

**T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRURJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASI SONRASI
NALOKSAN VE İNOS AKTİVASYONU ARASINDAKİ İLİŞKİ**

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. FARUK İLDAN**

Dr. TAHSİN ERMAN

**90335
ADANA-2000**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Bu çalışma Ç.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

TF.98.U.33

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince eğitimim ve öğrenimim için yaptıkları katkılardan dolayı kliniğimizin tüm değerli hocalarına, tezimin hazırlanışında bana yol gösteren ve katkıda bulunan, başta tez danışmanım Doç.Dr. Faruk İLDAN olmak üzere, Yrd.Doç.Dr. Metin TUNA'ya, gösterdikleri dostluk ve destek için tüm çalışma arkadaşlarıma, tezim konusundaki katkılarından dolayı Prof.Dr Mehmet KAYA'a, Prof.Dr. Sait POLAT'a, Prof.Dr. Kıymet AKSOY'a, Dr. Şule DÖNMEZ'e, Dr. Lilüfer TAMER'e, veteriner Dr. Kenan DAĞLIOĞLU'na, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan aileme, sevgili eşime, gerek ihtisas sürem, gerekse tez hazırlama döneminde bana maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, burada isimlerini saymadığım tüm dostlarıma candan teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TABLO LİSTESİ	IV
ŞEKİL LİSTESİ	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
4. BULGULAR	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	45
8. ÖZGEÇMİŞ	50

TABLO LİSTESİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 1: EM için alınan örneklerin dehidrate edilme süreleri ve ortam sıcaklıkları	19
Tablo 2: Medulla spinalis iNOS boyanma değerleri	21
Tablo 3: SOD Ortalama Değerleri	38
Tablo 4: $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz Ortalama Değerleri	38
Tablo 5: SOD Aktivitesinin Değerlendirilmesi	39
Tablo 6: $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATP az Aktivitesinin Değerlendirilmesi	39

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1: Omurilik yaralanması sonrası birincil hasarın ikincil hasarı yaratması	3
Şekil 2: Travmatik spinal kord yaralanmasında ikincil mekanizmalardan kalsiyum ve serbest radikallerin etkisinin gösterilmesi	8
Şekil 3: Normal Kontrol Grubu İmmünohistokimyasal Boyanma	22
Şekil 4: 1.Grup Erken Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	22
Şekil 5: 2.Grup Erken Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	23
Şekil 6: 3.Grup Erken Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	23
Şekil 7: 4.Grup Erken Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	24
Şekil 8: 3.Grup Geç Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	24
Şekil 9: 4.Grup Geç Dönem İmmünohistokimyasal Boyanma	25
Şekil 10: Kontrol Grubunun Elektron Mikroskop Görünümü	28
Şekil 11: 2. Grup Erken Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	29
Şekil 12: 3. Grup Erken Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	30
Şekil 13: 3. Grup Erken Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	31
Şekil 14: 4. Grup Erken Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	32
Şekil 15: 4. Grup Erken Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	33
Şekil 16: 2. Grup Geç Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	34
Şekil 17: 3. Grup Geç Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	35
Şekil 18: 3. Grup Geç Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	36
Şekil 19 : 4. Grup Geç Evre Olgularının Elektron Mikroskop Görünümü	37

ÖZET

Spinal kord yaralanmasında patolojik lezyonun gelişmesi için 1-2 saatlik bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Spinal lezyonun ortaya çıkması için geçen bu süre sekonder mekanizmaların gelişebilmesi için gereklidir. Kord travmasının erken döneminde meydana gelen progresif lezyon sürecinde yer alan olaylar henüz tamamen bilinmemektedir. Progresif lezyonun nedenleri arasında yer alan faktörlerden birisi patolojik durumlarda ortaya çıkan aşırı indüklenabilir nitrik oksit sentataz aktivasyonu olabilir. Aşırı indüklenebilir nitrik oksit sentataz aktivasyonu ile ortaya çıkan nitrik oksit, spinal kord travma olgularındaki kötü morbiditeye katkıda bulunabilir. Deneysel spinal kord yaralanması tedavisinde, opiat reseptör antagonisti olan naloksan çok defa kullanılmış ve nörolojik fonksiyonu iyileştirdiği rapor edilmiştir. Naloksanın bu faydalı etkisi üzerinde birçok spekülasyonlar yapılmıştır.

Çalışmamızda, ratlarda spinal travma modelinde aşırı indüklenebilir nitrik oksit sentataz aktivasyonu ile naloksanın etkisi araştırıldı. Spinal kord travmasından sonra intraperitoneal naloksan uygulanmasının indüklenebilir nitrik oksit sentataz'ın aktivasyonunu, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltarak ve serbest radikallerin açığa çıkmasını engelleyerek faydalı etkisinin bulunduğu sonucu elde edildi ve literatürle birlikte tartışıldı.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: INOS, Naloksan, NO, Spinal Kord Zedelenmesi

ABSTRACT

THE RELATION BETWEEN NALOXAN AND INOS ACTIVATION AFTER EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

The pathological lesion in the experimental spinal cord injury requires 1 to 2 hours to develop. This lag time for the appearance of the lesion is necessary to allow a delayed injury process or a secondary effect to occur. This causes of progressive damage mechanisms is unknown completely. Inducible nitric oxide synthase expression in the development of pathological conditions may be cause progressive damage. The excessive production of nitric oxide by nitric oxide synthase induction may thus contribute to the poor morbidity of spinal cord injury patients. Several investigators have reported that the opiate antagonist naloxone may be beneficial in the treatment of experimental spinal cord injury. However, other investigators have failed to observe any beneficial effects of naloxone.

In this study, we therefore tried to examine the invivo expression of inducible nitric oxide synthase and effect of naloxone in the experimental spinal cord injury. The possible effect mechanisms of naloxone, which attenuates the activation of inducible nitric oxide, inactivation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPase and activation of free radicals, is discussed.

KEY WORDS: INOS, Naloxan, NO, Spinal Cord Injury

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Spinal kord travmaları çeşitli ülkelerde % 2-4 sıklıkla görülmekte, teknolojinin ilerlemesi ve motorlu araçların çoğalmasıyla gittikçe artan sıklıkta karşımıza çıkmaktadır¹. Spinal kordun rejenerasyon kabiliyeti olmadığından omurilik zedelenmesi geçiren hastalarda kalıcı sakatlıklar oluşur. Total omurilik lezyonu çok büyük iş gücü kaybı ve bakım masraflarına neden olmaktadır.

Spinal kord yaralanmasında patolojik lezyonun gelişmesi için 1-2 saatlik bir sürenin geçmesi gerekmektedir. Birincil zedelenme travma anında olan zedelenmedir. İkincil zedelenme ise, oluşan birincil zedelenmenin başlattığı ve bunun sonucu saatler içinde, metabolik ve biokimyasal nedenlerle oluşan hasardır². Kord travmasının erken döneminde meydana gelen progresif lezyon sürecinde yer alan olaylar henüz tamamen bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan tüm araştırmalara rağmen total omurilik lezyonunda metil prednizolonun (MPD) olası etkisi dışında işlevi yerine getirecek bir tedavi yöntemi yoktur².

Progresif lezyonun nedenleri arasında yer alan faktörlerden birisi patolojik durumlarda ortaya çıkan aşırı indüklenabilir nitrik oksit sentetaz (iNOS) aktivasyonu olabilir^{3,4,5}. Deneysel spinal kord yaralanması tedavisinde opiat reseptör antagonisti olan naloksan çok defa kullanılmış ve nörolojik fonksiyonu iyileştirdiği rapor edilmiştir^{6,7,8,9,10}. Naloksanın bu faydalı etkisi üzerinde birçok spekülasyonlar yapılmıştır.

Bu çalışmamızda deneysel spinal omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi gözden geçirilmiş, yaralanmadan sonra gelişme gösteren lezyon sürecinde iNOS aktivasyonunun rolü, naloksan ile ilişkisinin belirlenmesi ve elde edilen bu bilgilerin ışığı altında daha iyi bir farmakolojik tedavinin geliştirilmesi için faydalı olabilecek bulgulara ulaşılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Travmasının Tarihçesi

Spinal kord travmasının tarihçesi çok eskilere dayanmaktadır. Spinal travma ile ilgili ilk yazılara M.Ö 3000-2500 yılları arasında Mısırlı cerrahlarca yazılan Edwin Smith Papirüs’de rastlanmaktadır². Hipokrat da yaklaşık M.Ö 400 yıllarında paraplejiyi tarif etmiş ve sonraki yıllarda Aulus Cornelius Celsus tarafından bildirilen bir traksiyon cihazı geliştirilmiştir². Fransız cerrah Pare 16.yüzyılda redüksiyon yapılması gerektiğini ancak bunun fonksiyonu geri getirmeyeceğini söylemiştir. 7.yüzyılda ilk kez Paulus dekompresif laminektomi yapmıştır².

Omurilik travması ile ilgili ilk fizyopatolojik çalışma 1890’da Schamus tarafından tavşan omuriliğinde travma sonucu gelişen patolojik değişiklikleri inceleyerek yapılmıştır². 1911’de Allen; köpeklerin omuriliğine ağırlık düşürülerek yapılan çalışmalarda intakt görülmesine karşın birkaç saat içinde gri cevherde başlayıp beyaz cevhere yayılan hemorajik nekrozu gözlemiş ve santral hemorajik nekroz olarak isimlendirmiştir¹¹. 1970’lerde ağırlık düşürme metodu ile yapılan deneysel çalışmalar tekrar başlamış ve bu çalışmalarda hipoterminin doku harabiyetini azalttığı ve glukokortikoidlerin nöroprotektif etkileri olduğu gözlenmiştir². Sonraki yıllarda travmada omurilik kan akımının azaldığı ve doku harabiyetini azaltan tedavilerin omurilik kan akımını arttırdığı tespit edilmiştir². Ancak bazı yazarlara göre omurilik travmalarındaki kan akımı azalması bir sebep değil sonuçtur. Bu yazarlar travma sonucu oluşan toksik maddelerin (serbest radikaller, Ca^{+2} , ...) doku harabiyetine neden olduğunu düşünmektedirler.

2.2. Spinal Kord Travmasının Fizyopatolojisi

Omurilik travmasında doku harabiyeti iki mekanizma ile meydana gelmektedir.

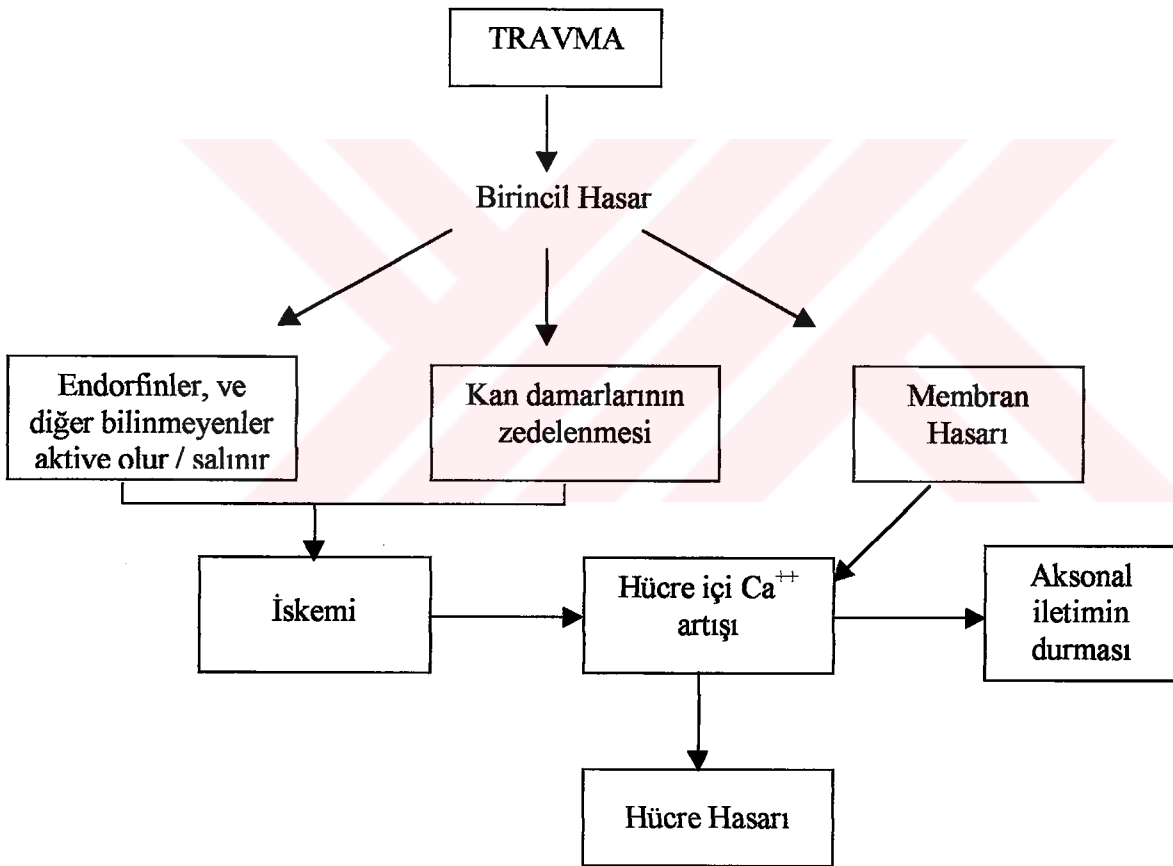
1. Birincil Mekanik Omurilik Zedelenmesi
2. İkincil Omurilik Zedelenmesi

2.2.1. Birincil Mekanik Omurilik Zedelenmesi

Birincil zedelenme travma anında olan zedelenmedir. Travma anında omurilikte oluşan akut kompresyon, laserasyon, kemik, disk ve yabancı cismin omuriliğe çarpması sonucu oluşur. Gerilme ve yırtılmalar da diğer birincil zedelenme mekanizmalarıdır.

2.2.2. İkincil Zedelenme

Omurilikte oluşan birincil zedelenmenin başlattığı ve bunun sonucu saatler içinde, metabolik ve biokimyasal nedenlerle oluşan hasardır. Vasküler konjesyon, hipoperfüzyon, membran hasarı, ödem, nekroz ve progresif nöral disfonksiyon şeklinde bu tanımlanabilir. İkincil zedelenme teorisi ilk kez 1911’de Allen tarafından ileri sürülmüştür. Allen dokuda biriken bir biokimyasal faktörün olaylar zincirini başlattığı ve bunun sonucu omurilikte nekroz geliştiğini öne sürmüştür¹¹. Bu süreç Nemecek tarafından otodestruksiyon olarak isimlendirilmiştir¹². Omurilik travması sonrası birincil hasarın ikincil hasarı ortaya çıkarması aşağıdaki şekilde özetlenebilir.



Şekil 1: Omurilik yaralanması sonrası birincil hasarın ikincil hasarı yaratması, (İplikcioğlu C, Omurilik ve Omurga Cerrahisi, 1997, s: 461).

İkincil zedelenme mekanizmalarından bugün üzerinde en fazla durulan vasküler değişiklikler, hücre içi Ca^{+2} artması, serbest radikal teorisi, endojen opioid ve enflamatuar değişiklik teorileridir. Bu teoriler kısmen iç içedir. Dokuda serbest radikallerin açığa çıkması ve Ca^{+2} artması aynı zamanda vazospazm ile omurilik kan akımını bozmaktadır².

İkincil Zedelenme Mekanizmaları

a) Vasküler Mekanizma Teorisi: Akut omurilik travması sistemik ve lokal vasküler değişikliklere neden olur. Birçok deneysel travmada mikrosirkülasyonda mekanik bir hasar meydana geldiği, perfüzyonun bozulduğu ve bunun da progresif omurilik iskemisine yol açarak ikincil hasara neden olduğu saptanmıştır^{13,14,15,16}.

Bir başka görüşe göre ise omurilik yaralanmasındaki iskeminin, kalsiyum iyonlarının lezyon yerine ulaşmasını engelleyerek koruyucu bir etkisi de olabilir¹⁷.

Omuriliğin çok farklı arteriyel kan basınçlarında omurilik kan akımını (OKA) sabit tutma özelliğine otoregülasyon denir. Şiddetli travma ile bu tamamen bozulur. Sistemik hipotansiyonda OKA'da belirgin azalma yapar ve bu otoregülasyon ile düzelmez. Ortalama sistemik arter basıncının 160 mmHg'den yükseğe çıkması travma bölgesindeki OKA'nı arttırmaz, sadece komşu bölgelerde hiperemi yaratır.

Akut omurilik yaralanması nörojenik şoka yol açar. Önce tansiyon arteriel'de (TA) kısa bir yükselme olur, bunu sürekli bir TA ve kardiyak debi düşmesi izler. Nedeni hem sempatik tonüste düşme, hemde miyokardiyal etkilenmedir¹⁸.

OKA'nın yaklaşık %50 civarında azalması sonucu tehlikeli iskemik düzey ortaya çıkar. Bu düşme gri cevherde daha fazla olur. En ağır iske mi hemorajik bölgeye yakın gri ve beyaz cevherde gözlenir. Sonuçta doku oksijenasyonu azalır ve omurilikte metabolik artıklar birikir. Hipoperfüzyonun ikincil sonucu olarak ödem oluşur. Ortaya çıkan bu iske mi sadece birincil travmanın mekanik etkisi ile açıklanamaz. Çünkü anterior spinal arter ve posterior sulkal arterlerde akım devam etmektedir. Osterhol ve Matheus 1970 yıllarında zedelenme bölgesinde toplanan noradrenalinin buna neden olduğunu düşünmüşlerdir¹⁹. Tator'un çalışmalarında çeşitli teknikler ile yapılan kan akımı ölçümlerinde sıçan ve maymunda ilk 3 saatte kan akımının en fazla azaldığı ve 24 saat boyunca bu perfüzyon azlığının devam ettiği gözlenmiştir²⁰.

