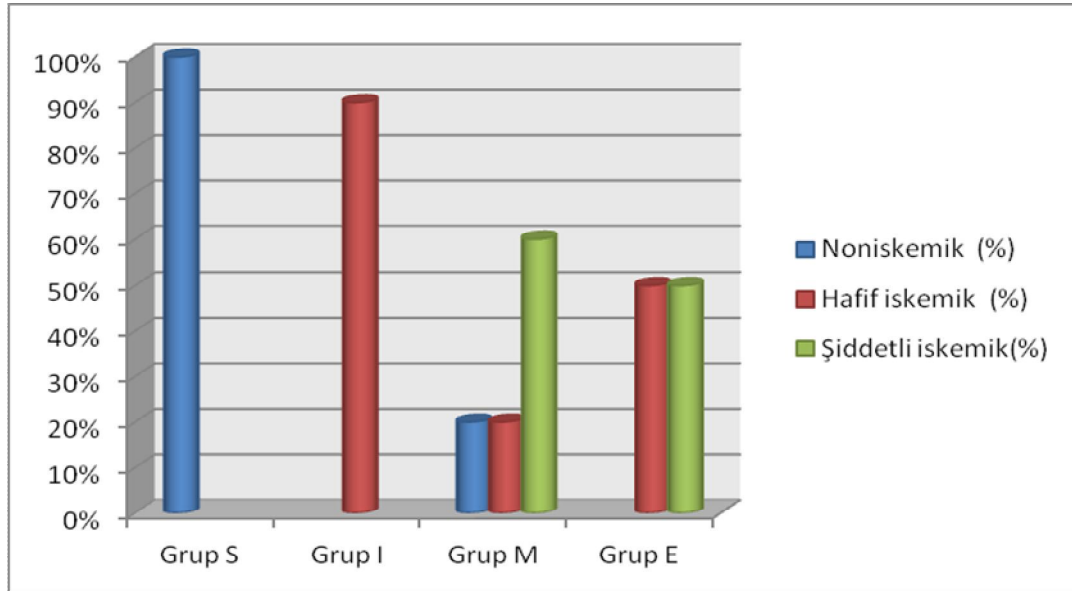


Şekil 4.1. Gruplara göre rat ağırlıklarının karşılaştırılması.

Ratların gruplara göre patolojik değerlendirme sonuçları **Çizelge 4.2**'de gösterilmiştir. Kesitler ışık mikroskopi ile incelendiğinde Grup S de % 100 non-iskemik, Grup I'de 1 sıçanın örnekleme sınıflanamamış olup, % 100 oranında hafif iskemik bulunmuştur. Grup M'de % 20 non-iskemik, %20 hafif iskemi ve % 60 şiddetli iskemi, Grup E ise % 50 hafif iskemi ve % 50 şiddetli iskemi saptanmıştır.

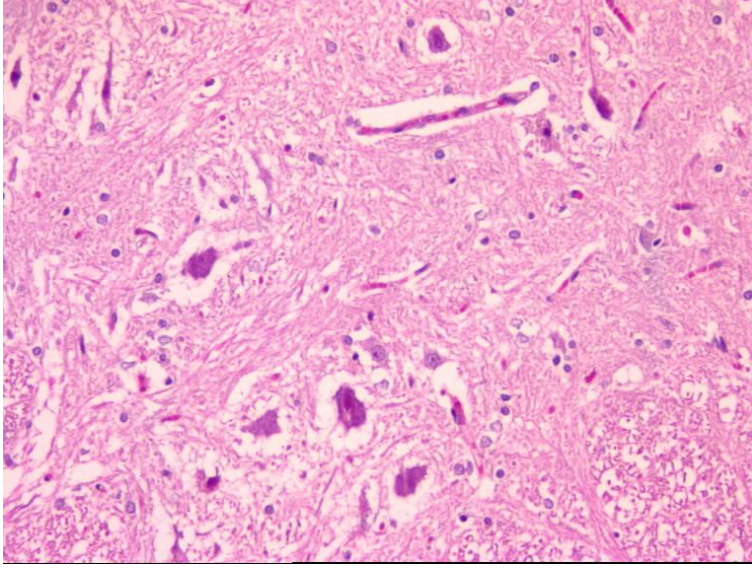
Çizelge 4.2. Gruplara göre patolojik değerlendirme sonuçları.

	Non-iskemik (%)	Hafif iskemik (%)	Şiddetli iskemik(%)
Grup S	%100 (n=3)		
Grup I		% 100 (n=9)	
Grup M	%20 (n=2)	%20 (n=2)	%60 (n=6)
Grup E		%50 (n=5)	%50 (n=5)

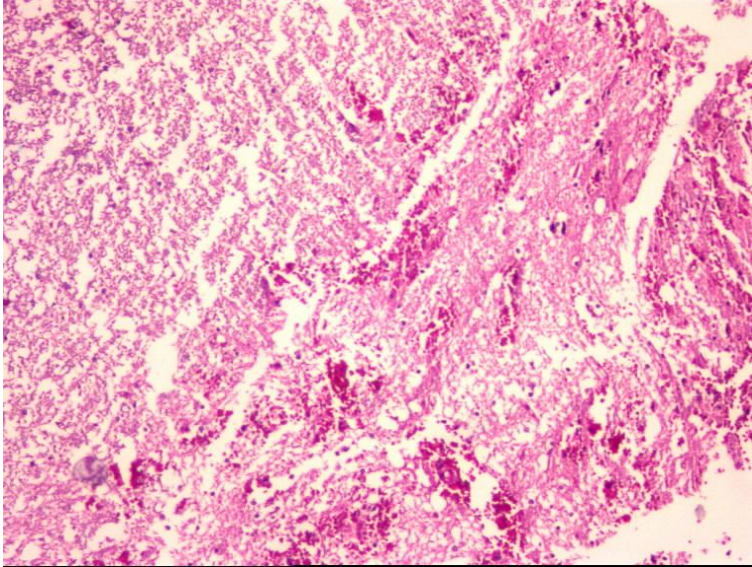


Şekil 4.2. Gruplara göre patolojik değerlendirme sonuçlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.3 ve **Şekil 4.4**'de ratların ışık mikroskop ile incelenmesi sonucunda gözlenen nöronlarda hafif iskemik değişiklik ve şiddetli iskemik değişiklik (gri-beyaz cevher ayırımı yapılmaması, parankimde vakuolizasyon, glial hücrelerde kayıp) gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Nöronlarda hafif iskemik değişiklik.