Yapılan bütün bu çalışmalara rağmen iskeminin gerçek nedeni iyi bilinmemektedir. Vazospazmın nedeni mekanik harabiyet, vazoa ktifaminler, diğer vazokonstriktörler ve gri cevherdeki hemoraji olabilir. Yine Trombaksan A₂ gibi ajanlara bağlı trombosit agregasyonu ve tromboz da sorumlu tutulmuştur. Eksitotoksik aminoasitlerde (EAA) iske mi yapabilir.

Glutamat bir nörotransmitterdir ve EAA'dir. Nöronların iskemiye dayanıksızlığının sebebi bilinmemekle beraber glutamat sorumlu tutulmaktadır. Glutamat reseptör aktivasyonu bu iskemik hasarda anahtar rol oynayabilir. İskemik beyin hasarı modellerinde glutamatın eksitotoksik etkisi saptanmıştır. Glutamat reseptörlerinin uyarılması, önce Na⁺'nın hücre içine toplanarak sitotoksik ödem oluşmasına neden olur. Daha sonra hücre içi Ca⁺² toplanması ile nöronal harabiyet olur. Hücre içi Ca⁺², kalsiyum bağımlı proteazları aktive ederek daha fazla hasara yol açar. Serebral iskemide glutamatın hücre dışı konsantrasyonunda yoğun bir artış olur²¹. Postsinaptik reseptörlerden biri olan N-metil-D-aspartat (NMDA) glutamatın nörotoksik etkilerini iletir. MK-801 gibi NMDA reseptör antagonistlerinin sistemik uygulanması beyin hasarını azaltmaktadır²².

Serebral iskemideki bu etkilerin benzerleri akut omurilik yaralanmasında da olabilir. Yapılan deneysel çalışmalarda post travmatik iskeminin, aksonal iletimde işlev bozukluğuna neden olduğu anlaşılmıştır²⁰.

b) Serbest Radikal Teorisi: İlk nöral hücre öldüğünde yaşayan diğer nöronlara saldıran toksinler salar. Bu toksinlerin bazıları serbest radikaller (SR) adı verilen kaçak oksijen molekülleridir²³. Bu SR'ler dış yörüngelerinde bir fazla elektron bulunan reaktif moleküllerdir. Normal hücresel yollarda oksijeni indirgemek için üretilmişlerdir. Mitokondride elektron transportu süperoksit ile yapılır. Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksiti hidrojen peroksit'e (H₂O₂) çevirir. Fe ve diğer katalistler ise H₂O₂'yi hidroksil radikaline (HO) çevirirler. Dış yörüngelerindeki bir fazla elektron bulunması serbest radikallere garip bir reaktivite sağlar ve zincirleme reaksiyon yetenekleri artar. Bu radikaller lipidlerle, proteinlerle ve nükleik asitlerle reaksiyona girerler ve daha çok serbest radikal açığa çıkaran lipid peroksitleri yaparlar²³. Normal hücrelerde doğal olarak oluşan antioksidan bileşikler bu zararlı etkileri kontrol eder, fakat patolojik durumlarda örneğin omurilik yaralanmasında aşırı serbest radikal üretimi bu antioksidan kapasiteyi aşar. SR'ler lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda hücre membranlarının çözülmesine yol açar. Santral sinir sisteminde antioksidan olarak askorbat, glutatyon ve alfatokoferol vardır. Bu antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederler. Travma ise bu maddeleri azaltır²⁴. Demopoulos ikincil zedelenmenin bu serbest radikaller ile oluştuğunu ve m-metil prednisolon sodyum suksinatın (MPSS) metabolik, antienflamatuar veya immünosupressif etkisinden ziyade antioksidan etkisi ile faydalı olduğunu öne sürmüştür²⁵.

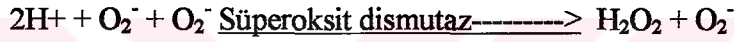
Buna karşın başka bir çalışmada ise düşük ve yüksek doz MPSS'in ilk 48 saatte etkisi araştırılmış ve efektif bulunmamıştır²⁶. Bu serbest radikal teorisinde şüphe uyandırmıştır.

Hücrelerin serbest radikallere karşı oluşturduğu koruma mekanizmaları genellikle dört başlık altında toplanır.

Bunlar sırasıyla:

1. Süperoksit dismutaz reaksiyonları,
2. Katalaz reaksiyonları,
3. Glutasyon peroksidaz,
4. Antioksidanların etkisi.

SOD, katalaz ve glutasyon peroksidaz serbest radikallerin birikmesini ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir. SOD süperoksit radikalini, katalaz ve glutasyon peroksidaz ise hidrojen peroksiti metabolize ederler. Bu enzimlerin aktif oluşu daha zararlı olan hidroksil radikali oluşumunun engellendiğini gösterir^{27,28}. SOD, iki değerli bakır içermekte olup, süperoksit radikalini (O_2^-) bu özelliğinden dolayı H_2O_2 'ye dönüştürebilmektedir.



Serbest radikallerin zararsızlaştırması için peroksitlerin elimine edilmesi gereklidir. Katalaz ve glutasyon peroksidaz enzimleri, detoksifikasyonda işlevi olan belli başlı iki enzimdir²⁹. Hücrede hem sitozol hem de mitokondride bulunan bir enzim olan SOD, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. Bazı çalışmalara göre serbest oksijen radikallerinin prostaglandin (PG) oluşumunu da stimüle ettiği ortaya konmuştur³⁰.

c) Kalsiyum Teorisi: Spinal travmadan sonra 30 dakika içinde nöronal hasar başlar. Ortaya çıkan biokimyasal fenomenler lezyon seviyesinde iletimin durmasına neden olur. Elektrolit konsantrasyonundaki anormallikler ile gradient değişikliklerinin bu iletim durmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Na^+ un hücre içine girmesi ve hücre dışında K^+ konsantrasyonun artmasının aksonal iletimi durdurduğu gösterilmiştir²³.

Kalsiyum hücre için çok destrüktif bir iyondur. Kalsiyum'un hem Na^+ , K^+ akımında önemli rolü olduğu, hem de bazı nörotransmitterlerin depolanması ve salınmasında rolü olduğu saptanmıştır²³. Hücre dışı Ca^{+2} aktivitesi, hücre içi aktivitenin 1000 katı kadardır. Bu ilişkinin omurilik travmasında belirgin şekilde bozulması, Ca^{+2} pompasının bozulmasından olabileceği gibi, hasarlı kalsiyum kanallarından sızma sonucu da olabilir. Hatta kalsiyumun hasarlı hücre içi organellerinden salınması ile de olabilir²³. Hücre içine giren Ca^{+2} fosfolipaz, proteaz ve fosfatazları aktive eder. Fosfolipazlar membranın yapısını bozar, yağ asitlerini ve araşidonik asidi serbestleştirir. Siklooksijenaz ve lipooksijenazlar bu araşidonik asidi

prostaglandin ve lökotrienlere çevirir. Bunlar da Na^+ geçirgenliğinde artmaya neden olur²³. Ca^{+2} ile aktive olan fosfotazlarda nitrik oksit sentetaz (NOS) gibi enzimleri aktive eder ve bunun sonucu açığa çıkan nitrik oksit de (NO) Na^+ geçirgenliğinde artmaya neden olur^{2,23,31}. Fosfatazlar Ca^{+2} ve diğer iyonik kanalları da düzenlerler. Hücreye giren Ca^{+2} yine mitokondrideki elektron transportunu etkileyerek serbest radikalleri açığa çıkarır. Serbest radikaller ile diğer potent vazojenik ve enflamatuar maddeler kan akımını azaltır ve membranın Ca^{+2} gibi diğer iyonlara olan geçirgenliğini de artırır. Sonuç olarak hücre içine Ca^{+2} girişi ve SR oluşumu birlikte hareket eder ve birbirlerinin etkilerini arttırırlar^{22,23,31,32}.

NMDA reseptör antagonistleri bu Ca^{+2} girişimini bir miktar engeller. Glutamat reseptör blokajı sıçanlarda nörolojik iyileşmeyi artırır. Ancak aksonlarda glutamat reseptörleri mevcut değildir. Omurilikte nöron ve glia hücrelerinde vardır. Serotonin reseptör antagonisti miyaserin omurilik travmasında nöroprotektif özelliğe sahiptir³³. Bazı tedavi yöntemleri ise hücre içine Ca^{+2} girişinin etkilerini azaltabilir. Glukokortikoidler, lipokortin isimli Ca^{+2} ile aktive olan fosfolipaz etkisini azaltan bir proteinin yapımını ve salınımını artırır. İndometasin, siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitörleri ise eikosanoidlerin yapımını durdurur.

d) Opiat Reseptör Teorisi: Omurilik yaralanmasına müdahale için bir diğer önemli buluş ise travma sonrası plazma beta-endorfin düzeylerindeki artıştır. Faden ve arkadaşları insan omurilik yaralanmasında en çok etkilenen opioidin dinorfin olduğunu ve dinorfin düzeyinin travmanın şiddeti ile direkt ilişkili olduğunu bildirmiştir³⁴. Aynı çalışmada μ -alttipi opiat reseptörü blokeri olan naloksanı yüksek dozda kullanarak, spinal zedelenme modelinde posttravmatik hipotansiyonu, OKA'nı ve klinik iyileşmeyi düzelttiğini ilk olarak bildirmiştir^{6,8,34}. Bu, opiat reseptörleri üzerine olan etkisine bağlanmıştır.

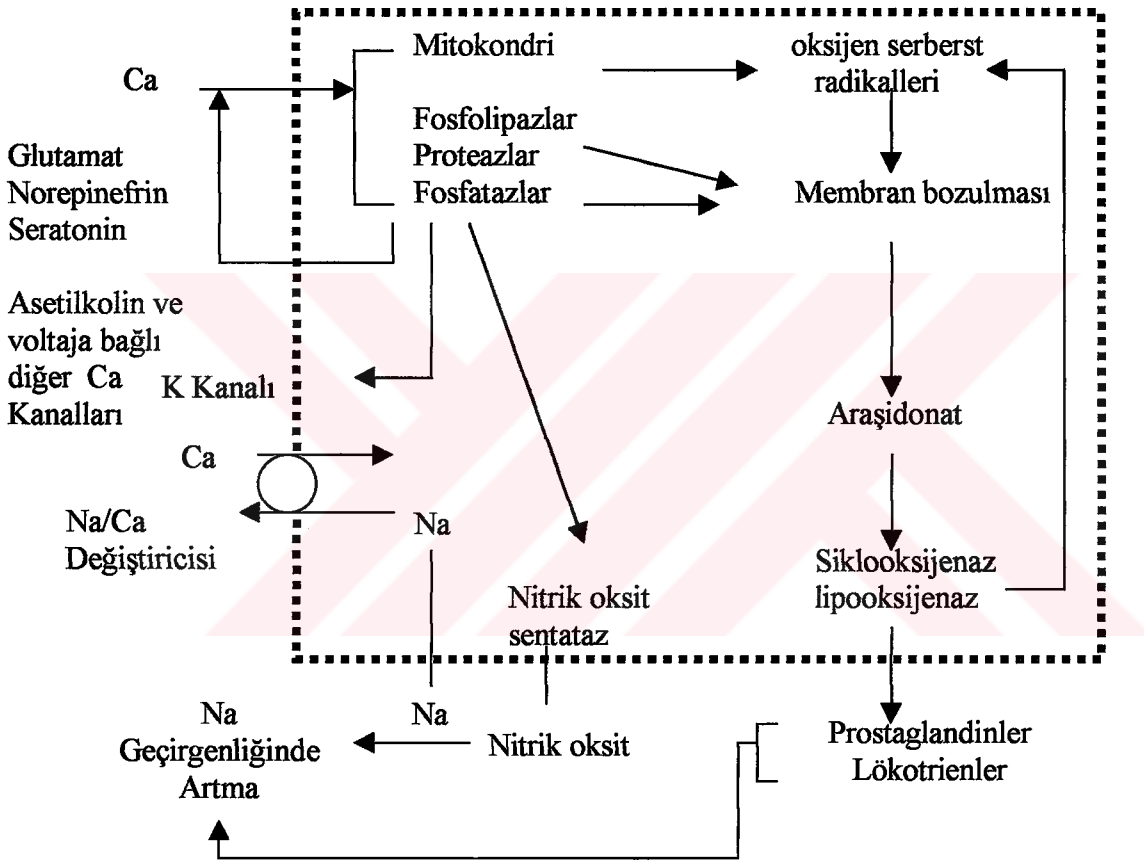
Naloksanın spinal kord travmasındaki faydalı etkisinin mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda naloksanın etkisi opioid benzeri maddelerin etkisini antagonize etmesine, lizozomal membranı stabilize etmesine, cAMP'yi etkilemesine, proteolizizi inhibe etmesine, Ca^{+2} akımını değiştirmesine, antioksidan aktivitesine, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesine, Na^+ ve $\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltmasına, posttravmatik OKA'nı düzeltmesine bağlanmıştır^{7,8,9,10,17,34,35}.

Spinal travmanın neden olduğu hücresel değişikliği ortaya koymak için lipid bağımlı enzimlerin aktivitesi ve lipid peroksidasyonun miktarı faydalı parametrelerdir. Malon di aldehit (MDA); spinal myelin, glial, nöral membranların ve diğer sellüler elemanların lipid peroksidasyonlarının ikincil bir ürünüdür ve bu değerlendirme için faydalı parametrelerden

biridir^{36,37}.

Opiat reseptörlerinin indirekt veya nonopioid etkileri de olabilir. Örnek olarak opiat reseptörleri testosteron yapımını artırır. Testosteron ise reaktif gliozis ve astrosit proliferasyonunu azaltarak periferik sinir rejenerasyonunu artırır²³.

Sonuç olarak opiat reseptör blokajının ikincil zedelenme üzerindeki etkisi komplike ve tartışmalıdır.



Şekil 2: Travmatik spinal kord yaralanmasında ikincil mekanizmalardan kalsiyum ve serbest radikallerin etkisinin gösterilmesi, (İplikcioğlu C., Omurilik ve Omurga Cerrahisi, 1997, s: 461)

e) Enflamatuvar Teori: Enflamatuvar ajanların santral sinir sisteminde destrüktif etkisi vardır. Prostaglandin ve lökotrienler enflamatuvar hücrelerin toplanmasına ve doku harabiyetinin başlamasına sebep olur. Omurilikte travmadan sonra bradikinin, prostaglandin, lökotrien, platelet activating faktör, serotonin toplanır^{2,23}. Sitokinlerin fonksiyonu ise hücre içi

haberleşmeyi sağlayarak, injüriye karşı verilen immünolojik, enflamatuvar ve onarım yanıtlarını düzenlemektir³⁸. Bir çok hormon benzeri polipeptitler, immünolojik ve enflamatuvar yanıtlarda sekrete edilir. Sitokinler lenfositlerde üretilir ve lenfokinler olarak adlandırılırlar. Monositlerde veya makrofajlarda üretilen peptidlere ise monokinler adı verilir. Sitokinler özel bezlerden ziyade çok sayıda hücrelerde üretildiklerinden endokrin hormonlardan farklıdırlar. Sitokinler yabancı antijenlere, lökosit ve diğer hücrelerin farklılaşması sonucu ortaya çıkan zararlı ajanlara karşı konağın cevabını düzenlerler. Sitokinler genellikle glikoprotein yapısında düşük molekül ağırlığına sahip küçük proteinlerdir. Değişik hücrelerce salgılanabilen, immün cevapda rol oynayan ve hücrelerin aktivasyonunda rol alan maddelerdir. Sitokinler hücre büyümesi, hücre aktivasyonu, inflamasyon, immunité, doku onarımı, fibrozis ve morfogenezis gibi önemli biyolojik oluşumları düzenlerler³⁸.

İnterlökinler ise özellikle lökositler arasında iletişim sağlayan sitokinlerdir³⁸. Sitokinler antijen nonsipetik glikoproteinler olup, bir stimulusa cevap olarak sentezlenip hızla sekrete edilirler, kendilerini sentezleyen hücrelerde depo edilmezler. Hemen etki gösterirler ve yarı ömürleri çok kısadır. IL-1 ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler, invivo immün sistem aktivasyonunda hipotalamik-pituiter-adrenal aks cevabının önemli mediatörleri olarak bilinmektedirler. Bu aksın çalışmasıyla, sistemik enflamatuvar yanıt monosit fonksiyonlarını azaltarak kendi kendisini sınırlamaktadır³⁹.

Glukokortikoidler potent antienflamatuvarlardır ve enflamatuvar cevaba neden olan birçok protein (sitokin, interlökin-2) ve prostaglandinin sentezini inhibe ederler⁴⁰. Fosfolipaz aktivitesini de inhibe ederler ve lipokortin salınımını artırır. Lipokortin'de bir antienflamatuvardır.

Birincil hasarı ikincil hasardan ayıran çizgi spekülâtif bir çizgidir. Çünkü omurilik yaralanması sonrası progresif nörolojik kötüleşme pek görülmez. Daha fazla doku destrüksiyonuna yol açan bu ikincil yaralanma olaylarının, akut fazda başarılı tedavilerin uygulanmasıyla, nörolojik düzelmeyi sağlayabileceği görülmüş ve bu nedenle destek görmüştür²³.

2.3. Spinal Kord Travmasında Metabolik Değişiklikler

Yaralanan omurilikte hem gri hem de beyaz cevherde glukoz kullanımı geçici olarak artar. Bunun omurilik kan akımının azalmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. İskemi anaerobik glikolizise neden olur. Dokuda hipoksi olması yüksek enerji fosfatlarının hemen

azalmasına ve laktik asidozise yol açar. Kritik bir membran enzimi olan Na^+-K^+ ATPaz enzimi travmadan 5 dakika sonra azalır^{2,23}.

Hücre membran duvarı enzimleri aktivitelerini devam ettirebilmeleri için fosfolipidlere ihtiyaç duyarlar. Fosfolipidlere bağımlı hücre membran duvarı enzimi olan $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın membran stabilizasyonunun korunmasında önemli rolü vardır. Bu enzim serbest radikallere ve lipid peroksidasyonuna hassas bir enzimdir⁷. $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz sodyum ve potasyum tarafından uyarılır, aktivasyon için magnezyuma gerek duyar. Skou ve arkadaşları 1960 yılında kas zarlarında yaptıkları çalışmalarla, hücre dışı ve içi konsantrasyon farkının bir pompa tarafından düzenlendiği şeklindeki görüşlerini deneysel olarak göstermişlerdir⁴¹.

Na^+ ve K^+ iyonlarının fosforilasyon ve defosforilasyon şeklindeki döngüsel bir değişim ile hücre içi ve dışı arasında taşındığı bugün için kabul edilen görüştür⁴². Magnezyum ise enzim substrat kompleksinin bir parçasıdır.

Spinal kord travmasından sonra intraperitoneal naloksan uygulanmasının $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltarak, faydalı etkisinin bulunduğu bildirilmiştir⁷.

2.4. Spinal Kord Travmasında Histopatolojik Değişiklikler

Spinal travmadan sonra ilk saatler içinde reversibl bir kommosyo daha sonra ise hemorajik nekroza ilerleyen bir kontüzyon ortaya çıkar. Sinir liflerinde kopmalar ve ödem görülür. Hasta travmadan hemen sonra paraplejik bile olsa bu evrede omurilik histolojik olarak normal görülebilir²³. Spinal travmadan sonra 15 dakika içinde gri cevherde peteşiyel kanamalar, beyaz cevherde ise ödem olur. İkinci saat içerisinde gri cevher kanamaları artar, 4. saat içerisinde çok sayıda şişmiş akson silindirleri oluşur⁴³. Klinik bulgulara bağlı kalmaksızın 6.güne kadar kötüleşme devam eder ve ciddi bir nekroz oluşur.

Elektron mikroskopi çalışmalarında ise 5.dakikada aksonlar normal iken gri cevherdeki venüller eritrositlerle şişerler. 15-30 dakida da eritrositler kapiller ile venüllerin etrafına ekstravaze olurlar. 4.saatte myelin kılıflar yırtılır, aksonlar dejenere olur ve iskemik endotel zedelenmesi gelişir⁴⁴. Ödem çevreye yayılır ve 24-48 saatte özellikle hemorajilerin olduğu bölgelerde nekroz oluşur. Hücresel olarak polimorf nüveli lökositlerin akut infiltrasyonu olur. Bunların yerini daha sonraki günlerde makrofajlar alır²³.

Subakut değişiklikler ise travmadan günler sonra açığa çıkar. Nekrotik dokuların rezorbsiyonu ile Luckenfelder denilen kistik alanlar oluşur. Wallerian dejenerasyon olur. Kromatolizis ve nekrofaji olur. Eksudatif değişiklikler ortaya çıkar^{13,16}.

Geç değişiklikler ise travmadan haftalar sonra açığa çıkar. Astrositik ve fibrotik bir skar oluşur. Posterior köklerde amputasyon nöromaları olur. Kist formasyonu ve postravmatik siringomiyeli olabilir. Kist 1 ay sonunda iyi sınırlıdır ve beyaz cevherin demyelinizasyonu ile çevrelenmiştir. Daha sonra demiyeline beyaz cevheri astrositik gliosis çevreler.

2.5. Spinal Travmalı Hastalarda Medikal Tedavi Prensipleri

Omurilik travmasında farmakolojik ajanlarla iyileşmeyi artırma oldukça yeni bir görüştür. Patofizyolojiye yönelik olarak kortikosteroidler, naloksan, tiroid salıverici hormon (TRH), dimetil sulfoksit, vitamin E, nimodipin , gangliosidler, lazorid, siklosporin spinal travmada kullanılmıştır. Bu bölümde sık kullanılan tedavilerden bahsedilecektir.

a) Sistemik Hipotansiyonun Tedavisi: Spinal travma sonucu sempatik tonus kaybı ile olan periferik vazodilatasyonu önlemek gereklidir. Hipovolemi sonucu plazma aldosteronu artar ve hipotansiyon olur^{2,23}. Buna eşlik eden bradikardi ile omurilik perfüzyonu bozulur. Bu nedenle sistemik arteriyel basıncı regüle edici önlemlerin hızla alınması, santral venöz basınç ölçerek sıvı replasmanı, alfa stimülatör ajanların (dopamin, dobutamin gibi) kullanılması, bradikardiye karşı gerekirse atropin hatta pacemaker kullanılmasında yarar vardır⁴⁵. Eğer alfa stimülatörler kullanılmaz ve hastaya sıvı yüklenirse kalp yetmezliği ve akciğer ödemi olabilir. Sistemik tansiyonun sistolik basınç >90 mmHg olacak şekilde ayarlanması gerekir. Bu amaçla kan transfüzyonu veya dopamin uygulanması ile hayvanlarda omurilik kan akımının arttığı, ancak nörolojik fonksiyonda düzelme olmadığı bulunmuştur⁴⁴. Ayrıca adrenalin ve nimodipin birlikte verilerek OKA artırılmaya çalışılmıştır⁴⁶.

Sistemik tansiyonu yükseltmekteki amaç akut omurilik yaralanması ile oluşan hipotansiyonu düzeltmek ve buna bağlı gelişebilecek omurilik iskemisini önlemektir. Amaç ortalama arter basıncını normotansif değerlere yükseltmek olmalıdır. Hipertansiyon yaratılır ise intramedüller hemorajiler artabilir. Ancak bu gayretler pek sonuç vermemektedir. Çünkü kardiyak debi azaldığından kan volümünü arttırmak yeterli olmaz, spazma bağlı oluşacak olan omurilik mikrodolaşımdaki bozulmayı önleyecek yöntemler gerekmektedir^{2,23}.

b) Opiat Antagonistleri: Omurilik yaralanması sonrası opiat reseptör aktivasyonu endojen maddelerin salınmasına neden olur. Bu maddeler belirgin periferik vasküler etkilere ve sonuçta omurilik hipoperfüzyonuna yol açar. Faden ve arkadaşları bir nonselektif opiat antagonisti olan naloksanın kedi ve sıçanlarda ağırlık düşürme travması sonrası ortaya çıkan

postravmatik hipotansiyonu önlediğini, omurilik kan akımını ve klinik iyileşmeyi düzelttiğini saptamıştır^{6,8,34}. İldan ve arkadaşları ise naloksanın $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz inaktivasyonunu ve lipid peroksidasyonunu azaltarak faydalı etkilerinin olduğunu yayınlamıştır⁷. Naloksanın posttravmatik kan akımını düzelttiği ve klinik olarak spinal kord travmasında iyileşmeye neden olduğu belirtilmiştir^{8,9,10,17,34}. Ancak bu bulgu naloksanın post travmatik hipotansiyon yapıcı etkisi ile ters düşmektedir^{8,9,17}. Bir başka çalışmada ise naloksanın etkisi antioksidan, membran stabilize edici etkisine ile bölgesel spinal kord kan akımını etkilemesine bağlanmıştır³⁵.

Naloksan ve TRH gibi opiat reseptör blokerlerinin teorik olarak postravmatik endorfin salınmasını nötralize ederek omurilik kan akımını artırmaları gerekmektedir. Bu etki hayvan çalışmalarında görülmüştür³³. Bu deneysel yararların opiat kökenli bir iskemiye bloke ederek mi olduğu, yoksa kardiyak outputun artması ile mi oluştuğu bilinmemektedir. Çok yönlü etkileri olan naloksan ayrıca proteolizisi inhibe eder ve lizozomal enzimleri stabilize eder^{8,26}.

Bu olumlu çalışmalara rağmen naloksanın bir faydası olmadığını bildiren yayınlarda vardır^{37,47}.

c) Troid Saliverici Hormon (TRH): TRH'un omurilik kan akımının artmasında ve nörolojik fonksiyonu düzeltmede naloksan kadar etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır⁴⁸. TRH'un çok kısa yarı ömrü olması nedeniyle daha stabil analogları geliştirilmiştir. TRH'un omurilik yaralanmasındaki spesifik etkisi iyi bilinmemekte ise de spinal refleksleri potansiyelize ettiği ve kolinerjik nöronlar üzerinde trofik etkileri olduğu saptanmıştır. Bu nedenle TRH, yaralanmanın gelişmesini önlemekten çok iyileşme fazında daha etkili olabileceği belirtilmiştir²³.

d) Kalsiyum Kanal Blokerleri: Kalsiyum iyonlarının spinal travma ve iskemi etyopatogenezinde önemli rol oynadığı anlaşılmıştır. Sinir sisteminde toksik hücre ölümünün son aşamasının kalsiyumun hücre içine geçmesi olduğu saptanmıştır⁴⁹. Bunun nedeni travma veya iskemi ile hücre membranının hasara uğraması ve sonuçta kalsiyum kanallarının depolarizasyonudur. Kalsiyumun hücre içine geçmesi ile vasküler düz kaslarda kontraksiyon, vazospazm ve iskemi gelişir. Mitokondrial fonksiyon bozulur, nötral proteazlar aktive olur, bunlarda mikrotübüler ve nörofilaman proteinlerini parçalar. Sonuçta aksonal dejenerasyon olur ve toksik eikosanoidler sentez edilir. Young ve arkadaşları, travmanın 2-5. dakikasında hücre dışı Ca^{+2} konsantrasyonunda belirgin düşme olduğunu saptamıştır⁴⁹.

Kalsiyum kanal blokerlerinin serebral damarlarda dilatasyon ve serabral kan akımında artış yaptığı bilinmektedir. Omurilikteki ve beyindeki vasküler fizyoloji birbirine benzer olduğundan kalsiyum kanal blokerleri post travmatik omurilik iskemisinin önlenmesinde yararlı olabilir. Sıçanlarda optimum doz olan 0.05 mg/kg kan akımında % 40 artma, ortalama arteriyel basınçta ise % 25 azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir⁴⁶. Omurilik travmasına bağlı hipotansiyonda kan transfüzyonu, adrenalın veya anjiotensin verilebilir. Nimodipin ile adrenal kombinasyonu ise kan akımında % 60 artma sağlamaktadır⁵⁰. Ancak deneysel çalışmalarda, omurilik yaralanmasında nimodipinin kullanılması hem ilacın hem de omurilik yaralanmasının yarattığı hipotansiyon nedeni ile mümkün olmamış ve faydalı bir etki saptanamamıştır⁵¹.

Diğer bir çalışmada ise nimodipinin sistemik hipotansiyon yapıcı etkisini önlemek için dekstran kullanılmış ve aksonal iletimin düzeldiği bildirilmiştir²². Ancak bu etkisinin sitoprotektif etkiye mi yoksa kalsiyum kanallarının blokajına mı bağlı olduğu anlaşılamamıştır.

e) Metil Prednisolon (MPD): Omurilik yaralanmasından sonra ortaya çıkan sellüler olaylardan oksijen kökenli serbest radikallerin sorumlu olduğu bilmektedir^{24,25}. Bu nedenle lipid peroksidasyon inhibitörleri, serbest radikal tutucuları ile antioksidanların omurilik yaralanmasının tedavisinde yararlı olmaları gerekir.

MPD spinal kan akımını artırdığı, lezyon yerinde Na^+ ve su tutulumunu azalttığı ve potasyum kaybını önlediği bilinmektedir. Steroitler, lipid peroksidasyonunun potent inhibitörleridir^{16,52}. 1969 yılından beri steroidlerin faydalı etkileri üzerine deneysel çalışmalar bildirilmiştir⁴³. Yüksek doz MPD tedavisinin $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz inaktivasyonunu azaltıcı etkisi üzerine de çalışmalar yapılmıştır⁵³. MPD hücre dışı Ca^{+2} un düzenlenmesini kolaylaştırır ve $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPaz}$ enzim pompasının aktivitesini artırır⁴³. Steroidler ayrıca vitamin E gibi moleküllere tutunarak serbest radikal tutucu rolü oynarlar⁴³.

Bu iyi sonuçlar kuşkusuz insanlarda da steroidlerin yaygın olarak kullanılmasına neden olmuştur. Ancak diğer bazı çalışmalar ise steroidlerin klinik etkinliğini kanıtlamamış, bunun yerine lipid peroksidasyonunu ve ikincil yaralanma sürecini azaltmada steroid dozunun ve tedavi zamanlamasının önemini vurgulamıştır^{2,23}. Yapılan çalışmalarda optimal MPD dozunun 30 mg/kg olduğunu ve tedaviye başlama zamanının ilk 8 saat olması gerektiği ileri sürülmüştür¹⁶. Yüksek doz kortizonun omurilik kan akımını ve perfüzyonunu artırdığı ve nörolojik defisitleri azalttığı bildirilmiştir^{16,54,55,56}. Ayrıca randomize kontrollü bir klinik çalışmada da ilk 8 saat içinde verilen yüksek doz kortizonun nörolojik düzelme yaptığı

bulunmuştur²⁶. Çok yüksek doz MPD dozları glikokortikoid reseptörleri için değil, Ca^{+2} reseptörleri için verilmektedir²¹. A.B.D.'de National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS) olarak adlandırılan bir çift kör çalışmanın sonuçları yayınlandığından beri ilk 8 saat içinde gelen olgulara MPD vermek rutin haline gelmiştir^{23,26}. Bu olgular plesebo ve naloksan alanlara göre hem motor hem de duysal fonksiyon da belirgin düzelme göstermiştir. Fonksiyonda düzelmenin 1.yılda da belirgin olduğu ve bu 8 saatlik zaman sınırından sonra tedavi olan olgularda hiç düzelme olmadığı belirtilmiştir²⁶.

Günümüze kadar omurilik yaralanmalarında normal veya yüksek doz kortizon ile yapılan deneysel ve klinik çalışmalar hep birbiri ile çelişkili sonuçlar vermiştir.

f) Larazoidler: Larazoidler (21-aminosteroid) nonglukokortikoid steroidler olup antioksidan etkisi MPD daha yüksektir²⁶. Bu gruptan trilazad mesilat (U74006F) üç tip etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Birinci olarak lipid peroksid radikaller ile süperoksid radikalleri nötralize eder. Membran stabilizasyonunu lipid hidrolizini engelleyerek sağlar. Zedelenen dokuda vitamin E seviyesini korur ve antioksidan etki gösterir. MPD gibi hiperglisemi ve immunosupressif etkileri de yoktur^{57,58}.

g) Gangliosidler: Yaralı nöral dokunun rejenerasyonunu ve reorganizasyonunu provoke edecek yöntemlerin geliştirilmesi yeni çabalaradır. Gangliosidler asidik glikolipidler olup hücre membran dış lipid tabakasındaki ana meddedir. Sfingosin denilen uzun ansatüre hidrokarbon zinciri taşıyan aminoalkollerdir⁵⁹. Klinik çalışmalarda en çok GM1 gangliosid kullanılmıştır. Verilen ekzojen gangliosidler lipid tabakasına yerleşip endojen gangliosid gibi davranırlar ve dokudaki hücre rejenerasyonunu artırır^{59,60}. Eksitatör aminositlerin nörotoksisitesini azaltırlar, ancak glutamat ve aspartat gibi bunların fizyolojik Ca^{+2} kanalları üzerine etkisi yoktur. Dendrit ve akson membranlarının devamlılığının sürdürülmesi için bir yapı bloğu gibi davranırlar ve travmadan 1-2 gün sonrada verilebilirler. Bu tedavi beyaz cevherde daha fazla hasar olmasını önlemekte ve belki de sinir tamirini uyarmaktadır⁶⁰. Ancak bu olumlu etkilerinin bildirilmesine rağmen daha geniş klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel çalışma Çukurova Üniversitesi Tıbbi Bilimler Deneysel Araştırma Merkezinde (TIBDAM) yapılmıştır. Bu amaç için 280-310 gram ağırlığında erişkin erkek Wistar sıçanlar kullanılmıştır.

Araştırma yeterli hava sirkülasyonu ve çevre ısısının sağlandığı odalarda yapıldı. Lezyon yapıldıktan sonra tüm deneklere ayrı ve kolay beslenmelerini sağlayan kafeslerde bakım yapıldı.

Deneklerin uyutulması işleminde, 10 mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer İlaç San. İstanbul) (IM) ile sedasyon yapıp, 50 mg/kg'a ketamin hidroklorür (Ketalar, Parke-Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç San. İstanbul) verilip genel anestezi sağlandı. Rahat bir cerrahi girişim sağlamak amacı ile deney özel tespit tahtalarında uygun pozisyon verilerek ve mikroskop altında yapıldı.

Bu deneysel çalışma 1. grupta 10 adet, 2.grupta 20 adet, 3.grupta 20 adet ve 4.grupta 20 adet olmak üzere toplam 70 adet sıçan üzerinde yapıldı. Cerrahi kesi sıçanın sırt kısmında, tıraş yapıldıktan sonra, aseptik şartlar sağlanarak yapıldı.