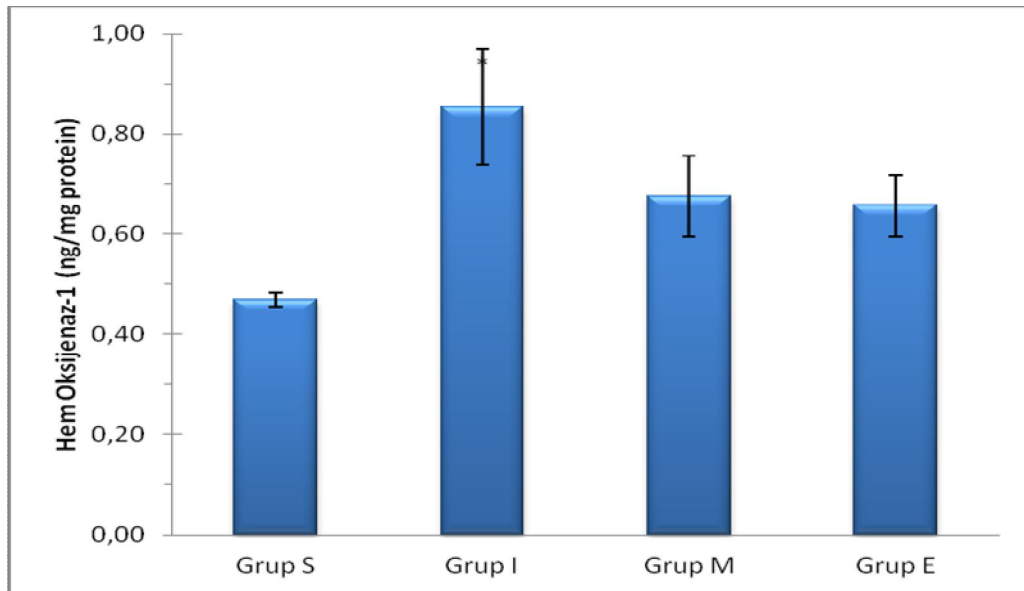
Şekil 4.4. Nöronlarda şiddetli iskemik değişiklik (gri-beyaz cevher ayırımı yapılamıyor, parankimde vakuolizasyon, glial hücrelerde kayıp).

Ratların Hem Oksijenaz (ng/mg protein) değerlerinin gruplara göre karşılaştırılması **Çizelge 4.3**'de gösterilmiştir. Veriler ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir. Gruplardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat Software kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal-Wallis tek yönlü ANOVA analizini takiben Dunn's Method ile değerlendirilmiştir.

Grup I'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterirken ($p < 0.05$), Grup M ve Grup E'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre artış göstermiş ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Grup I'de 1 rat çalışma dışı bırakılmıştır.

Çizelge 4.3. Ratların Hem Oksijenaz (ng/mg protein) ortalama ve \pm SH değerleri.

	n	Ortalama	Std. Dev.	Std. Hata
Grup S	3	0,47	0,0265	0,0153
Grup I	9	0,903	0,348	0,116
Grup M	10	0,675	0,254	0,0804
Grup E	10	0,656	0,195	0,0616

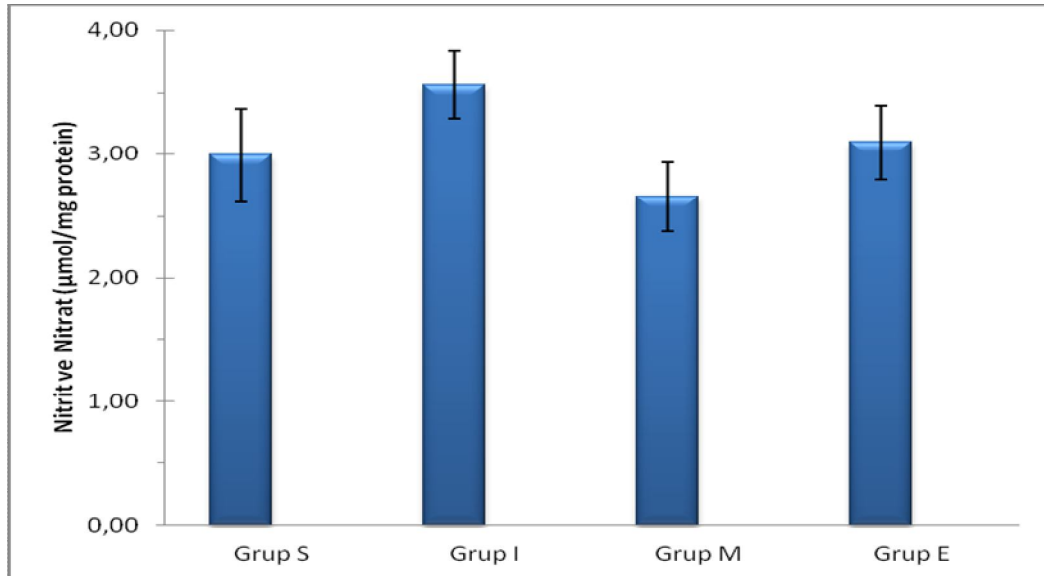


Şekil 4.5. Gruplara göre Hem Oksijenaz 1 sonuçlarının karşılaştırılması.

Ratların Nitrit ve Nitrat ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) değerleri gruplara göre karşılaştırılması **izelge 4.4** 'de gösterilmiştir. Veriler ortalama \pm Standart Hata olarak verilmiştir. Gruplardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat software kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılık tek yönlü ANOVA analizi ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.4. Ratların Nitrit ve Nitrat ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) ortalama ve \pm SH değerleri.

	n	Ortalama	Std. Dev	Std. Hata
Grup S	3	2,99	0,65	0,375
Grup I	10	3,562	0,864	0,273
Grup M	10	2,657	0,873	0,276
Grup E	10	3,092	0,945	0,299



Şekil 4.6. Gruplara göre Nitrit ve Nitrat sonuçlarının karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Günümüzde gelişen cerrahi tekniklere karşın spinal kord hasarı, elli yaş altındaki ölüm ve sakat kalmanın en önemli nedenlerinden biri olarak, ekonomik açıdan maliyetinin yüksek olması ve standart bir tedavisi olmaması nedeni ile halen ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir. Toplum üzerindeki fiziksel, emosyonel ve sosyoekonomik etkileri ile birlikte travmaya uğramış kişinin yaşam kalitesindeki bozulma, çok ciddi problemler olarak karşımıza çıkmaktadır [159].

Yapılan deneysel çalışmalar, travma sonrası oluşan omurilik hasarının karmaşık olduğunu; birincil ve ikincil hasar olarak iki aşamada geliştiğini ortaya koymuştur. Birincil hasar travma anında gerçekleşir, doku hasarı ve hücre ölümü sonucu meydana gelir. İkincil hasar ise birincil yaralanma ile başlatılmış birçok mekanizmayla oluşan hücre ölüm kaskadı sonucunda meydana gelen nörolojik hasardır. Deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler spinal kord lezyonlarının büyük oranda ikincil hasar mekanizmasıyla genişlediğini göstermektedir [6]. Travmaya bağlı spinal kord yaralanmalarında özellikle ikincil hasarı önlemeye yönelik olarak denenilen tedavilerden yüksek doz metilprednizolon tedavisi hariç hiçbir rutin tedavi yöntemleri arasına girememiştir.

Çalışmamızda sıçanlarda klip kompresyon metoduyla gerçekleştirilen deneysel SKH modelinde intraperitoneal (İP) uygulanan EPO'nin, serebral korumada etkili olan HO-1 ve NOS enzimleri üzerine olan etkinliğini göstermeyi amaçladık.

Deney hayvanı olarak sıçanların tercih edilmesinin sebebi kolay bulunabilir olmaları; uzun süreli anesteziye dirençli olmaları ve vasküler işlevlerinin insanlara benzerliğidir [35]. Bu nedenle çalışmamızda deney hayvanı olarak Wistar rat kullandık.

Çalışmamızda standart travma sağlayabilmek amacı ile Rivliv ve Tator tarafından tarif edilen klip kompresyon modeli uyguladık. Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak, aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana

gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model olmaktadır. Biz de çalışmamızda Sugita geçici anevrizma klipi ile spinal korda 3 dakika kompresyon uygulayarak iskemik hasarın oluştuğunu yaptığımız ön çalışma ile tespit ettik.

Deneysel akut spinal kord yaralanması sonrası değerlendirilmede pek çok kriter kullanılmaktadır. Bunlar klinik muayene, histolojik değerlendirme (ışık ve elektron mikroskopik değerlendirme), görüntüleme (örn. Manyetik rezonans), anjiyografi, spinal kord kan akımı, biyokimyasal tetkikler, nörofizyolojik testler (uyarılmış potansiyeller) olarak sayılabilir. Çalışmamızda deneklerin deney sonrası değerlendirilmesinde biyokimyasal tetkikler ve histopatolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme uyguladık.

Geliştirilmeye çalışılan etkin farmakolojik tedavi yöntemleri, travma sonrası gelişen süreçlerin patofizyolojisinin iyi anlaşılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Travma sonrasındaki ilk birkaç gün içerisinde omurilikte oluşan lezyonun patolojik görüntüsündeki değişiklikler, klinik ve deneysel gözlemlerin en önemli noktasını oluşturmaktadır [160]. Bizim çalışmamızda sıçanın örnekleri, gruplar açısından “kör” olan bir patolog tarafından ışık mikroskopik olarak değerlendirildi ve iskemi sınıflandırılması yapıldı.

Spinal kord hasarının son yıllardaki histopatolojik incelemeleri bir görüntü analiz sistemi kullanılarak ölçülmektedir [161]. Bu şekilde bulgular objektif olarak değerlendirilmekte ve uygun istatistiksel yöntemlerle daha kesin sonuçlara ulaşılabilmektedir. Ancak bu çalışmada böyle bir teknik kullanılmadığından histopatolojik olarak kesin sonuçlara ulaşmak mümkün olmadı.

İskemi reperfüzyon hasarında serbest oksijen radikallerinin rolü ayrıntılı olarak araştırılmıştır. Kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, intestinal sistem ve diğer dokular üzerinde serbest oksijen radikallerinin etkileri hakkında geniş bilgiler elde edilmesine rağmen, spinal kord üzerine olan etkileri konusundaki bilgiler sınırlı kalmıştır. Spinal kord hasarının yalnızca iskemi sırasında değil, reperfüzyon fazında da geliştiği düşünülmektedir [162].

Reperfüzyon hasarı, moleküler oksijenin toksik metabolitleri ile oluşur. Oksijen, karbondioksit ve suya metabolize olur. Hipoksi sonucu, elektron transport sisteminde bozulmaya bağlı olarak, reperfüzyon döneminde ani olarak artan oksijen, su ve karbondioksit yerine sitotoksik serbest oksijen radikallerine

dönüşmeye başlar [163]. Aerobik hücrelerde oluşan en önemli sitotoksik oksijen metabolitleri, süperoksid anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve serbest hidroksil radikalidir (OH^-). Serbest oksijen radikallerinin membran lipidlerinin peroksidasyonuna neden olarak membranın kompozisyonunu, morfolojisini ve fonksiyonunu bozduğu düşünülmektedir [164].

Hayvan deneylerinde EPO'nun in vivo olarak fokal ve global beyin iskemisine karşı nöronları koruduğu gösterilmiştir [165, 166]. EPO'nun nöroprotektif etkisini, glutamik asit toksisitesine aracılık eden nitrik oksit'in fazla yapımını önlemek ve hipoksik-iskemik beyin hasarının patofizyolojisinde rol oynayan serbest oksijen radikallerini azaltmak yoluyla yaptığı belirtilmektedir [167]. EPO'nun in vitro olarak oluşturulan hipoksi modelinde, nöronlardaki apoptotik hücre ölümünü azalttığı gösterilmiştir [168]. Aydın ve ark. yaptıkları hayvan çalışmasında, in vivo olarak EPO'nun beyinde gelişen hipoksi iskemiyeye karşı koruyucu olduğunu belirtmişlerdir [169]. Sakanaka ve ark., beyinde oluşturulan nöronal iske mi öncesinde EPO verildiğinde nöronlarda iskemiyeye bağlı hücre ölümüne karşı önemli koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir [170]. Junk ve ark., EPO'nun bu nöroprotektif etkisinden hareketle iskemik retina üzerinde koruyucu etki gösterdiğini belirtmişlerdir [171].

Siren ve ark., EPO'nun serebral iske mi sonrası anti-apoptotik etki göstererek hücre kaybı ve nekrozu önlediğini [172], Solaroğlu ve ark., intrauterin serebral iske mi-reperfüzyon oluşturmuş oldukları ratlarda verilen EPO'nun, oksidatif hasarı önlemek suretiyle nöroprotektif etki gösterdiğini [173], Calapai ve ark. ise beyin iskemisinde EPO'nun nöroprotektif etkisinin olduğunu ve bu etkisinin nitrik oksit formasyonunun inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştirdiğini belirtmişlerdir [174].

Sadamato ve ark., geçici serebral arter oklüzyonu oluşturdukları ratlarda EPO'nun kortikal enfarkt, talamik dejenerasyon, yer ve yön bulma bozukluğunu düzelttiğini göstermişlerdir. Ayrıca EPO reseptör sayısındaki artışın, nöronlarda EPO'nun sinyal geçişini kolaylaştırdığını ve hasarlı alanın genişlemesini önlediğini düşündüren serebrokortikal enfarkt çevresinde EPO-mRNA'sında artış oluştuğu da gösterilmiştir [152]. Sakanaka ve ark., gerbillerde oluşturdukları serebral iske mi modelinde lateral ventriküle solübl EPO reseptör infüzyonu

yaptıkları bir çalışmada, EPO'nun nöron yaşamını arttırdığını bildirmişler, solubl EPO reseptör infüzyonunun EPO'ya yanıt latans süresini ve nöron hücre dansitesini anlamlı derecede azalttığını saptamışlardır [166].