Çalışmada Rivlin ve Tator'un klip kompresyon modeli kullanıldı⁶¹. Sıçanın sırt kısmında en çıkıntılı olarak göze çarpan Torokal 2'nin (T₂) spinoz çıkıntısı cerrahi işaret noktası olarak kullanıldı ve T₂-T₇ segmentleri arasında altı seviyede laminektomi yapıldı. Spinal kord açığa çıkarıldı ve extradural olarak kapanma basınca 50 g olan anevrizma klipsi (Yaşargil, FE 619 K, Aesculap AG Almanya) yerleştirilerek spinal kod travması oluşturuldu. Travma yapılan grupta klips 1 dakika tutuldu sonra klips tutucusu ile hemen kaldırıldı. Tüm sıçanların spinal travmadan sonra paraplejik olduğu görüldü.

Bu çalışmada tüm sıçanlarda aynı klips kullanıldı. Oluşturulan lezyonun derecesini standardize edebilmek için, asıl çalışmadan önce aynı yöntemi uygulayarak 20 sıçanda öncü çalışma yapıldı. Klips ile kompresyon uyguladıktan 2 gün sonra spinal kord örneği alıp formalin emdirilmiş parafin içinde fikse edip, 8µm kalınlıkta örnekler alındı. Örnekler Kluver-Barrera metodu ile boyandı. 5 sıçan travmadan sonraki 2 günlük peryot içinde öldü. Tüm örnekler ışık mikroskop altında, kortikospinal traktustaki ve kord yüzeyindeki kavite boyutuna göre değerlendirildi ve % 75 oranında lezyon dereceleri arasında anlamlı bir fark olmadığını tespit edildi.

Travmadan hemen sonra sıçanlar raslantısal olarak 4 gruba ayrıldı.

1.Grupta (Kontrol) 10 sıçan alındı. 6 seviye laminektomi yapıldı. Travma ile medikal

tedavi uygulanmadı ve normal $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz, SOD değerlerinin, iNOS immunreaktivitesinin ve ultrastrüktürel bulguların saptanması (elektron mikroskopi) için hemen örnek alındı.

2.Grupta (Sham opere) ise 20 sıçana 6 seviye laminektomi yapıldı. Spinal travma uygulanmadı ve naloksan ile eşit miktarda (2 cc/gün) intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Laminektomi'nin $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz, SOD değerlerine, iNOS immunreaktivitesine ve ultrastrüktürel bulgulara etkisinin saptanması için 10 sıçandan 2 saat sonra (erken evre), diğer 10 sıçandan ise 2 gün (geç evre) sonra biopsi alındı.

3. Grupta ise 20 sıçana 6 seviye laminektomi yapıp Yaşargil klipsi ile 1 dakika süre kompresyon uygulandı ve naloksan ile eşit miktarda (2 cc/gün) intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Laminektomi ve spinal travmanın $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz, SOD değerlerine, iNOS immunreaktivitesine ve ultrastrüktürel bulgulara etkisinin saptanması için 10 sıçandan 2 saat sonra (erken evre), diğer 10 sıçandan ise 2 gün (geç evre) sonra biopsi alındı.

4. Grupta ise 20 sıçana 6 seviye laminektomi yapıp Yaşargil klipsi ile 1 dakika süreli kompresyon uygulandı . Tedavide 2 mg/kg/gün intraperitoneal naloksan (2.5 ampul = 1 mg) verildi ve naloksan tedavisinin $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz, SOD değerlerine, iNOS immunreaktivitesine ve ultrastrüktürel bulgulara etkisinin saptanması için 10 sıçandan 2 saat sonra (erken evre), diğer 10 sıçandan ise 2 gün (geç evre) sonra biopsi alındı.

Deneklerin her biri beslenme durumu, bilinç seviyesi ve motor aktivite için günlük olarak muayene edildi.

3.1. Örneklerin Hazırlanması

Açığa çıkartılan kord segmentleri, tüm gruplarda travmadan sonra eşit zamanda biopsi alındı. Birinci grup hariç her bir gruptaki 10 sıçan travmadan sonra 2 saat ve 2 gün sonra öldürüldü. Travmatik kord bölgesi transvers olarak 4 bloğa ayrıldı. Birinci ve 4. blok $\text{Na}^+-\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz ile SOD aktivitesini değerlendirmek için saf su içeren solüsyona kondu - 80 °C buzdolabında saklandı. iNOS'u immünohistokimyasal, ultrastrüktürel bulguları ise elektron mikroskobunda (EM) değerlendirmek için 2. ve 3. bloklar alındı. İmmünohistokimyasal değerlendirme için alınan örnekler de % 10'luk formalin içeren solüsyona yerleştirildi. EM inceleme için gri ve beyaz cevheri içerecek şekilde 0.5 x 0.2 cm ebatlarında doku alındı ve pH'sı 7.4 olan % 5 lik gluteraldehit solüsyonuna yerleştirildi.

3.2. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz Aktivitesinin Tespiti

ATPaz aktivitesinin tespiti için, 1 mM magnezyum içeren 0.3 M sukroz ile hazırlanan %10 konsantrasyondaki doku, açıklığı 0.25 – 0.38 olan teflon pistonlar yardımı ile 1000 devirde 90 saniye sentrifüj edildi. ATPaz aktivitesi inkübasyon ortamına eklenen disodyum ATP'den açığa çıkan inorganik fosfat'ın (Pi) ölçülmesi ile değerlendirildi⁶².

İnkübasyon ortamı $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz, 6 mM MgCl_2 , 5 mM KCl, 100 mM NaCl, 0.1 mM etilendiamin tetraasetik asid, 135 mM Tris-HCl karıştırılarak elde edildi ve tampon solüsyonu ilave edilerek pH'sı 7.4'e getirildi⁶³. 37°C'de 5 dakika bekletildi ve her tüpe konsantrasyonu 3 mM oluncaya kadar Na_2ATP (Boehringer Mannheim, Almanya) ilave edildi. Enzim içermeyen örnek ise 37°C'de 30 dakika bekletildi ve standart olarak kullanıldı.

İnorganik fosfatın tayini daha önce hazırlanan karışımın 1 ml'sine ilave edilen lubrolmolibdat solüsyonunun (Sigma Chemical Co, St. Louis) ortam sıcaklığında 10 dakika tutulup kompleks oluşturması esasına dayanır. 340 nm'de spektrofotometride tutulum ölçüldü. Tüm ölçümler üç kez tekrarlandı. Örnekler KH_2PO_4 standart olarak kullanılarak fosfat içeriklerine göre karşılaştırıldı. Değerlendirme örneklerin içerdiği protein miktarları, standart çözeltinin gösterdiği absorbans değerleri ile karşılaştırılarak yapıldı. Spesifik aktivite her mg protein için bir saatte açığa çıkan inorganik fosfatın nanomol değeri (nmol Pİ / mg protein / saat) olarak hesaplandı^{62,63}.

3.3. SOD Aktivitesinin Ölçülmesi

SOD aktivitesinin ölçülmesi için alınan örnekler Yarbrough tarafından tarif edilen şekilde hazırlandı, Roth ve Gilbert tarafından tanımlanan modelin modifikasyonu olan pirogallol metodu ile ölçüldü⁶⁴. Doku örneğinden bir miktar alınıp üzerine serum fizyolojik döküldükten sonra homojenize edildi. Doku homojenasından 0.5 ml alınıp bir tüpe kondu. Üzerine 3.5 ml distile su eklenip iyice çalkalandıktan sonra 1ml etil alkol ilave edildi. Daha sonra tekrar üzerine 0.6 ml kloroform eklenildi. Şiddetli bir şekilde çalkalanıp üst fazı alındı. Ksantin ve ksandin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikalleri 2-[4-iyodofenil] - 3-[4-nitrofenil] -5-feniltetrazolium klorid ile kırmızı renkli bir kompleks oluşturur. Eğer ortamda SOD enzimi varsa süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırdığı için formazon oluşumu inhibe olur. Bu işlemler sonrası SOD enzim aktivitesi, spektrofotometride 505 nm' de formazon oluşumunun %50 inhibisyonu dikkate alınarak Lowry yöntemi ile protein tayini yapıldı⁶⁴. Spesifik aktivite U/g protein olarak hesaplandı.

3.4. İmmünohistokimyasal Yöntemler

İmmünohistokimyasal çalışmada indüklenabilir nitrik oksit sentetaz aktivitesi (iNOS) ölçüldü. Bu amaçla alınan dokular hemen %10'luk tamponlu nötral formalin içerisinde tespit edildi, rutin ışık mikroskopik doku takibi yapılarak parafin içine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 5-6 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 60°C'lik etüvde 35 dakika bekletildi. Ardından yine etüvde 35 dakika ksilolde deparafinize edilen kesitler oda ısısına alındı ve tekrar iki kez 5'er dakika taze hazırlanan ksilolde bekletildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinden geçirilerek hidrate edilen kesitler, distile su içine alındılar ve 5 dakika süre ile tutuldular. Kesitler, oda sıcaklığında endojen peroksitlerin yok edilerek zemin boyanmasını azaltmak amacı ile saf metanol içinde hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonuna alındılar. Arkasından kesitler 3 defa 5'er dakika süre ile pH'sı 7.5 olan fosfat tamponlu solüsyonda (PBS) çalkalandı. Her kesitin çevresi dikkatlice kurutulduktan sonra üzerine Reagent 1A (serum blocking solution, %10 nonimmun serum) damlatılarak oda sıcaklığında nemli ortamda 10 dakika bekletildi. Anti-iNOS birincil antikor (Biomol, SA 200), %10'luk PBS içinde 1/500 oranında sulandırıldı. Kesitlerin üzerine anti-iNOS damlatılarak 4 °C'de bir gece nemli ortamda inkübe edildi. Ardından üç defa 5'er dakika süreyle fosfat tamponlu suda çalkalanan kesitlere ikincil antikor inkübasyonu yapıldı (Zymed Histostain-SP Kit, katalog no:956143).

Herbir grup için hazırlanan negatif kontrol kesitlere birincil antikor yerine negatif kontrol reagent damlatıldı. Kesitler PBS solüsyonunda 3 defa 5'er dakika yıkandı. PBS fazlalığı alındı ve kesitlere Reagent 1B (biotinlenmiş ikincil antikor) damlatıldı, 10 dakika bekletildi ve ardından PBS ile 3 defa 5'er dakika çalkalandı. Doku kesitlerine Reagent 2 (Enzyme conjugate streptavidin-peroxidase conjugate) damlatıldı ve oda ısısında 10 dakika tutuldu. PBS ile çalkalandı ve kesitler üzerine substrat kromojen karışımı (substrate-chromogen mixture), (Reagent 3A, 3B, 3C) damlatıldı. 10 dakika bu karışımda tutulan kesitler distile su ile çalkalandı ve zıt boyama için kesitlere Reagent 4 (Hematoksilen) damlatıldı, 1-3 dakika boyanan kesitler çeşme suyunda çalkalandı. 30 saniye PBS içinde mavi renk alıncaya kadar bekletilen kesitler distile su içinde çalkalandı. Ardından kesitlere monte solüsyonu damlatıldı (Reagent 5) ve lamel ile kapatıldı. Kurumaya bırakılan kesitler Nikon optiphot trinoküler ışık mikroskobu ile incelendi ve resimleri çekildi.

3.5. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Elektronmikroskopik (EM) değerlendirme için kontrol ve deney gruplarına ait gri ve beyaz cevheri içerecek şekilde spinal biopsi elde edilmesinden hemen sonra, alınan doku örnekleri Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %5'lik gluteraldehit solüsyonuna yerleştirildi⁶⁵. Gluteraldehit solüsyonunda 1 saat kadar bekletilen doku parçaları daha sonra içerisinde bir miktar %5'lik gluteraldehit solüsyonu bulunan, dibi dişçi mumu ile kaplanmış, petri kutularına alındı ve jilet yardımıyla yaklaşık 1 mm³ büyüklükte parçalara ayrıldı. Doku parçaları sonradan tekrar 3 saat kadar süre ile %5'lik gluteraldehit solüsyonuna alındı, böylece bu solüsyonda toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Tespit işleminden sonra dokular Millonig fosfat tamponu ile çalkalandı ve bir gece süre ile bu solüsyonda yıkandı. Ertesi gün, dokular millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1'lik Osmiyum tetroksit (OsO₄) solüsyonu ile 2-3 saat ikincikez tespit edildi.

İkinci tespitten sonra dokular tekrar millonig fosfat tamponu ile iki defa onar dakika yıkandı ve aşağıdaki tabloda gösterildiği şekilde dehidrate edildi.

Tablo 1: EM için alınan örneklerin dehidrate edilme süreleri ve ortam sıcaklıkları

	Süre (dakika)	Sıcaklık (°C)
%50 Etil Alkol	15	+4
%70 Etil Alkol	15	+4
%86 Etil Alkol	15	+4
%96 Etil Alkol	15	+4
%100 Etil Alkol	10	+4
%100 Etil Alkol	10	+4
%100 Etil Alkol	10	Oda ısısında
Propilen Oksit	15	Oda ısısında
Propilen Oksit	15	Oda ısısında

Son %100'lük etil alkol safhasına kadar olan işlemler +4 °C buzdolabında yapıldı. Sonraki işlemler ise, oda ısısında yapıldı. Sudan kurtulan doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edildi.

Bir kısım propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bir kısım propilen oksit + bir kısım gömme materyali: 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları, içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali bulunan tüplere alındı ve bir gece süre ile döndürücüde karıştırıldı.

Gömme Materyali:

Araldite CY 21220 ml.

Sertleştirici HY 964.....20 ml.

Hızlandırıcı DY 064.....0.6 ml.

Plastikleştirici-Dibütil Fitalat1 ml.

Ertesi sabah doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat süre ile polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak yavaş yavaş soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 500 A° kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve %70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat (Lead sitrat) solüsyonları ile boyandı⁶⁶. Boyanan kesitler Zeiss E.M. 10 B elektron mikroskobu ile incelendi. Mikrografiler Dupont filmleri ile çekildi. Resimler fohar ve fortezo kağıtlarına basıldı.

İstatistik değerlendirme için Mann-Whitney U test kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Erken Dönem (2 saat)

Grup 1 (Kontrol): Medulla spinalis doku kesitlerinin immünohistokimyasal yöntemle uygulanan iNOS ile özellikle beyaz cevherde mikrogliaların ve kapiller damar duvarı perisitlerinde pozitif boyanma izlendi. Gri cevherde zayıf pozitif boyanan az sayıda glia hücresi dışında belirgin bir boyanmanın olmadığı saptandı (Şekil 4).

Grup 2 (Sham opere): İmmünohistokimyasal olarak iNOS aktivitesi normal kontrol grubuna benzerdi. Ayrıca piaaraknoid zarlarda makrofajların kuvvetli pozitif reaksiyonları dikkati çekti (Şekil 5).

Grup 3: Travma grubundan elde edilen medulla spinalis doku örneklerinin immünohistokimyasal yöntemle boyanmasında, beyaz cevherde belirgin iNOS aktivitesi saptandı. Kapiller damar duvarlarında, mikrogliyalarda ve meningeal makrofajlarda kuvvetli pozitif iNOS boyanma görüldü (Şekil 6).

Grup 4: Medulla spinalis doku örneklerinin erken dönemdeki immünohistokimyasal yöntemle boyanma aktivasyonları daha zayıf olmakla beraber 3.Gruba benzemekteydi. iNOS aktivasyonu özellikle beyaz cevherde oldukça belirgindi. Gri cevherde nadiren bazı glia hücrelerinde pozitif boyanma tespit edildi (Şekil 7).

Geç Dönem (2 gün)

Grup 1: Medulla spinalis doku örneklerinden immünohistokimyasal yöntemle iNOS aktivasyonu erken dönemde elde edilen kontrol grubuna benzerdi. Beyaz cevherde mikroglialar, bazı perisitler ve meningeal makrofajlar dışında belirgin bir boyanma izlenmedi.

Grup 2: iNOS aktivitesi yönünden normal kontrol ve erken dönem sham opere grupları ile benzerlik göstermekteydi.

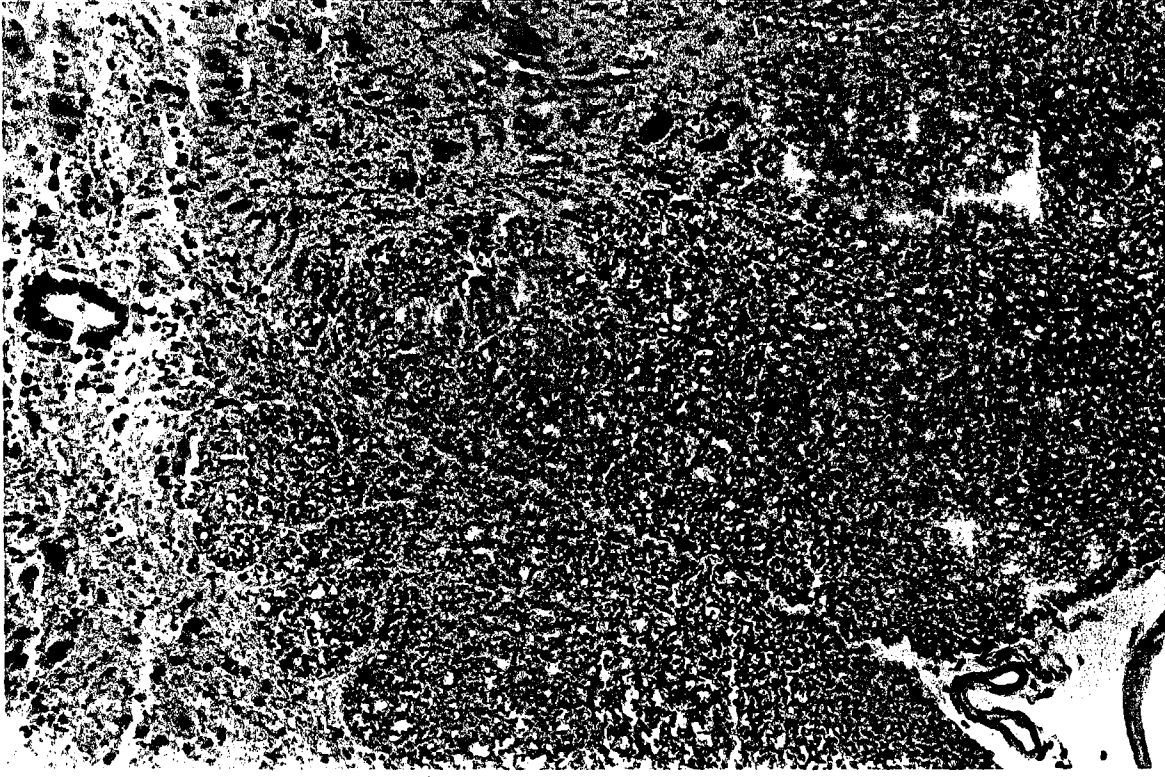
Grup 3: Medulla spinalisin hem gri hem de beyaz cevherinde belirgin iNOS aktivasyonu izlenmişti. Gri cevherde nöronlarda boyanma saptanmadı. Ancak glia hücreleri, kan damar duvarları ve meningeal makrofajlarda kuvvetli pozitif boyanma elde edildi (Şekil 8).