Klinikte subkutan, intravenöz yollarla kullanılan EPO, deneysel çalışmalarda intraperitoneal, intraserebroventriküler, intravenöz yollarla uygulanarak iskemiyeye karşı nöron koruyucu etkisi araştırılmaktadır [174]. Marti ve ark. EPO'nun kan beyin bariyerini geçemediğini, serum ve BOS'ta EPO konsantrasyonları arasında bir ilişki bulunmadığını, kan beyin bariyer bütünlüğü bozulduğunda BOS EPO miktarlarında artış gözlendiğini bildirmişlerdir [175]. İskemi, hipoksi, travma, immünite aracılığı ile oluşan enflamasyon ve aşırı nöronal eksitasyon gibi durumlarda periferik yolla enjekte edilen r-hEPO, beyin dokusunda koruyucu etki oluşturabilmektedir. EPO'nun kan beyin bariyerinde kapillerlerde EPO reseptörlerinin bulunması, biyotinlenmiş r-hEPO'nun periferik enjeksiyonun sonrasında büyük damarlar dışında sadece kan beyin bariyerindeki kapillerlerde yoğunlaştığının gözlenmesi ve EPO'nun beyine spesifik reseptör aracılı bir transport ile geçtiğini düşündürmektedir. Travma sonrasında meydana gelen enflamatuvar yanıt, kan beyin bariyerinde permeabilite artışına ve nonspesifik transportun başlamasına neden olmaktadır.

İntratekal EPO uygulamalarında çok küçük miktarlara ve çok daha düşük dozlara gereksinim duyulmaktadır. İntratekal yolun klinik uygulamada pratik olmaması ve etki lokalizasyonunun sınırlı kalması nedeniyle, sistemik EPO uygulamaları daha yaygın kullanılmaktadır. Deneysel çalışmalarda EPO, ratlara iskemik hasarı önlemek amacıyla genellikle intraperitoneal olarak 500-5000 Ü/kg dozunda uygulanmıştır [171, 176-178]. Bizde çalışmamızda intraperitoneal yolla 5000 IÜ/kg EPO vermeyi tercih ettik.

Siren ve ark., primer rat spinal motor nöron kültürlerinde kainik asit uygulaması ile oluşturulan apoptozisin EPO ile önlendiğini ve EPO'nun hücre koruyucu etkisinin hem nöron/glia, hem de pürifiye motor nöron kültürlerinde ortaya çıkmasının nöronlarda direkt olarak EPO reseptörleri aracılığı ile oluşan EPO etkisini gösterdiğini bildirmişlerdir [172].

Çalışmalardan anlaşılacağı üzere, EPO'nun oluşturulan iskemi-reperfüzyon modellerinin hepsinde hücre koruyucu etki gösterdiği, apoptozisi ve nekrozu

önlediği anlaşılmaktadır. Ratlarda spinal kordda oluşturulan iskemi-reperfüzyon modeline EPO'nun etkisine yönelik olarak yapılmış yeterli çalışma yoktur ve bu etkilerin oluşumuna aracılık eden mekanizmalar ve moleküler yollar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmamızda EPO'nun nöroprotektif etkisi araştırılmış, geçici spinal iskemi sonrasında reperfüzyon başlangıcında intraperitoneal verilen EPO'nun, diğer gruplara oranla tedavi grubunda spinal kordun histopatolojik değerlendirmesinde iskemik motor nöron hasarını azaltmasını beklediğimiz halde, çalışmamızda EPO kullanılarak tedavi uygulanan grupta, diğer gruplara göre iskemik motor nöron hasarının şiddetinde anlamlı azalma saptanmamıştır.

Sekonder hasarın ilerlemesinde önemli diğer bir mekanizma travma sonrası meydana gelen aşırı nitrik oksit sentezidir. NO düşük derişimlerde düzenleyici ve koruyucu etkiler gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda ise, süperoksid radikali veya moleküler oksijen ile reaksiyona girerek oksidatif ve nitrozatif stres oluşturarak toksik sonuçlara neden olur; inflamasyon, dolaşımsal şok ve iskemi-reperfüzyon fizyopatolojisinde nitrik oksitin yol açtığı sitotoksitenin temelini oluşturur. NO kısa yarı ömrü ve kararsız yapısından dolayı kararlı ürünleri nitrit ve nitrat ve son ürün olan nitrotirozin düzeylerinin ölçümü ile dolaylı olarak ölçülür [179]. Kahraman ve ark. deneysel spinal kord yaralanmasında metilprednizolon tedavisinin nitrit/nitrat düzeylerini azalttığını bildirmiştir [180].

Çalışmamızda grupların tüm biyokimyasal incelemeleri Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda her grup aynı gün ve aynı koşullarda olmak üzere yapılmıştır. Grupların Nitrit/nitrat düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EPO etkinliğinin bu yolla aktive olmadığı görüşüne ulaşılmıştır.

Mitokondri fizyolojik koşullarda hücrede ATP üretimi, intrasellüler kalsiyum regülasyonu, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve apoptoz gibi bir çok hücreyel olayda önemli rollere sahip olduğu için ve özellikle süperoksid üretimine bağlı apoptotik kaskadın başlaması hücrenin canlılığı açısından önemli olduğundan son yıllarda antioksidan proteinlerin mitokondriye hedeflenmesi ve bu proteinlerin mitokondriyal apoptotik proteinler üzerindeki regüle edici etkilerinin incelenmesi yeni terapötik bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir [181]. Converso ve Ark.

karaciğer mitokondrisinde HO-1 varlığını göstermişlerdir ve mitokondriyal HO-1 indüksiyonunun hemoproteinlerden olan NOS enzim ekspresyonunu azaltarak mitokondride NO'ya bağlı oksidan üretiminin bloke olduğunu bildirmişlerdir [115]. Bu etki HO inhibisyonu ile geri çevrilmiştir. HO-1'in hücrenin mitokondri ve sitoplazmik kompartmanlarında lokalize olması antioksidan olarak bu enzimin CO ve bilirubin üzerinden veya hem düzeyini değiştirerek mitokondride süperoksit üretiminden sorumlu hemoproteinlerin regülasyonunda rol alarak mitokondri aracılı apoptotik süreçte regüle edici etki gösterebileceğini vurgulamaktadır. Çalışmamızda SKH sonrası tüm gruplarda HO-1 düzeyi biyokimyasal analizler ile incelenmiştir. Grup I'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı olarak artış gösterirken ($p<0.05$), Grup M ve Grup E'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Ve EPO etkinliğinin bu yolakla aktive olmadığı kanaatine ulaşılmıştır.

6. SONUÇ

Akut spinal kord hasarı gerek meydana getirdiği sonuçlar, gerekse etkin bir tedavi protokolünün oluşturulamamış olması nedeniyle önemli bir sorun olma özelliğini devam ettirmektedir. Günümüzde buna yönelik tedavi denemelerinde, özellikle travma sonrası oluşan ilerleyici hasarın engellenmesinde birçok hedefe yönelik ilaç protokolleri önem kazanmıştır. Eritropoetin, son zamanlarda in vivo ve in vitro çalışmalarda, travma sonrası nöroprotektif etkisi konusunda ön plana çıkmıştır.

Sonuç olarak, EPO'nin daha önce yapılmış çalışmalarda gösterildiği gibi nöroprotektif etkili olduğu düşünülmektedir. Fakat nöroprotektif etkinliğini hangi mekanizma ile yaptığı bilinmemektedir.

Çalışmamız sonucunda, deneysel olarak spinal kord iskemisi geliştirilen deneklerde yapılan patolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler sonuçlarında, Grup I'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı olarak artış gösterirken, Grup M ve Grup E'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı farklılık göstermemiştir. Nitrit/Nitrat düzeyinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamızda EPO'nin nöroprotektif etkinliğinin Nitrik Oksit Sentaz ve Hem Oksijenaz 1 yolakları üzerinden olmadığı sonucuna vardık.

Ancak klinikte rutin kullanımı için ileri çalışmalarda desteklenmesinin gerektiği, nöronal hücre düzeyinde oluşacak etkilerin moleküler düzeyde çalışmalarda aydınlatılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

7. ÖZET

RATLARDA AKUT SPİNAL KORD YARALANMASINDA NÖROPROTEKTİF ERİTROPOETİNİN HEM OKSİJENAZ-1 (HO-1) VE NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) ENZİMLERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

SKH'ında birincil yaralanma, travma anında gerçekleşmekte olup, doku hasarı ve hücre ölümü sonucu meydana gelir. İkincil yaralanma ise endojen hücre ölümü yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan ölüm kaskatının bir sonucudur. Deneysel çalışmalar ve klinik gözlemler spinal kord lezyonlarının daha çok ikincil hasar mekanizmasıyla genişlediğini göstermektedir.

Günümüze kadar elde edilen bilgiler ışığında çalışmamızda sıçanlarda klip kompresyon metoduyla gerçekleştirilen deneysel SKH modelinde intraperitoneal (İP) uygulanan EPO'nin, HO-1 ve NOS enzimlerine olan etkinliği ile nöronal koruma sağladığını göstermeyi amaçladık.

Çalışmada 33 adet erişkin dişi Wistar albino cinsi ratlar dört gruba ayrıldı. Etil karbamate 1.2-1.4 gr/kg ile anestetize edildi. Torakal 6-10 seviyesinden laminektomi uygulandıktan sonra spinal kord iskemisi oluşturulan gruplarda 11 mm. ve 70 gr. kapanma basınçlı klip ile 3 dakika kompresyon uygulandı. Sham grubuna sadece laminektomi uygulandı, iskemi grubuna ise laminektomi sonrası farmakolojik ajan verilmedi. Reperfüzyon başlangıcında Eritropoetin grubuna 5000 Ü/kg İP EPO, Metilprednizolon grubuna ise 30 mg/kg İP MP verildi ve 2 saat sonra spinal kord örnekleme yapıldı. Patolojik olarak ışık mikroskopisi ile değerlendirildi, biyokimyasal olarak ise Hem Oksijenaz 1 ve Nitrit/Nitrat düzeyi incelendi. Grup I'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı olarak artış gösterirken, Grup M ve Grup E'de Hem Oksijenaz-1 aktivitesi Grup S'e göre anlamlı farklılık göstermedi. Nitrit/Nitrat düzeyinde ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Sonuç olarak; EPO'nin nöroprotektif etkinliğinin Nitrik Oksit Sentaz ve Hem Oksijenaz 1 yolları üzerinden olmadığı sonucuna vardık. Ancak ileri çalışmalarla desteklenmesinin gerektiği, nöronal hücre düzeyinde oluşacak etkilerin moleküler düzeyde çalışmalarla aydınlatılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

Anahtar sözcükler: Spinal Kord Hasarı, Eritropoetin, Hem Oksijenaz 1, Nitrik Oksit Sentaz

8. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF NEUROPROTECTIVE ERYTHROPOETINE ON HEME OXYGENASE 1 AND NITRIC OXIDE SYNTASE ENZYMES IN RATS WITH ACUTE SPINAL CORD INJURY

Primary injury in Spinal Cord Injury (SCI) occurs at the time of trauma that arises from tissue trauma and cell death. Secondary injury is the result of death cascade caused by the activation of endogenous cell death paths. Experimental studies and clinical observations show that spinal cord lesions expand by means of secondary injury mechanisms.

We aimed to show that intraperitoneal administration of EPO has neural protection by its effects on HO-1 and NOS enzymes in experimental SCI models using clip compression in light of the ongoing knowledge.

33 adult, female Wistar albino rats were divided into four groups in our study. They were anaesthetised by etil carbamate using 1.2-1.4 gr/kg. After spinal cord ischemia was performed following laminectomy at the levels of thoracal 6 – 10, compression was administered for 3 minutes with a clip of 11 millimeters and 70 gr closing pressure. Sham group only received laminectomy, in ischemia group no pharmacological agents were administered after laminectomy. At the beginning of reperfusion, 5000 U/kg IP EPO was given to group Erythropoetine and 30 mg/kg IP MP was given to group Metile Prednisolone and spinal cord sampling was performed after 2 hours. Samples were evaluated pathologically by means of light microscopy, Heme Oxygenase 1 and levels were investigated biochemically. Heme Oxygenase 1 activity was significantly high in Group I with respect to Group S, whereas its activity was not significantly different between Group S, Group M and Group E. For the levels of Nitrit/nitrate, no significant differences were seen between the groups.

As a result, we concluded that neuroprotective effects of EPO does not rely on Nitric Oxide Syntase and Heme Oxygenase 1 pathways. But we believe that advanced studies should be performed and studies on molecular levels would be appropriate to enlighten the effects occurring on the basis of neuronal cell.

Key Words: Spinal cord injury, Erythropoetine, Heme Oxygenase 1, Nitric Oxide Syntase.

9. KAYNAKLAR

1. Marion DW. Head and spinal cord injury. *Neurol Clin* 1998; 16(2): 485-502.
2. Dumont AS, Dumont RJ, Oskouian RJ. Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Curr Opin Neurol* 2002; 15(6): 713-20.
3. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001; 26(24 Suppl): 2-12.
4. Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. *Science* 2002; 295(5557): 1029-31.
5. Fehlings MG. Summary statement: the use of methylprednisolone in acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001; 26(24 Suppl): 55.
6. Kwon BK. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4(4): 451-64.
7. Ran R. Hsp70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK gamma and impairing NF-kappa B survival signaling. *Genes Dev* 2004; 18(12): 1466-81.
8. Ueno T. Spinal cord protection: development of a paraplegia-preventive solution. *Ann Thorac Surg* 1994; 58(1): 116-20.
9. Abraham VS. Ischemic preconditioning protects against paraplegia after transient aortic occlusion in the rat. *Ann Thorac Surg* 2000; 69(2): 475-9.
10. Eckard DA. Intraarterial papaverine for relief of catheter-induced intracranial vasospasm. *AJR Am J Roentgenol* 1992; 158(4): 883-4.
11. Gharagozloo F. Spinal cord protection during surgical procedures on the descending thoracic and thoracoabdominal aorta: review of current techniques. *Chest* 1996; 109(3): 799-809.
12. Herold JA. Complete prevention of postischemic spinal cord injury by means of regional infusion with hypothermic saline and adenosine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107(2): 536-41; discussion 541-2.
13. Hirose K. Activated protein C reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by inhibiting neutrophil activation. *Ann Surg* 2000; 232(2): 272-80.
14. Kaku Y. Superselective intra-arterial infusion of papaverine for the treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 1992; 77(6): 842-7.
15. Kassell NF. Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial papaverine. *J Neurosurg* 1992; 77(6): 848-52.
16. Matsumoto M. The effects of N(G)-nitro-L-arginine-methyl ester on neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 1999; 89(3): 696-702.
17. Miyamoto TA, Miyamoto KJ. A word of caution in extrapolating the spinal cord protective effects of memantine obtained in a rabbit model under ketamine anesthesia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 118(4): 770-1.
18. Pallan TM. Incompatibility of Isovue 370 and papaverine in peripheral arteriography. *Radiology* 1993; 187(1): 257-9.