Grup 4: Bu grupta immünohistokimyasal iNOS boyanması oldukça zayıftı. Parankimal hücrelerin dışında bazı glia hücreleri ve meningeal makrofajlarda boyanmalar bu grupta da izlendi (Şekil 9).

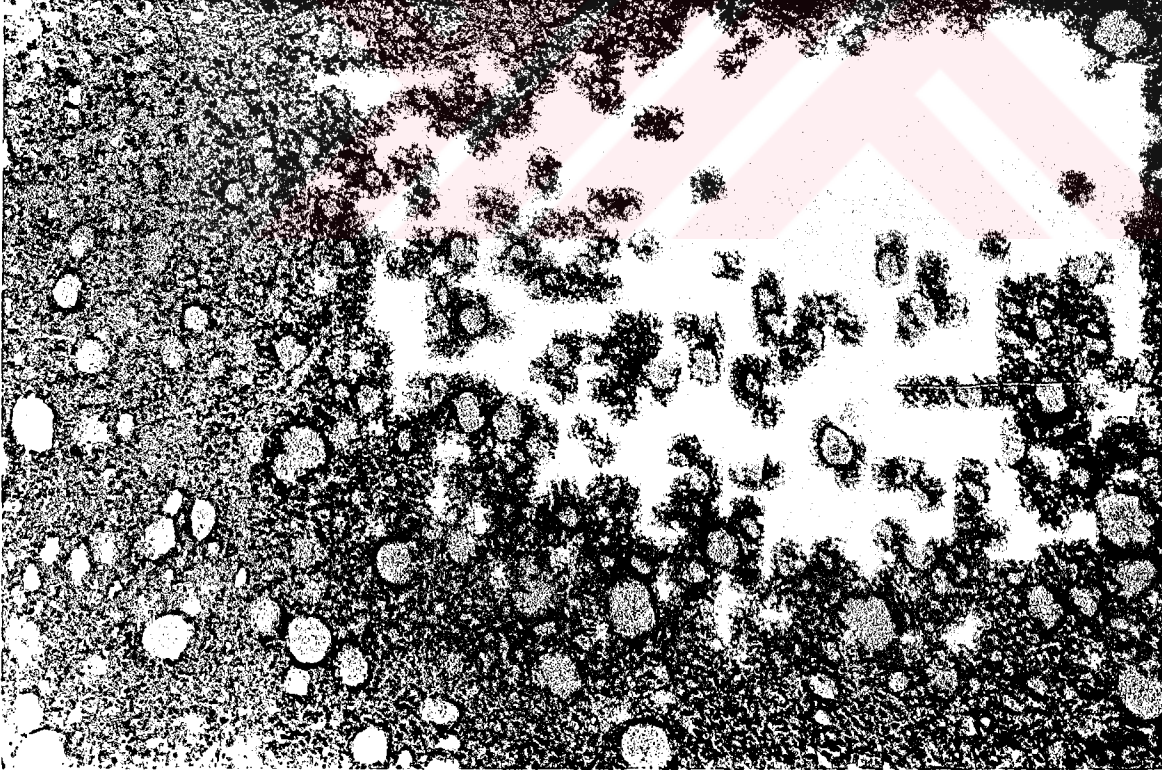
Tablo 2: Medulla spinalis iNOS boyanma değerleri

*(+ : Hafif, ++: Orta, +++: Şiddetli)

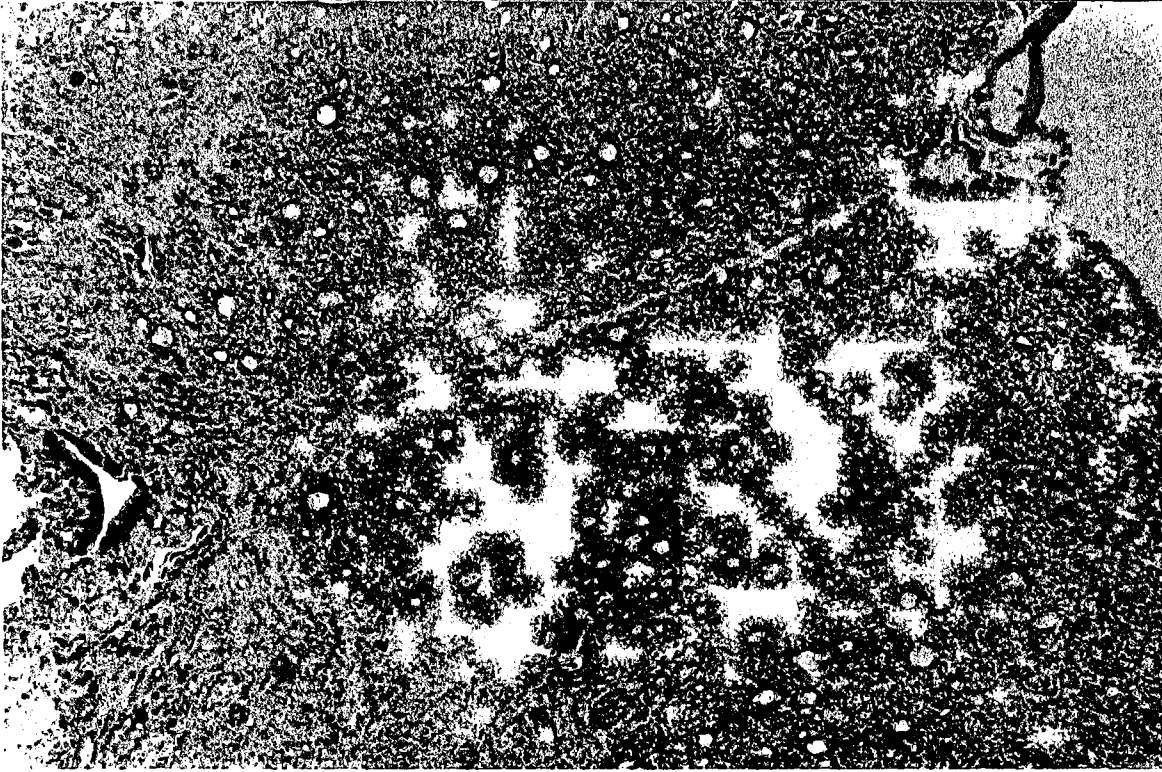
	Erken Dönem	Geç Dönem
Grup 1	+	+
Grup 2	+	+
Grup 3	+++	+++
Grup 4	+++	++



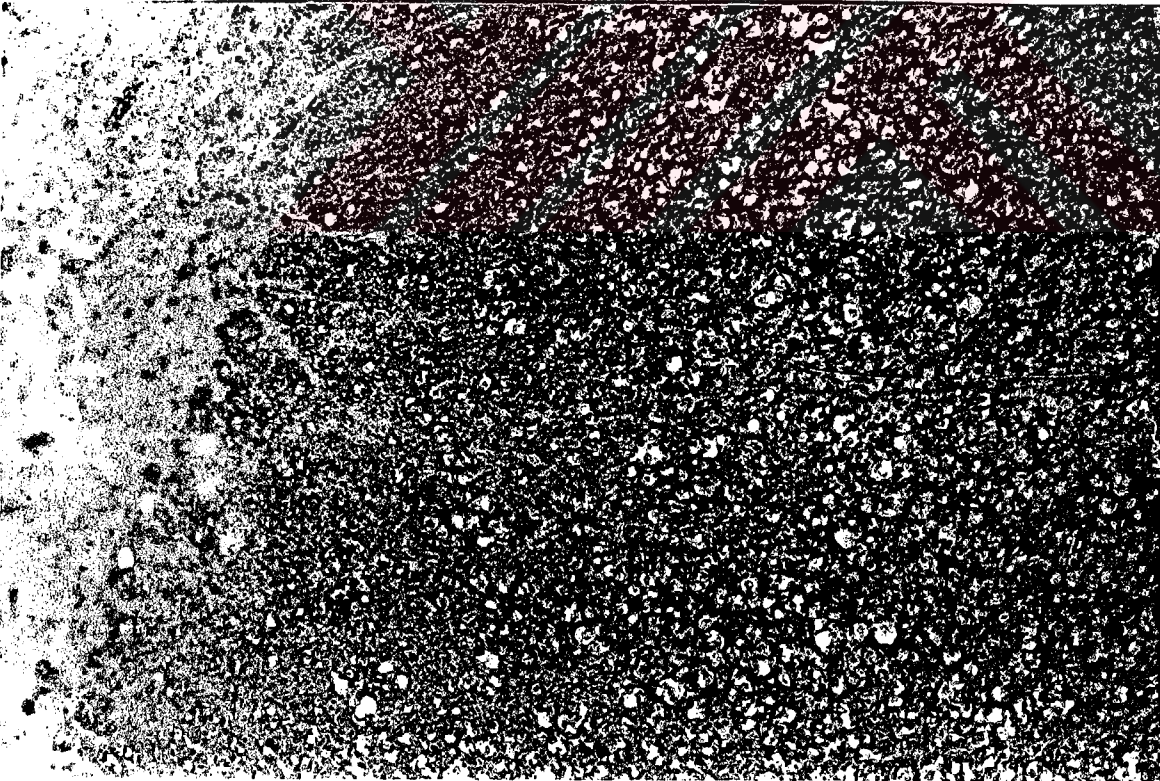
Şekil 3: Normal Kontrol Grubu. İmmünohistokimyasal yöntemde negatif kontrol amacı ile yapılan boyamada iNOS aktivasyonu izlenmemektedir (x100).



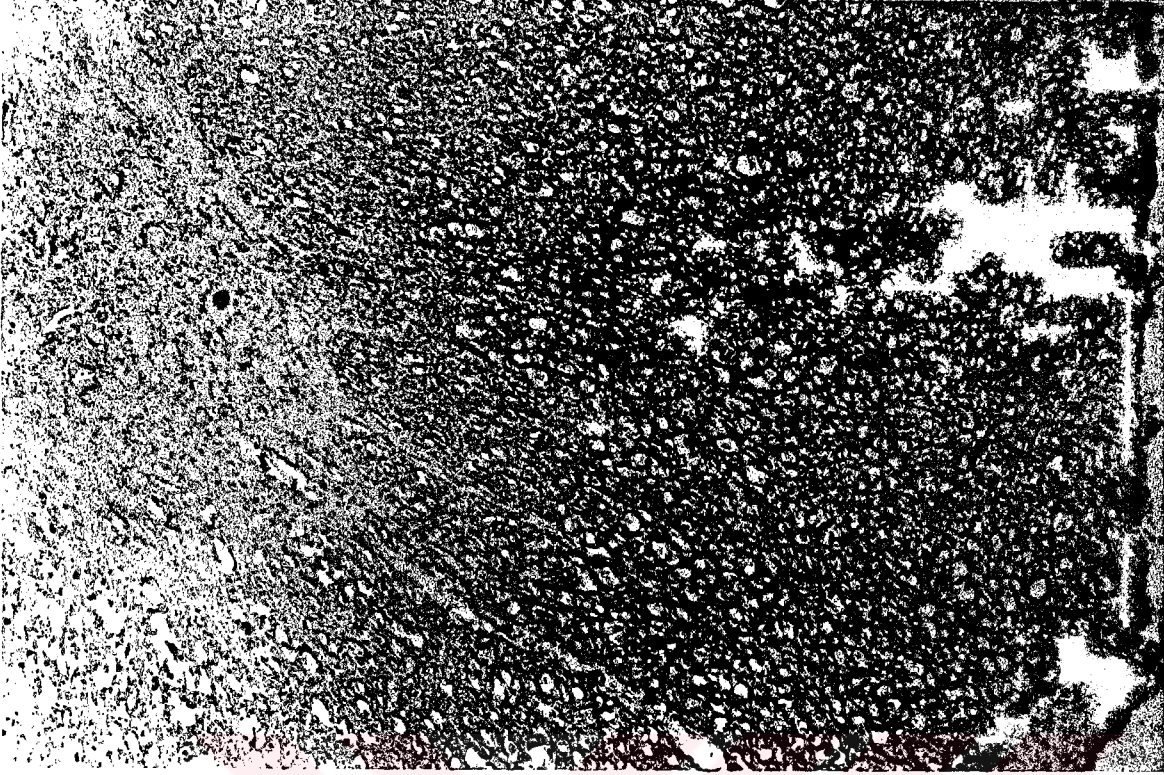
Şekil 4: 1.Grup Erken Dönem. İmmünohistokimyasal boyamada zayıf iNOS aktivasyonu izlenmektedir (x100).



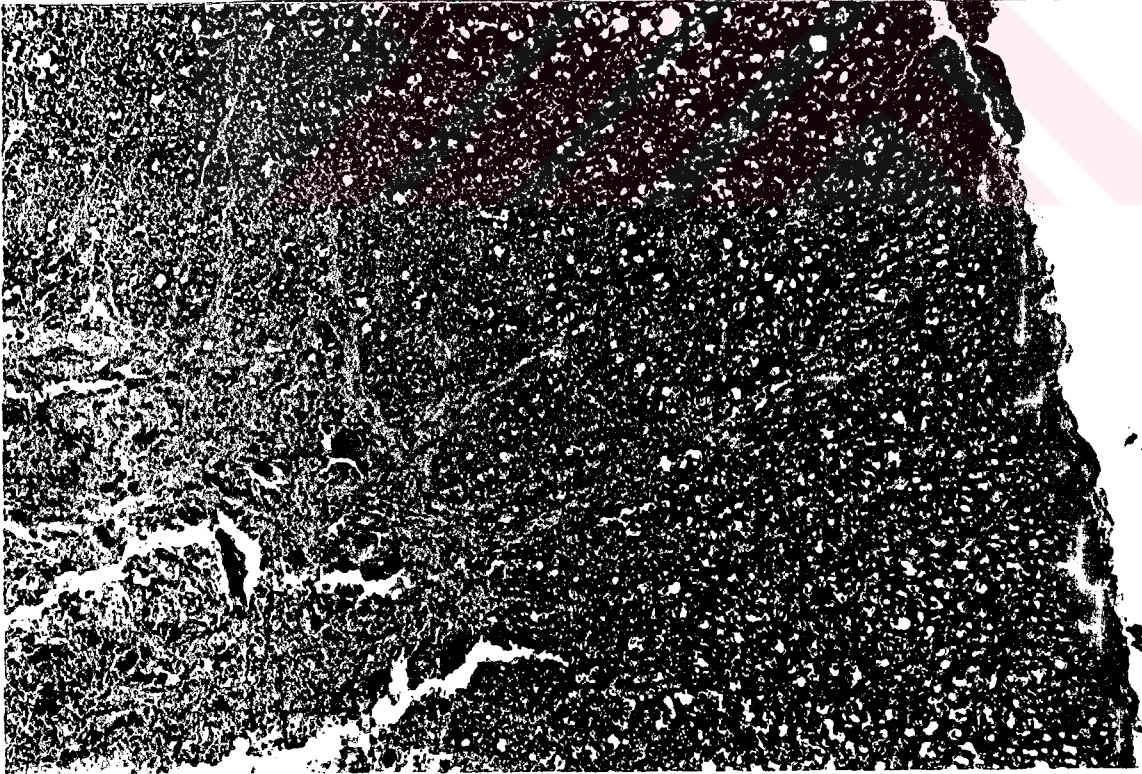
Şekil 5: 2. Grup Erken Dönem. İmmünohistokimyasal iNOS aktivasyonu gri ve beyaz cevherde zayıf olarak izlenmektedir (x100).