19. Rokkas CK. Profound systemic hypothermia protects the spinal cord in a primate model of spinal cord ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106(6): 1024-35.
20. Woloszyn TT. Cerebrospinal fluid drainage and steroids provide better spinal cord protection during aortic cross-clamping than does either treatment alone. *Ann Thorac Surg* 1990; 49(1): 78-82; discussion 83.
21. Baltalarli A. Protective effects of trimetazidine in transient spinal cord ischemia. *Res Exp Med (Berl)* 2000; 200(1): 43-51.
22. Coskun K. Early protective effects of iloprost after experimental spinal cord ischemia in rabbits. *Acta Neurochir (Wien)* 2000; 142(10): 1143-50.
23. Ehrlich M. Memantine for prevention of spinal cord injury in a rabbit model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117(2): 285-91.
24. Ilhan A. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999; 16(4): 458-63.
25. Lang-Lazdunski L. Riluzole prevents ischemic spinal cord injury caused by aortic crossclamping. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117(5): 881-9.
26. Lips J. Neuroprotective effects of riluzole and ketamine during transient spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology* 2000; 93(5): 1303-11.
27. Mackey ME. Cell death suggestive of apoptosis after spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 1997. 28(10): p. 2012-7.
28. Wakamatsu H. The effects of moderate hypothermia and intrathecal tetracaine on glutamate concentrations of intrathecal dialysate and neurologic and histopathologic outcome in transient spinal cord ischemia in rabbits. *Anesth Analg* 1999; 88(1): 56-62.
29. Bernaudin M. Neurons and astrocytes express EPO mRNA: oxygen-sensing mechanisms that involve the redox-state of the brain. *Glia* 2000; 30(3): 271-8.
30. Bernaudin M. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(6): 643-51.
31. Zaman K. Protection from oxidative stress-induced apoptosis in cortical neuronal cultures by iron chelators is associated with enhanced DNA binding of hypoxia-inducible factor-1 and ATF-1/CREB and increased expression of glycolytic enzymes, p21(waf1/cip1) and erythropoietin. *J Neurosci* 1999; 19(22): 9821-30.
32. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998; 56(3): 341-58.
33. Khan M, Griebel R. Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. *Can J Neurol Sci* 1983; 10(3): 161-5.
34. Black P. Models of spinal cord injury: Part 1. Static load technique. *Neurosurgery* 1986; 19(5): 752-62.
35. Rubinstein A, Arbit E. Spinal cord blood flow in the rat under normal physiological conditions. *Neurosurgery* 1990; 27(6): 882-6.
36. Kwon BK. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2005; 30(17 Suppl): 3-13.
37. Kaplan A. *Anatomi. 2. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara* 1997; 209.

38. Kayhan Z, Akpek EA. Spinal Cerrahide Anestezi. Nöroanestezi 2000. Atlas Kitapçılık Güneş Kitabevi, Ankara: 235-82.
39. Zileli M. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Cilt 1 2002; 87–90.
40. Dumont RJ. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. Clin Neuropharmacol 2001; 24(5): 254-64.
41. Marketos SG, Skiadas P. Hippocrates. The father of spine surgery. Spine (Phila Pa 1976) 1999; 24(13): 1381-7.
42. Tator CH. Strategies for recovery and regeneration after brain and spinal cord injury. Inj Prev 2002; 8 Suppl 4: IV33-6.
43. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurgery 1999; 44(5): 1027-39; discussion 1039-40.
44. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. J Neurosurg 1991; 75(1): 15-26.
45. Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. Spine (Phila Pa 1976) 2002; 27(14): 1504-10.
46. Watson BD. Photochemically induced spinal cord injury in the rat. Brain Res 1986; 367(1-2): 296-300.
47. Stokes BT, Noyes DH, Behrmann DL. An electromechanical spinal injury technique with dynamic sensitivity. J Neurotrauma 1992; 9(3): 187-95.
48. Khan T. Animal models of spinal cord contusion injuries. Lab Anim Sci 1999; 49(2): 161-72.
49. 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 1989; 74(4): 241-59.
50. Fehlings MG, Tator CH. An evidence-based review of decompressive surgery in acute spinal cord injury: rationale, indications, and timing based on experimental and clinical studies. J Neurosurg 1999; 91(1 Suppl): 1-11.
51. Fehlings MG, Tator CH. The effect of direct current field polarity on recovery after acute experimental spinal cord injury. Brain Res 1992; 579(1): 32-42.
52. Li Y, Field PM, Raisman G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. J Neurosci 1998; 18(24): 10514-24.
53. Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. J Emerg Med 1993; 11 Suppl 1: 13-22.
54. Zileli M. Omurilik yaralanmalarında farmakolojik tedavi. Omurilik ve omurga cerrahisi 2002; 833.
55. Mauter AE. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. Phys Ther 2000; 80(7): 673-87.
56. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J 1988; 2(10): 2557-68.
57. Panahian N, Yoshiura M, Maines MD. Overexpression of heme oxygenase-1 is neuroprotective in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in transgenic mice. J Neurochem 1999; 72(3): 1187-203.

58. Faden AI, Simon RP. A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 1988; 23(6): 623-6.
59. Güzel A, Ökten Aİ, Çaylı S. Pathology and Physiopathology of Spinal Cord Injury. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2006; 28 (2): 73-8.
60. Campese VM. Regional expression of NO synthase, NADPH oxidase and superoxide dismutase in the rat brain. *Brain Res* 2007; 1134(1): 27-32.
61. Chabrier PE, Demerle-Pallardy C, Auguet M. Nitric oxide synthases: targets for therapeutic strategies in neurological diseases. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55(8-9): 1029-35.
62. Lu K. Injury severity and cell death mechanisms: effects of concomitant hypovolemic hypotension on spinal cord ischemia-reperfusion in rats. *Exp Neurol* 2004; 185(1): 120-32.
63. Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5(1): 97-104.
64. Li M. Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 2000; 99(2): 333-42.
65. Öz B. Medulla spinalis yaralanmalarında patoloji 2000; 137-42.
66. Buss A. Gradual loss of myelin and formation of an astrocytic scar during Wallerian degeneration in the human spinal cord. *Brain* 2004; 127(Pt 1): 34-44.
67. Dumont RJ. Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24(5): 265-79.
68. Koc RK. Effect of methylprednisolone, tirilazad mesylate and vitamin E on lipid peroxidation after experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1999; 37(1): 29-32.
69. Topsakal C. Effects of methylprednisolone and dextromethorphan on lipid peroxidation in an experimental model of spinal cord injury. *Neurosurg Rev* 2002; 25(4): 258-66.
70. Young W. Molecular and cellular mechanisms of spinal cord injury therapies. *Neurobiology of spinal cord injury*, Humana Press, Totowa 2000; 241-76.
71. Tuma RF. Hypertonic saline administration attenuates spinal cord injury. *J Trauma* 1997; 42(5 Suppl): 54-60.
72. Katori M, Oda T, Nagai K. A site of action of dexamethasone on leukocyte extravasation in microcirculation. *Agents Actions* 1990; 29(1-2): 24-6.
73. Anderson DK. Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg* 1982; 56(1): 106-13.
74. Young W, Bracken MB. The Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *J Neurotrauma* 1992; 9 Suppl 1: 397-405.
75. Braugher JM. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 1987; 67(1): 102-5.
76. Bracken MB, Holford TR. Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg* 1993; 79(4): 500-7.