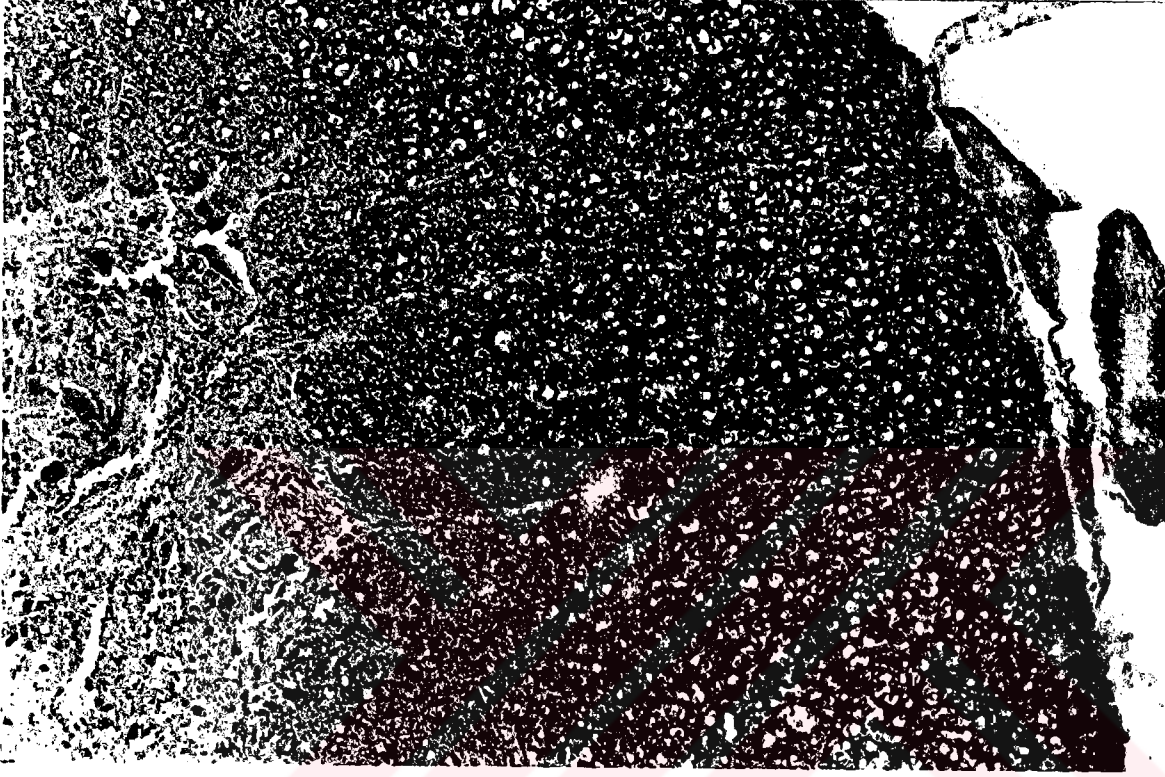
Şekil 6: 3. Grup Erken Dönem. İmmünohistokimyasal boyamada gri ve özellikle beyaz cevherde kuvvetli pozitif iNOS boyanma izlenmektedir (x100).



Şekil 7: 4. Grup Erken Dönem. İmmünohistokimyasal boyamada iNOS aktivasyonu izlenmektedir (x100).



Şekil 8: 3. Grup Geç Dönem. İmmünohistokimyasal boyamada gri ve beyaz cevher ile piaaraknoid zarlarda iNOS aktivasyonu izlenmektedir (x100).



Şekil 9: 4. Grup Geç Dönem. İmmünohistokimyasal boyamada iNOS aktivasyonu daha zayıf şekilde izlenmektedir (x100).

4.2 ELEKTRON MİKROSKOPİK BULGULAR

Erken Dönem (2 saat)

Grup 1 (Kontrol): Normal kontrol medulla spinalis doku örneklerinin EM incelenmesinde gri cevherde nöron perikaryonları, glia hücreleri, myelinli ve myelinsiz sinir lifleri ile kapiller damarlar normal yapıda izlendi. Beyaz cevherde glia hücreleri, miyelinli sinir lifleri, akson ve myelin kılıf yapıları normaldi. Gri cevherde yer alan nöron perikaryonlarında ortada vasküler bir çekirdek ve sitoplazmada normal yapıda hücre organelleri izlendi. Glia hücreleri yapı ve dağılımları yönünden normaldi. Nöronlar ve kapiller damarların yakın çevresinde glia hücre uzantıları bulunmaktaydı. Perikapiller astrosit uzantıları normal ultrastrüktüre sahipti. Myelinli sinir liflerinde akson dıştan elektrodens görünümlü myelin bir kılıfa sahipti. Myelin lamellerin yapı ve konsantrik düzenlenmesi intak haldeydi (Şekil 10). Kapiller damarlar endotel hücreleri ile döşeli olup, hücreler birbirine okludens tipi bağlantılar ile bağlanmışlardı. Endotel hücreleri dıştan ince bir bazal lamina ile sarılıydı. Bazal laminanın dışında yer yer perisit uzantıları ve astrosit ayakları yer almaktaydı.

Grup 2 (sham opere): Bu grupta her ne kadar bazı myelinli sinir liflerinde hafif myelin kılıf değişiklikleri izlenmiş olmakla birlikte, genel görünüm büyük oranda kontrol grubuna benzemektedir. Bu grupta da gri cevherde nöronlar, glia hücreleri, myelinli sinir lifleri, kapiller damarlar, sinaps yapıları normaldi. Beyaz cevherde glia hücreleri, çekirdek ve stoplazmik organelleri normal yapıda izlendi. Bazı myelinli sinir liflerinde fokal myelin bozulmaları dışında akson ve myelin kılıf normal yapısını korumuştur. Kapiller damarlar ve perikapiller alanların ultrastrüktürü normaldi (Şekil 11).

Grup 3: Medulla spinalis doku örneklerinin ince yapısında beyaz ve gri cevherde kanama ve ödem alanlarını da içeren ciddi yapısal değişiklikler izlendi (Şekil 12). Gri cevherdeki nöronlarda, çekirdekte kromatin yoğunlaşması, sitoplazmada mitokondriyonlar, endoplazmik retikulum sisternaları ve Golgi apparatus elemanlarında genişleme ve vakuolizasyon, serbest lizozom artışı gözlenen ortak bulgularıdır. Glia hücreleri genelde normale yakın görünümde izlendi ancak perinöronal ve perikapiller alanlarda glia hücre stoplazmik uzantılarında genişlemeler ilgi çekiciydi. Beyaz cevherde yapısal değişiklikler daha belirgindi. Myelinli sinir liflerinde, aksonlarda büzüşme ve kısmi organel harabiyetiyle, myelin kılıf lamellerinde ayrışma, myelin kılıfın aksonal zona doğru veya sinir lifi dışına doğru yapmış olduğu protrüzyonlar dikkati çekmekteydi. İnterfasiküler

zonlarda ödem alanlarını simgeleyen geniş boşluklara sıklıkla rastlandı. Kapiller endotel hücreleri normale yakın izlenmekle birlikte, perikapiller astrosit ayaklarında belirgin genişleme saptandı (Şekil 13).

Grup 4: Spinal kord ultrastrüktürü, genelde üçüncü gruba benzemekteydi. Bu grupta da hem gri hem de beyaz cevherde yapısal değişiklikler izlendi. Gri cevherdeki nöronların çekirdeklerinde heterokromatin artışı ile intrasitoplazmik vakuolizasyonun varlığı izlendi. Glia hücreleri bu grupta nisbeten normale yakın izlendi ancak sinir liflerinde myelin ve aksonu içeren ciddi yapısal bozulmalar belirgindi (Şekil14). Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinin önemli bir bölümünde akson ve myelin kılıf bozuklukları dikkati çekti (Şekil 15). Kapiller damar endotel ve bazal lamina yapıları normale yakın olarak izlendi. Perikapiller astrosit ayaklarında genişlemeler izlendi .

Geç Dönem (2 gün)

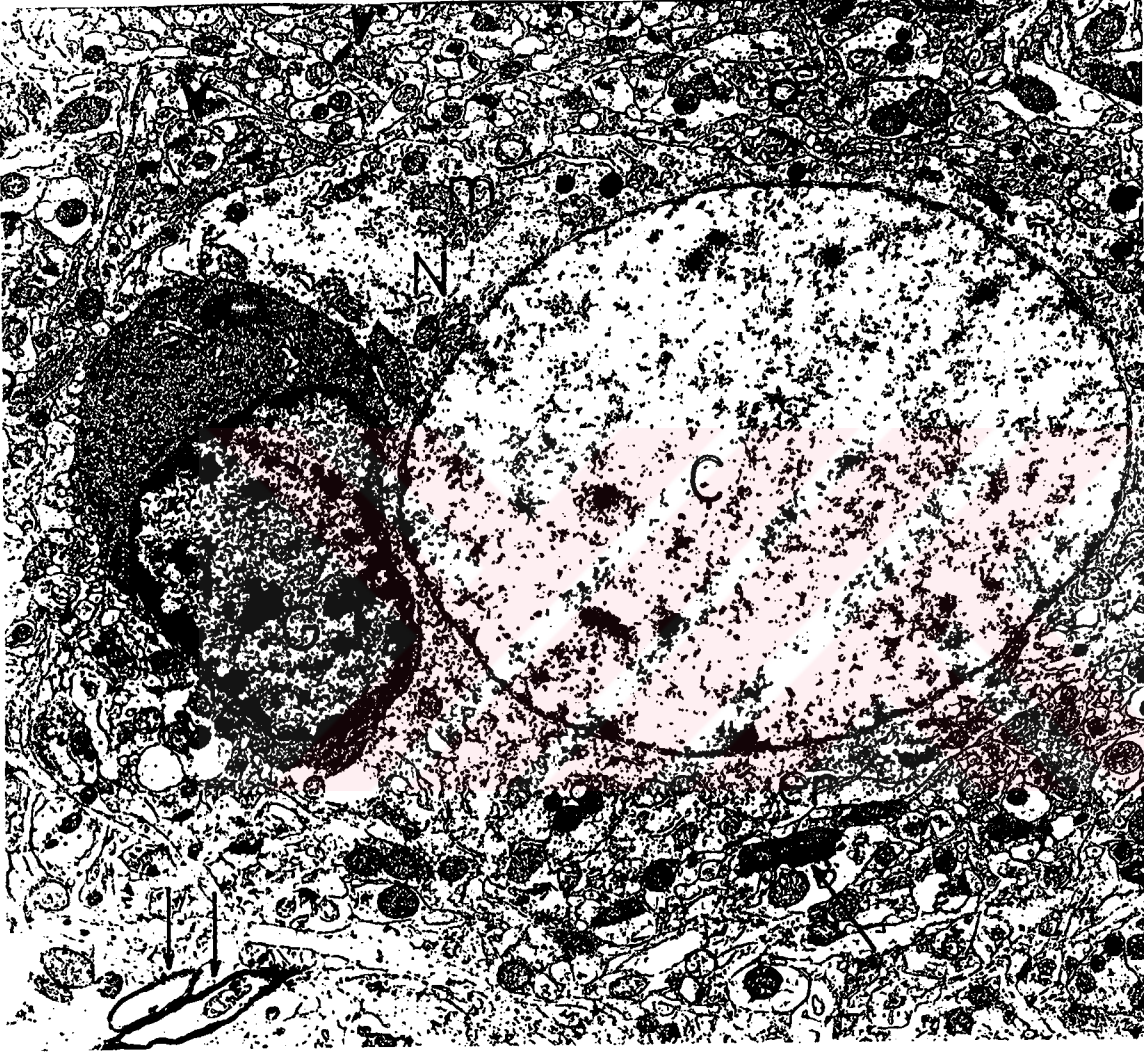
Grup 1 (Kontrol): Medulla spinalis ince yapısında gri ve beyaz cevher görünümü erken dönem birinci gruba benzerdi. Nöronlar, glia hücreleri, sinir lifleri ve kapiller damar yapıları normaldi.

Grup 2 (Sham Opere): Gri ve beyaz cevherde, hücrel ve sinir lifi ultrastrüktürü normal kontrol grubuna benzer olarak izlendi (Şekil 16).

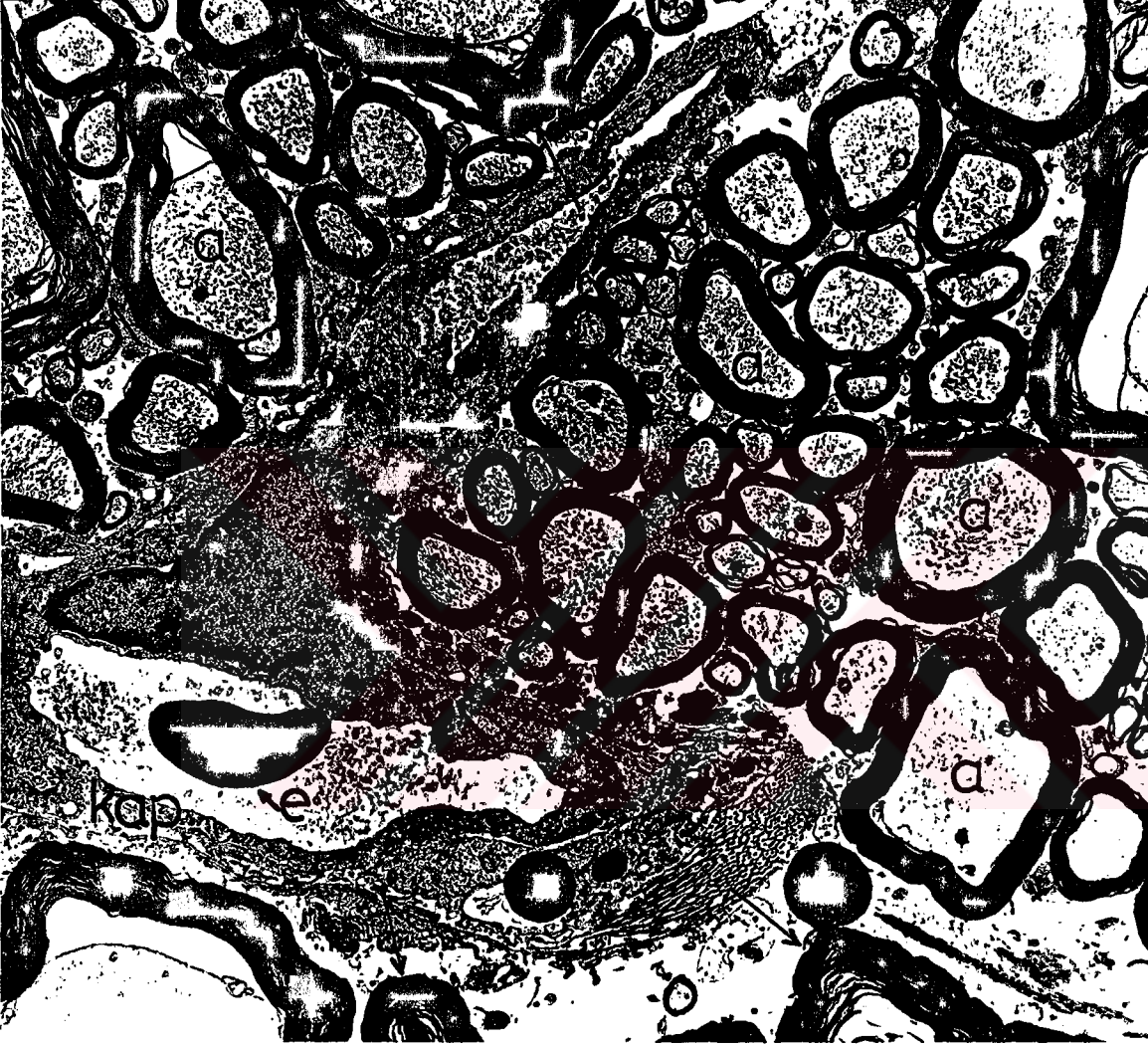
Grup 3: Gri cevherdeki nöronlarda çekirdekte hafif kromatin yoğunlaşması, sitoplazmada mitokondriyonlarda genişleme ve lipofuksin granüllerinde artış gözlenmesi ortak bulguları. Sinir liflerinde, aksonlarda hafif organel genişlemesi, akson ile miyelin kılıf arasında geniş boşluklar, miyelin kılıfta hafiften orta dereceye varan myelin kılıf hasarları saptandı (Şekil 17). Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinde, myelin kılıf ve aksonal değişiklikler daha belirgindi. Myelinli sinirlerde aksonal büzüşme, periaksonal boşlukta genişleme, aksonal zona doğru myelin kılıf invajinasyonları gözlemlendi (Şekil 18). Glia hücrelerinde çekirdekler normal görünümde izlenmekle birlikte, sitoplazmada membranöz organellerde genişlemeler ve vakuolizasyona sıklıkla rastlandı. Kapiller damar endotel hücrelerinde lizozomlarda ve intrasitoplazmik vakuollerde artış izlendi. Astrosit ayaklarında belirgin ödem bu grupta da görülmekteydi.

Grup 4: Nöron sitoplazmalarında lipofuksin granüllerinde artış ve mitokondriyonlarda hafif şişme, kristalarda parçalanma izlenmesine rağmen, hücrelerin çekirdek ve sitoplazmik yapısı nispeten 3. gruba göre daha iyi durumdaydı. Sinir liflerinde, aksonlarda ince yapı normale yakın izlenmekle beraber hafiften orta dereceye kadar varan myelin kılıf bozuklukları bu grupta da izlendi (Şekil 19). Beyaz cevherde myelinli sinir

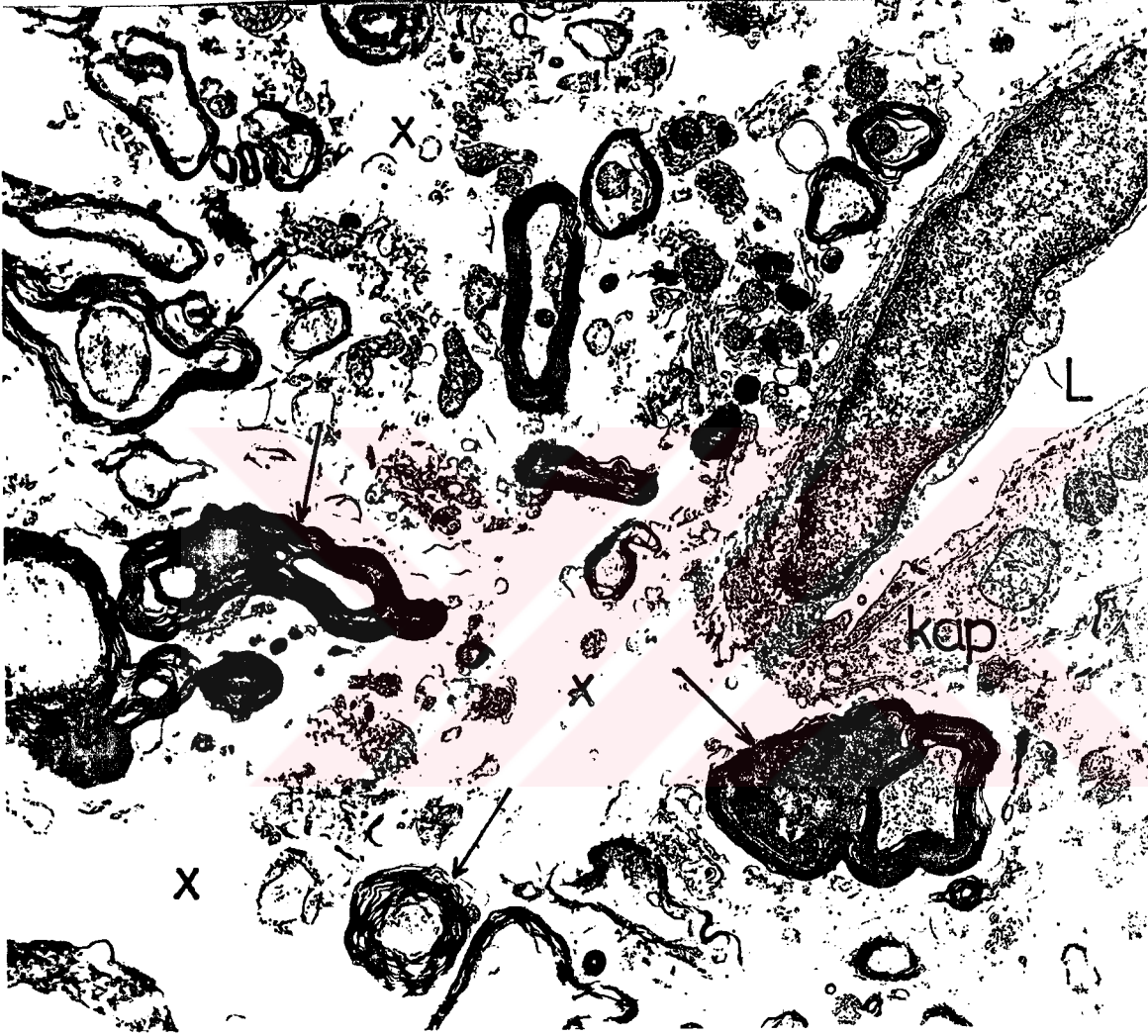
liflerinde hafif aksonal organel değişikleri izlenmekle birlikte akson yapısı genelde sham opere gruplarına benzerdi. Myelin kılıfta fokal myelin bozuklukları belirgindi. Kapiller damarlarda endotel hücreleri ve bazal lamina normal olarak değerlendirildi.



Şekil 10: Kontrol Grubu. Gri cevherde normal yapıda nöron (N) ve glia hücresi (G) görülmektedir. Nöron çekirdeği (Ç), mitokondrion (m), endoplazmik retikulum (er), myelinli sinir lifler (oklar), sinapslar (ok başları) (x 8100).



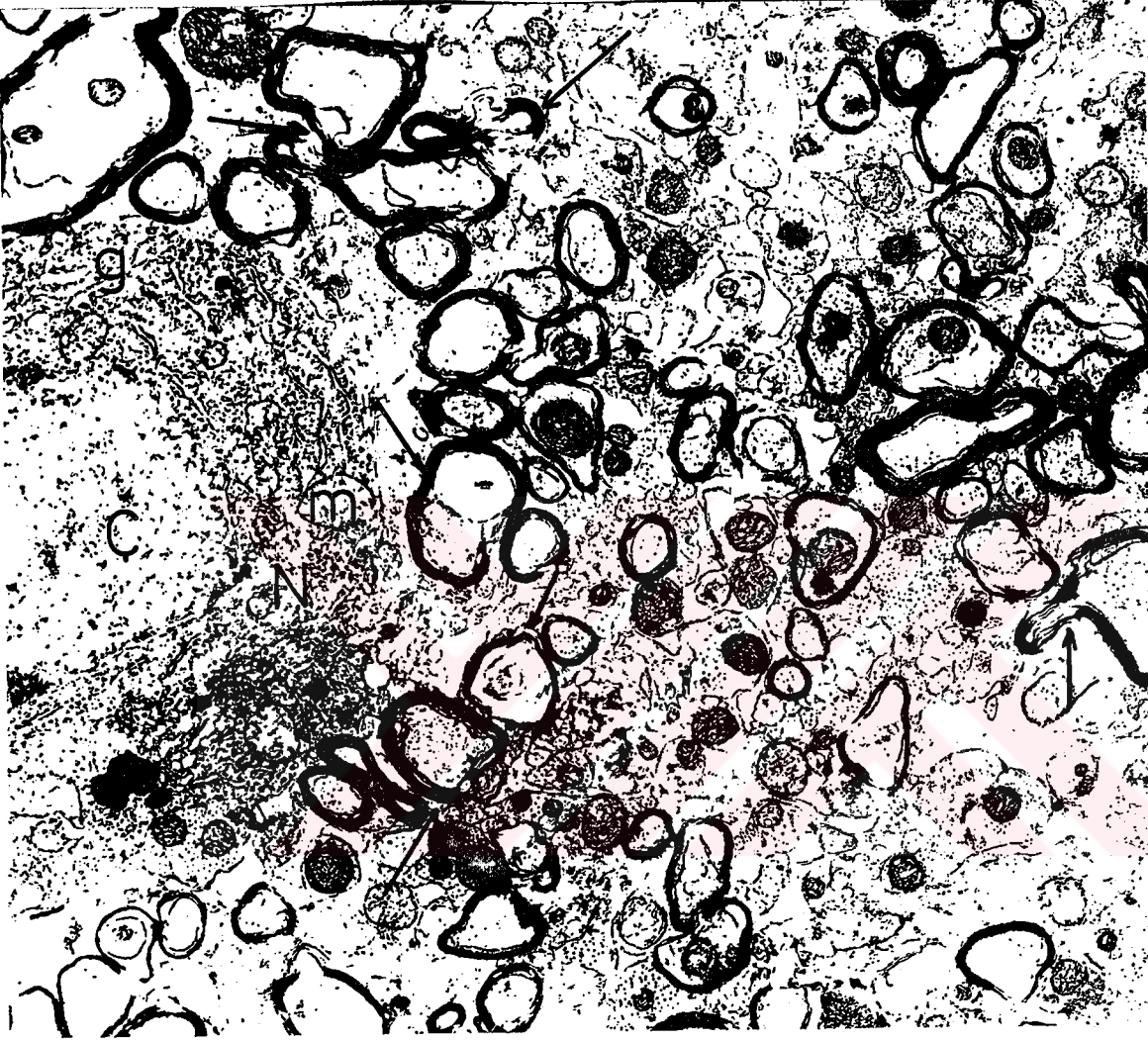
Şekil 11: 2. Grup Erken Dönem. Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinin (oklar) bazılarında hafif myelin kılıf bozuklukları izlenmekle birlikte, sinir lifleri, kapiller damar (kap) yapıları normal görünümündedir. Akson (a), eritrosit (e) (x 6300).



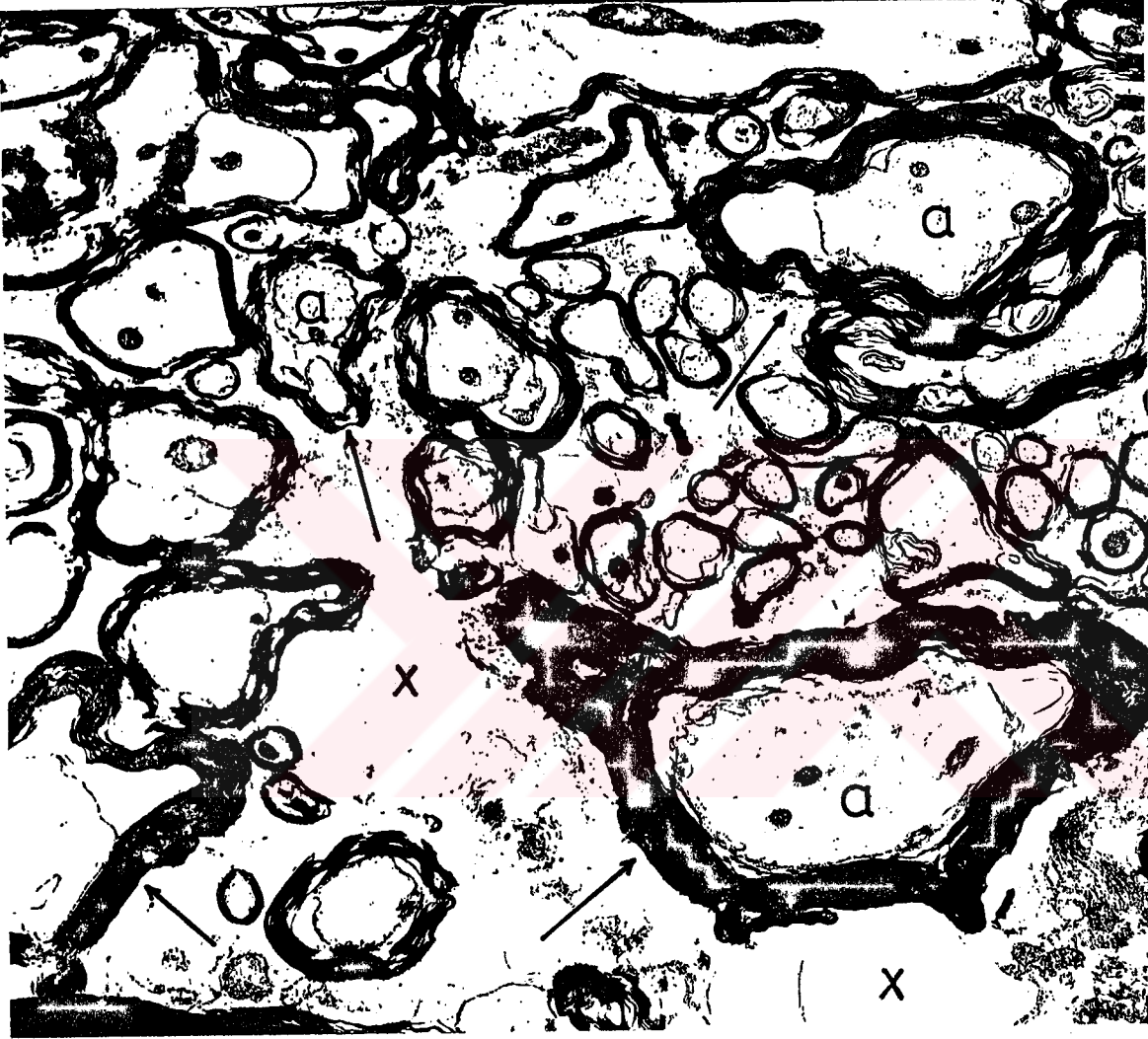
Şekil 12: 3. Grup Erken Dönem. Myelinli sinir liflerinde akson ve myelin kılıf (oklar) hasarları görülmektedir. Sinir liflerinin aralarında ödem alanlarını simgeleyen geniş boşluklar (x) izlenmektedir. Kapiller damarlar (kap), lümen (L) (x 6300).



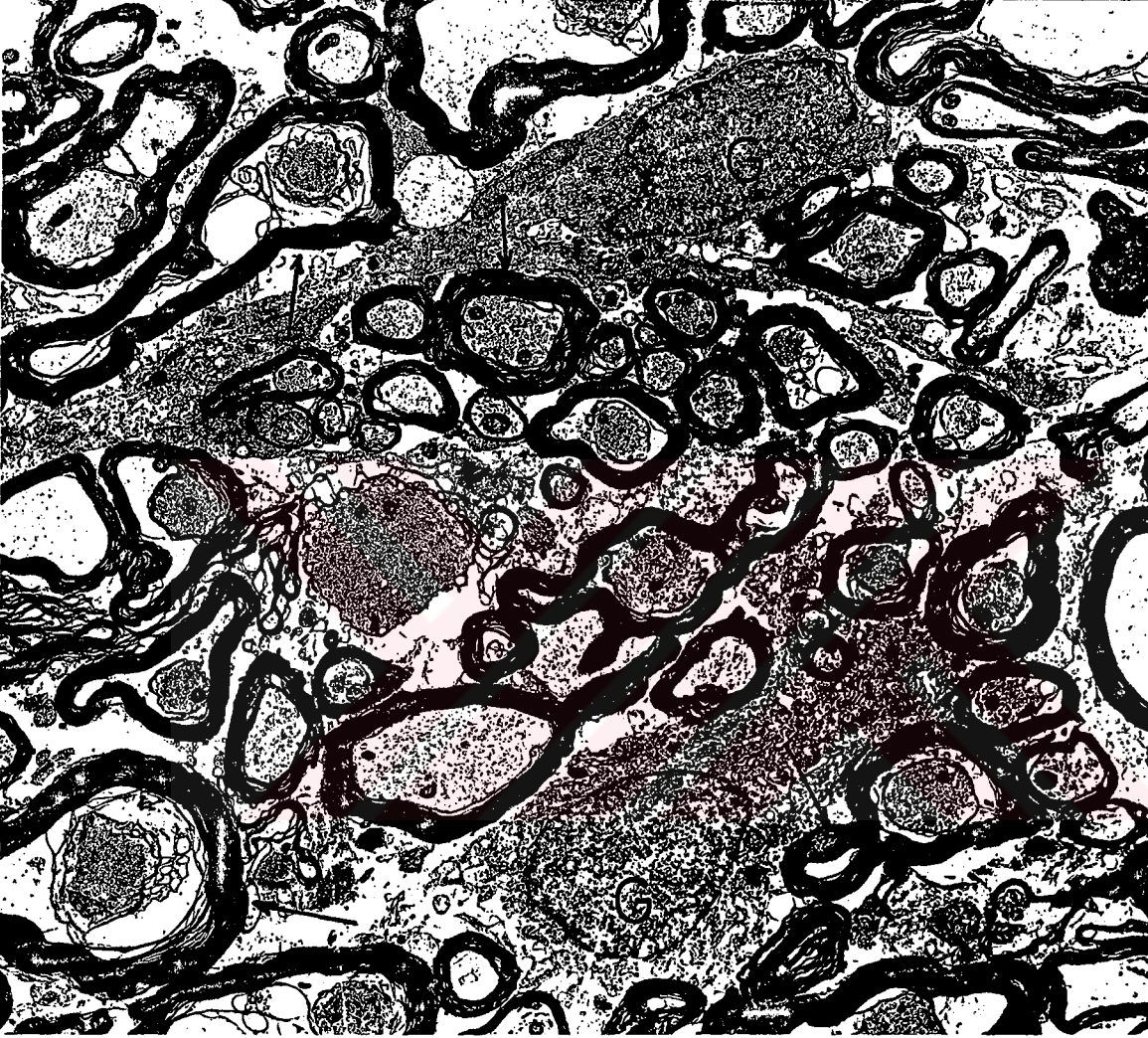
Şekil 13: 3. Grup Erken Dönem. Beyaz cevherde glia hücrelerinin (G) çekirdeklerinde (Ç) kromatin yoğunlaşması, sitoplazmada mitokondrionlarda (m) genişleme ve kristalarda harabiyet izlenmektedir. Myelinli sinir liflerinde myelin kılıf hasarları görülmektedir (oklar) (x 6300).