77. Bracken MB. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med* 1990; 322(20): 1405-11.
78. Bracken MB. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 1997; 277(20): 1597-604.
79. Imanaka T, Hukuda S, Maeda T. The role of GM1-ganglioside in the injured spinal cord of rats: an immunohistochemical study using GM1-antisera. *J Neurotrauma* 1996; 13(3): 163-70.
80. Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanması sonrası nöral koruma stratejisi. *Omurilik ve Omurga Cerrahisi* 2002; 813-32.
81. Ildan F. Effects of naloxone on sodium- and potassium-activated and magnesium-dependent adenosine-5'-triphosphatase activity and lipid peroxidation and early ultrastructural findings after experimental spinal cord injury. *Neurosurgery* 1995; 36(4): 797-805.
82. Faden AI, Portogese TS. Alpha selective opiate antagonists norbinaltorphimine improves outcome after spinal cord ischemia. *H Neurosurg* 1986; 64: 951-61.
83. Rhoney DH. New pharmacologic approaches to acute spinal cord injury. *Pharmacotherapy* 1996; 16(3): 382-92.
84. Kaptanoglu E. Comparison of the effects of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 2000; 93(1 Suppl): 77-84.
85. Genovese T. Effects of combination of melatonin and dexamethasone on secondary injury in an experimental mice model of spinal cord trauma. *J Pineal Res* 2007; 43(2): 140-53.
86. Ates O. Comparative neuroprotective effect of sodium channel blockers after experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2007; 14(7): 658-65.
87. Tymianski M, Sattler R. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol* 2001; 24: 1-3.
88. Faden AI. N-methyl-D-aspartate antagonist MK801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats: behavioral, anatomic, and neurochemical studies. *J Neurotrauma* 1988; 5(1): 33-45.
89. Li S, Tator CH. Effects of MK801 on evoked potentials, spinal cord blood flow and cord edema in acute spinal cord injury in rats. *Spinal Cord* 1999; 37(12): 820-32.
90. Kırış T, İzgi N. The effect of the NMDA antagonist Dizocilpine on lipid peroxidation in an experimental spinal cord trauma model in rat. *Medical Bulletin* 1999; 32: 80-4.
91. Wada S. Apoptosis following spinal cord injury in rats and preventative effect of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *J Neurosurg* 1999; 91(1 Suppl): 98-104.
92. K.U.U.T. Deneysel omurilik yaralanmasında Agmatin'in doza bağımlı nöroprotektif etkilerinin İncelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniği 2004.

93. Gaviria M. Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, Gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res* 2000; 874(2): 200-9.
94. Wrathallm TR, Choiniere D. Amelioriton of fuctional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Exp Neurol* 1996; 137: 119-26.
95. Hassanzadeh J. Deneysel omurilik yaralanmasında eksitatör aminoasit reseptör antagonisti Dextrometorphan'ın lipid peroksidasyonuna etkileri. *Uzmanlık Tezi, İstanbul* 1992.
96. Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR. Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxin on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci* 1999; 19(14): 6122-33.
97. Teng YD, Wrathall JR. Local blockade of sodium channels by tetrodotoxin ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. *J Neurosci* 1997; 17(11): 4359-66.
98. Schwartz G, Fehlings MG. Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg* 2001; 94(2 Suppl): 245-56.
99. Kaptanoglu E. Magnesium sulfate treatment in experimental spinal cord injury: emphasis on vascular changes and early clinical results. *Neurosurg Rev* 2003; 26(4): 283-7.
100. Boztug N, Bıyık A. Ratlarda İnkomples Serebral İskemi ve Reperfüzyon sonrası N-Metil-D-Aspartat antagonisti olan Magnesyum ve Ketamin'in apopitoz düzenleyen proteinlere olan etkilerinin karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi, Antalya* 2009.
101. Diaz-Ruiz A, Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 2005; 30(2): 245-51.
102. Kaymaz M. Effectiveness of FK506 on lipid peroxidation in the spinal cord following experimental traumatic injury. *Spinal Cord* 2005; 43(1): 22-6.
103. Katzung BG. *Basis and clinical pharmacology*. Stamford: Appleton 1998; 304-17.
104. Saruhashi Y, Matsusue Y, Hukuda S. Effects of serotonin 1A agonist on acute spinal cord injury. *Spinal Cord* 2002; 40(10): 519-23.
105. Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research - a refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord* 2000; 38(8): 449-72.
106. Başaran M. Hipertermik iskemik ön hazırlık yönteminin omurilik iskemik hasarına etkisi. *İstanbul* 2004.
107. Taoka Y. The long-term effects of pre-treatment with activated protein C in a rat model of compression-induced spinal cord injury. *Spinal Cord* 2000; 38(12): 754-61.
108. Silistreli E. Early protective effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, during spinal cord ischemia in a rabbit model. *Heart Vessels* 2005; 20(2): 66-71.

109. Harada N, Taoka Y, Okajima K. Role of prostacyclin in the development of compression trauma-induced spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* 2006; 23(12): 1739-49.
110. Güzel A, Ökten AI, Çaylı S. Pathology and Physiopathology of Spinal Cord Injury. *CÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2006; 28(2): 73-8.
111. Zhuang H, Littleton-Kearney MT, Dore S. Characterization of heme oxygenase in adult rodent platelets. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2(2): 163-8.
112. Alcaraz MJ, Fernandez P, Guillen MI. Anti-inflammatory actions of the heme oxygenase-1 pathway. *Curr Pharm Des* 2003; 9(30): 2541-51.
113. Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(1): 99-103.
114. Maines MD, Trakshel GM. Differential regulation of heme oxygenase isozymes by Sn- and Zn-protoporphyrins: possible relevance to suppression of hyperbilirubinemia. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1131(2): 166-74.
115. Converso DP. HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB J* 2006; 20(8): 1236-8.
116. Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* 1994; 33(18): 5636-40.
117. Rezzani R. Protective effects of heme-oxygenase expression in cyclosporine A-induced injury. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2(2): 157-61.
118. Morita T. Heme oxygenase-1 in vascular smooth muscle cells counteracts cardiovascular damage induced by angiotensin II. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2(2): 113-20.
119. Sacerdoti D. Heme oxygenase overexpression attenuates glucose-mediated oxidative stress in quiescent cell phase: linking heme to hyperglycemia complications. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2(2): 103-11.
120. Woodman DD. Erythropoietin, *Comparative Haematology International* 1992; 2: 1-7.
121. Dordal MS, Goldwasser E. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 1985; 116: 2293.
122. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252(15): 5558-64.
123. Wang FF, Kung CK, Goldwasser E. Some chemical properties of human erythropoietin. *Endocrinology* 1985; 116(6): 2286-92.
124. Fisher JW. *Textbook of Nephrology*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland USA 1995; 191-7.
125. Gorio A. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(14): 9450-5.
126. Fried W, Barone-Varelas J, Morley C. Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 1984; 10(2-3): 287-304.

127. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood* 1991; 77(3): 419-34.
128. Naughton BA. Erythropoietin production and Kupffer cell alterations following nephrectomy, hypoxia, or combined nephrectomy and hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1979; 160(2): 170-4.
129. Jacobson LO. Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 1957; 179(4560): 633-4.
130. Caro J. Erythropoietin production in response to anemia or hypoxia in the newborn rat. *Blood* 1982; 60(4): 984-8.
131. Giger U. Erythropoietin and its clinical use. *Continuing Education Article* 1992; 14(1): 25-34.
132. Beru N. Expression of the erythropoietin gene. *Mol Cell Biol* 1986; 6(7): 2571-5.
133. Schuster SJ. Physiologic regulation and tissue localization of renal erythropoietin messenger RNA. *Blood* 1987; 70(1): 316-8.
134. Koury ST, Bondurant MC. The biogenesis of erythropoietin in vivo. Johns Hopkins University, Baltimore 1990.
135. Annable L, Mussett MV. The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull Org. Mond. Sante* 1972. 47: 99-112.
136. Fried W, Morley C. Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* 1984; 10: 287.
137. Zanjani ED. Liver as the primary site of erythropoietin formation in the fetus. *J Lab Clin Med* 1977; 89(3): 640-4.
138. Cotes PM. Erythropoietin hormones in blood. 3rd Ed., Vol.4, Academic Press Inc, London 1983; 195-211.
139. Erslev AJ. Hematopoiesis and the Kidney. *The Kidney: Physiology and Patophysiology*, Second Ed., Raven Press., New York 1992, 1553-93 .
140. Browne JK. Erythropoietin: gene cloning, protein structure, and biological properties. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 693-702.
141. Rich IN, Heit W, Kubanek B. Extrarenal erythropoietin production by macrophages. *Blood* 1982; 60(4): p. 1007-18.
142. Goldvasser E. The effect of interleukin-3 on hemapoietic precursor cells. In: *Normal and neoplastic hematopoiesis*, Alan R. Liss, New York 1983; 301-9.
143. Youssoufian H. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 1993; 81(9): 2223-36.
144. Sawyer ST, Krantz SB, Sawada K. Receptors for erythropoietin in mouse and human erythroid cells and placenta. *Blood* 1989; 74(1): 103-9.
145. Sawada K. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol* 1990; 142(2): 219-30.
146. Sawyer ST. Receptors for erythropoietin. Distribution, structure and role in receptor-mediated endocytosis in erythroid cells, In Harris JR (ed): *Blood Cell Biochemistry*, New York 1990; 365.
147. Erslev AJ. Erythropoietin, *N Eng J Med*; 1991; 324(19): 1339-44.

148. Juul SE. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2(2): 148-58.
149. Anagnostou A. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(9): 3974-8.
150. Chin K. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 81(1-2): 29-42.
151. Morhishita E, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76(1): 105-16.
152. Sadamoto Y, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki K, Masuda S. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 253: 26-32.
153. Spivak JL, Hogans BB. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* 1989; 73(1): 90-9.
154. Naets JP, Wittek M. A role of the kidney in the catabolism of erythropoietin in the rat. *J Lab Clin Med* 1974; 84(1): 99-106.
155. Piroso E. Erythropoietin life span in rats with hypoplastic and hyperplastic bone marrows. *Am J Hematol* 1991; 36(2): 105-10.
156. Dilek İ, Üstün C. Rekombinant Human Eritropoietin ve klinik uygulamaları. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 1997; 7(2): 1-7.
157. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med* 2003; 228(1): 1-14.
158. Macdougall IC. Optimizing the use of erythropoietic agents pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 5: 66-70.
159. Bracken MB. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone: results of a multicenter, randomized clinical trial. *J Neurotrauma* 1991; 8 Suppl 1: p. S47-50; discussion S51-2.
160. Tator CH, Rengachary SS. *Neurosurgery*. McGraw Hill, 2nd edition, 1996; 2847-59.
161. Ates O. Effects of resveratrol and methylprednisolone on biochemical, neurobehavioral and histopathological recovery after experimental spinal cord injury. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27(10): 1317-25.
162. Hollier LH. Protecting the brain and spinal cord. *J Vasc Surg* 1987; 5(3): 524-8.
163. Kirshner DL. Spinal cord ischemia: an evaluation of pharmacologic agents in minimizing paraplegia after aortic occlusion. *J Vasc Surg* 1989; 9(2): 305-8.
164. Majewska MD, Strosznajder J, Lazarewicz J. Effect of ischemic anoxia and barbiturate anesthesia on free radical oxidation of mitochondrial phospholipids. *Brain Res* 1978; 158(2): 423-34.
165. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001; 79(3-4): 228-35.

166. Sakanaka M. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(8): 4635-40.
167. Higuchi Y. Increase in nitric oxide in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain and suppression by 7-nitroindazole and aminoguanidine. *Eur J Pharmacol* 1998; 342(1): 47-9.
168. Juul SE. Erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human central nervous system. *Pediatr Res* 1998; 43(1): 40-9.
169. Aydin A. Erythropoietin exerts neuroprotective effect in neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain injury. *Brain Dev* 2003; 25(7): 494-8.
170. Sakanaka M, Matsuda S, Morishita E, Nagao M. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage, *Proc Natl Acad Sci* 1998: 4635-40.
171. Punk AK. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(16): 10659-64.
172. Siren AL. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 4044-9.
173. Solaroglu I. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst* 2003; 19(1): 19-22.
174. Calapai G. Erythropoietin protects against brain ischemic injury by inhibition of nitric oxide formation. *Eur J Pharmacol* 2000; 401(3): 349-56.
175. Marti HH, et al. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 1997; 51(2): 416-8.
176. Kumral A, et al., Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of erythropoietin? *Biol Neonate* 2004; 85(1): p. -4.
177. Kumral A. Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation. *Biol Neonate* 2003; 84(4): 325-9.
178. Moon C. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(20): 11612-7.
179. Vaziri Nosratola D, Ching-Yi L, Lin Vernon W. NADPH oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury. *Brain Research* 2004; 995: 76- 83.
180. Kahraman S. Effects of methylprednisolone and hyperbaric oxygen on oxidative status after experimental spinal cord injury: a comparative study in rats. *Neurochem Res* 2007; 32(9): 1547-51.
181. Victor VM, Rocha M. Targeting antioxidants to mitochondria: a potential new therapeutic strategy for cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 2007; 13(8): 845-63.