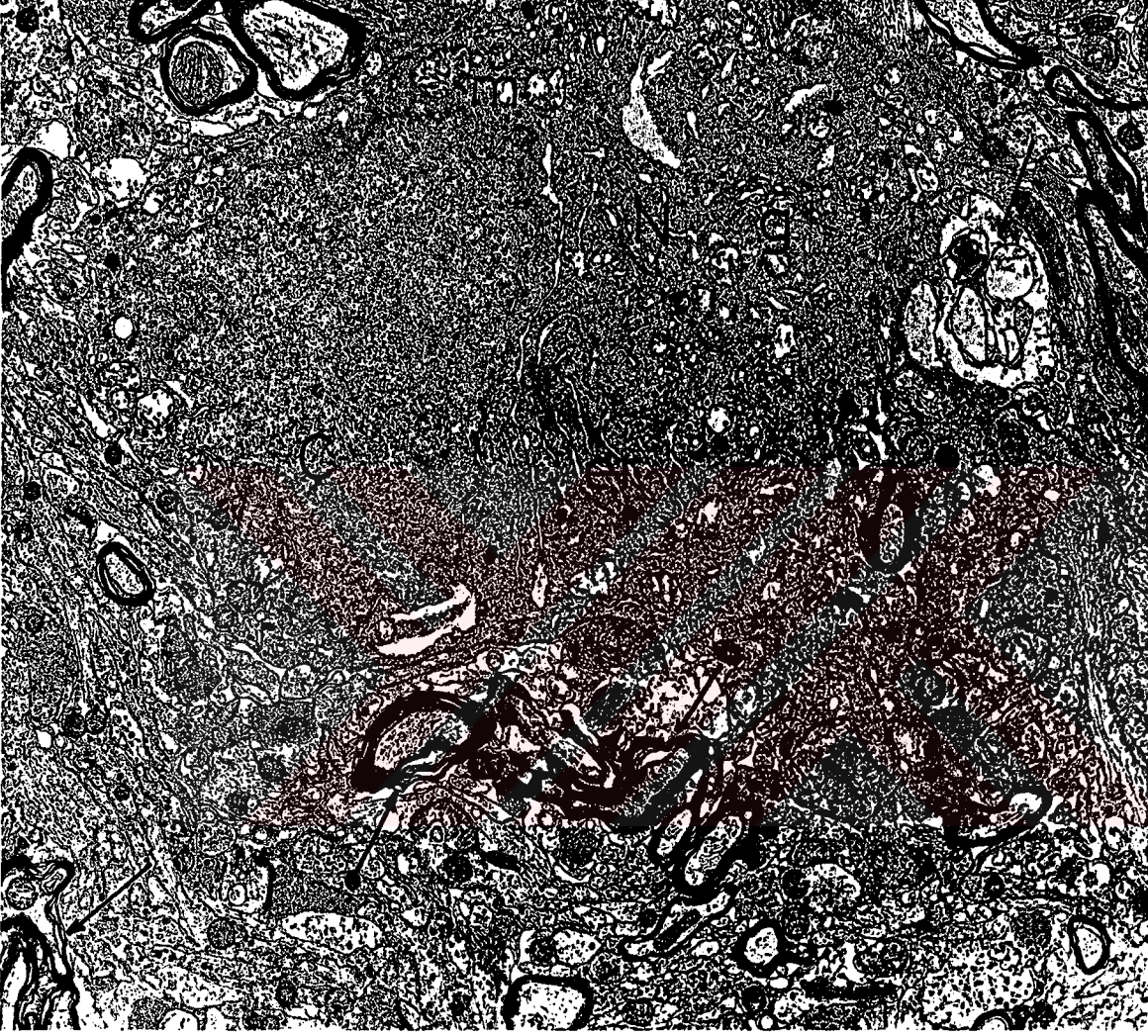
Şekil 14: 4. Grup Erken Dönem. Nöron (N) sitoplazmasında mitokondrionlarda (m) şişme ve harabiyet, golgi sisternalarında (g) genişleme izlenmektedir. Myelinli sinir liflerinde akson ve myelin kılıf hasarları dikkat çekmektedir (oklar). Çekirdek (Ç) (x 6300).



Şekil 15: 4. Grup Erken Dönem. Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinde akson (a) ve myelin kılıf hasarları izlenmektedir (oklar). Sinir liflerinin aralarında ödem alanlarını simgeleyen geniş boşluklar (x) görülmektedir (x 5000).



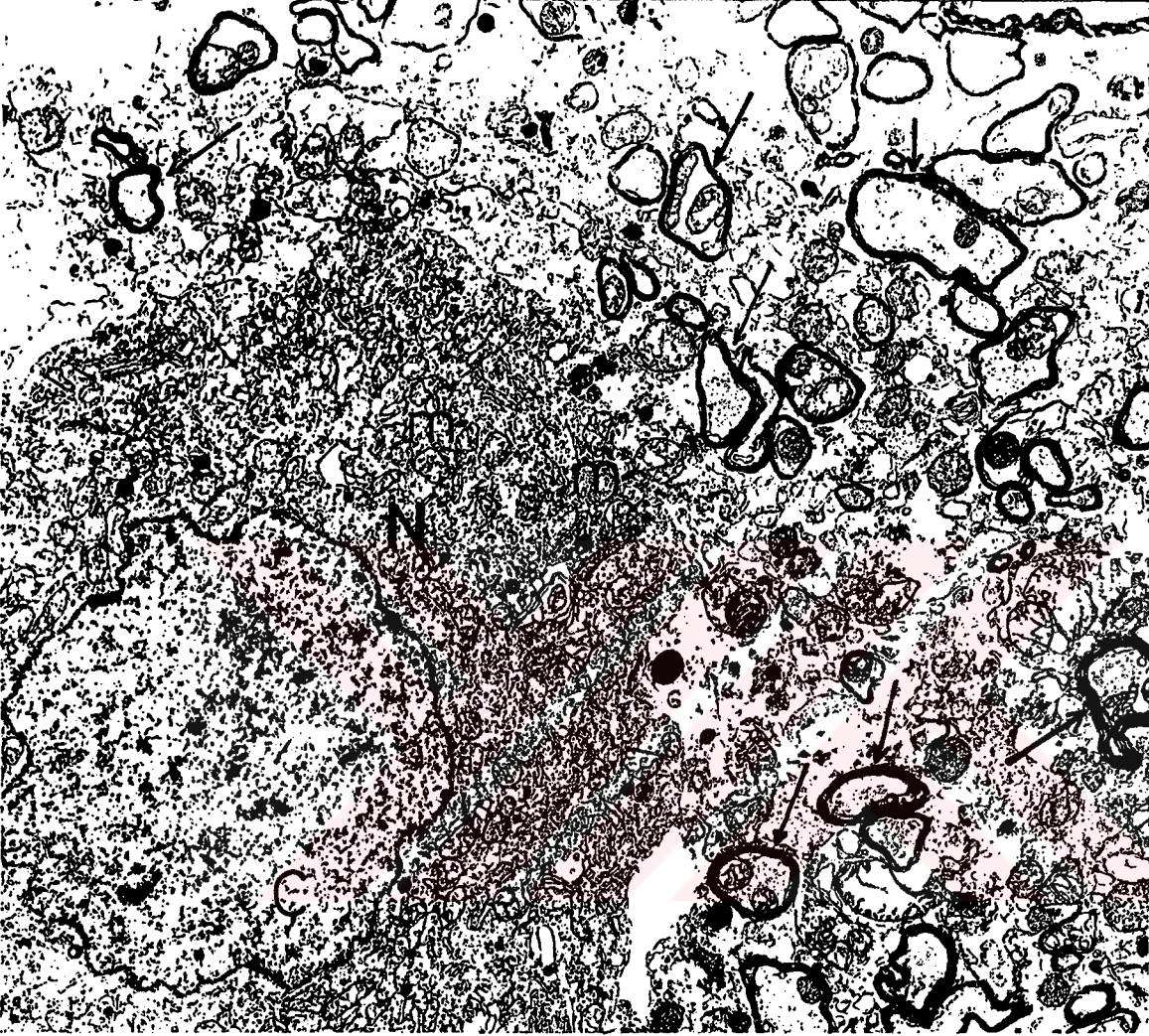
Şekil 16: 2. Grup Geç Dönem. Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinin bazılarında hafif myelin kılıf bozulmaları izlenmektedir (oklar). Glia hücreleri (G) normal görünümündedir (x 4000).



Şekil 17: 3. Grup Geç Dönem. Gri cevherde nöron (N) çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı, mitokondrion (m), endoplazmik retikulum (er) ve golgi (g) sisternalarında genişlemeler görülmektedir. Myelinli sinir liflerinde çeşitli derecelerde myelin kılıf hasarı izlenmektedir (oklar) (x 3150).



Şekil 18: 3. Grup Geç Dönem. Beyaz cevherde myelinli sinir liflerinde akson (a) ve myelin kılıf hasarları (oklar) izlenmektedir (x 4000).



Şekil 19: 4. Grup Geç Dönem. Nöron (N) sitoplazmasında hafif mitokondrion (m) genişlemeleri izlenmekle beraber, çekirdek (Ç) ve diğer organeller nispeten normal yapıda izlenmektedir. Myelinli sinir liflerinde akson yapısı normale yakın olmak ile birlikte myelin kılıflarda hafif yapısal değişiklikler (oklar) görülmektedir (x 3150)

4.3 SOD ve $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz SONUÇLARI

4 grubun SOD ve $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz sonuçlarının ortalamaları Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 3: SOD ortalama değerleri (U/g protein)

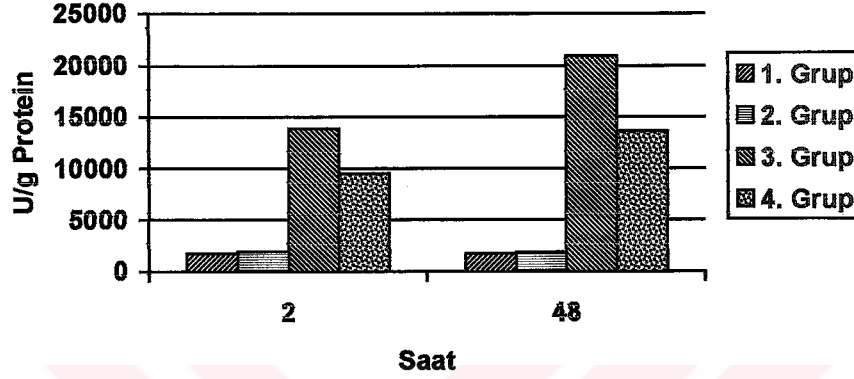
	ERKEN EVRE ORTALAMASI	GEÇ EVRE ORTALAMASI
1. GRUP	1750 ± 20.60	1750 ± 20.60
2. GRUP	1900 ± 25.23	1850 ± 20.50
3. GRUP	13885 ± 60.65	20860 ± 70.43
4. GRUP	9503 ± 40.57	13636 ± 62.45

Tablo 4: $\text{Na}^+\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz ortalama değerleri (nmol P_i / mg protein / saat)

	ERKEN EVRE ORTALAMASI	GEÇ EVRE ORTALAMASI
1. GRUP	385 ± 5.24	385 ± 5.24
2. GRUP	370 ± 3.27	380 ± 3.70
3. GRUP	170 ± 2.57	110 ± 1.56
4. GRUP	260 ± 3.26	310 ± 4.47

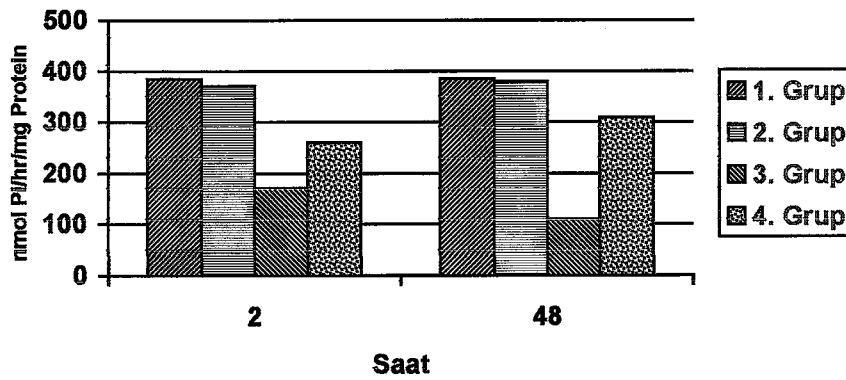
SOD aktivitesinde tablo 5’de görüldüğü gibi 1. ve 2. gruplar arasında anlamlı bir fark yoktur ($P>0.05$), 3. gruplarda önemli bir aktivite artışı dikkati çekmektedir ($P<0.05$), ve 4. gruplarda 3. gruplara kıyasla aktivitede anlamlı bir azalma görülmektedir ($P<0.05$).

Tablo 5: SOD Aktivitesi



Tablo 6’da görüldüğü gibi 1. ve 2. grupların $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz aktiviteleri arasında anlamlı bir fark yoktur ($P>0.05$), 3. gruplarda önemli bir azalma ($P<0.05$), ve 4. gruplarda ise 3. gruplara kıyasla önemli bir aktivite artışı görülmektedir ($P<0.05$).

Tablo 6: $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz Aktiviteleri



5. TARTIŞMA

Spinal kord travmaları çeşitli ülkelerde % 2-4 sıklıkla görülmekte, teknolojinin ilerlemesi ve motorlu araçların çoğalmasıyla gittikçe artan sıklıkta karşımıza çıkmaktadır¹. Spinal kordun rejenerasyon kabiliyeti olmadığından omurilik zedelenmesi geçiren hastalarda kalıcı sakatlıklar oluşur. Total omurilik lezyonu çok büyük iş gücü kaybı ve bakım masraflarına neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan tüm araştırmalara rağmen total omurilik lezyonunda MPD'nun bilinen etkileri dışında fonksiyonu yerine getirmede yararlı olabilecek bir tedavi yöntemi yoktur²⁰.

İkincil omurilik zedelenmesi, birincil zedelenmenin başlattığı ve bunun sonucu saatler içinde, metabolik ve biokimyasal nedenlerle oluşan hasardır^{11,12}. İkincil zedelenme mekanizmalarından bugün üzerinde en fazla durulan vasküler değişiklikler, hücre içi Ca^{+2} artması, serbest radikal teorisi, endojen opioidler ve enflamatuvar değişiklik teorileridir^{13,14,15,16,23,24,34,40}. Bu teoriler kısmen iç içedir. Dokuda serbest radikallerin açığa çıkması ve Ca^{+2} artması aynı zamanda vazospazm ile omurilik kan akımını da bozmaktadır². Birçok deneysel travmada mikrosirkülasyonda mekanik bir hasar meydana geldiği, perfüzyonun bozulduğu ve bununda progresif omurilik iskemisine yol açarak ikincil hasara neden olduğu saptanmıştır^{13,14,15,16}. OKA'nın yaklaşık % 50 civarında azalması sonucu tehlikeli iskemik düzey ortaya çıkar. Bu düşme gri cevherde daha fazla olur. Sonuçta doku oksijenasyonu azalır ve omurilikte metabolik artıklar birikir. Hipoperfüzyonun ikincil sonucu olarak ödem oluşur^{2,23}.

İlk nöral hücre öldüğünde yaşayan diğer nöronlara saldıran toksinler salar. Bu toksinlerin bazıları SR adı verilen kaçak oksijen molekülleridir. SOD Süperokiti hidrojen perokside (H_2O_2) çevirir. Fe ve diğer katalistler ise H_2O_2 'yi hidroksil radikale (Ho) çevirirler. Bu radikaller lipidlerle, proteinlerle ve nükleik asitlerle reaksiyona girerler ve daha çok serbest radikal açığa çıkaran lipid peroksidleri yaparlar^{2,23}. Normal hücrelerde doğal olarak oluşan antioksidan bileşikler bu zararlı etkileri kontrol eder, fakat patolojik durumlarda örneğin omurilik yaralanmasında aşırı serbest radikal üretimi bu antioksidan kapasiteyi aşar. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna ve bunu izleyen hücre membranlarının çözülmesine yol açar^{24,25}. Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederler. Travma bu maddeleri azaltır²⁴. Çalışmamızda SOD değerleri 3. grupta artma ve tedavi gruplarında ise anlamlı azalma gösterdi. Naloksan tedavisinin SR açığa çıkmasını engellediği ve bunun spinal zedelenmedeki muhtemel etki mekanizmalarından biri olduğu sonucunu elde ettik.

Travmanın hemen sonrasında olan biokimyasal fenomenler lezyon seviyesinde iletimin durmasına neden olur. Elektrolit konsantrasyonundaki anormallikler ile gradient değişikliklerinin bu iletim durmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Na^{+} 'ın hücre içine girmesi ve hücre dışında K^{+} konsantrasyonunun artmasının aksonal iletimi durdurduğu gösterilmiştir²³. Kalsiyum hücre için çok destrüktif bir iyondur. Kalsiyumun hem Na^{+} , K^{+} akımında önemli rolü olduğu, hem de bazı nörotransmitterlerin depolanması ve salınmasında rolü olduğu saptanmıştır. Hücre dışı Ca^{+2} aktivitesi, hücre içi aktivitenin 1000 katı kadardır. Bu ilişki omurilik travmasında belirgin şekilde bozulur. Hücre içine giren Ca^{+2} fosfolipaz, proteaz ve fosfatazları aktive eder^{2,23}. Fosfolipazlar membranın yapısını bozar, yağ asitlerini ve araşidonik asidi serbestleştirir. Siklooksijenaz ve lipooksijenazlar bu araşidonik asidi prostaglandin ve lökotrienlere çevirir. Bunlarda Na^{+} geçirgenliğinde artmaya neden olur^{2,23}. Ca^{+2} ile aktive olan fosfotazlarda nitrik oksit sentetaz (NOS) gibi enzimleri aktive eder. NOS makrofaj, mikroglia hücrelerine ilave olarak nöron, astrosit ve endotel hücrelerini de içeren bir çok dokudan salgılanır^{3,67}. Mikroglia hücrelerinin SSS'nin immunkomponent hücreleri olduğu ve uygun stimulasyon ile iNOS salgılama yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir⁶⁸. iNOS veya NOS aktive edildiği zaman ortaya çıkan aşırı NO sellüler homeostazı bozar, Na^{+} geçirgenliğinde artmaya neden olur³. Endotelyal NOS tarafından açığa çıkartılan NO ise bölgesel serebral kan akımının devamını sağlayarak beyni koruyucu etki gösterir⁴. Samdani beyni iskemik zedelenmeden korumak için, bölgesel kan akımını etkilemeyen selektif iNOS inhibitörlerinin geliştirilmesi gerektiği üzerinde durmuştur⁴.

NO sellüler hemostazın korunmasında önemli rol oynayan küçük bir moleküldür^{5,69}. NO, nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinukleotid (FAD) ve NOS varlığında L-Arginin ve oksijenden sentez edilir⁷⁰. Vasküler endotelyal ve nöral hücreler NOS varlığında NO salgılama yeteneğine sahiptirler. NOS izoformlarının düzenlenmesinden tamamıyla hücre içi Ca^{+2} sorumludur⁷¹. Xie ve ark. tanımlanan diğer NOS izoformlarının kalsiyum-kalmodilin sistemine duyarlı olmadığını bildirilmiştir^{72,73}. NOS'un bu formu indüklenabilir (inducible) NOS (iNOS) olarak isimlendirilmiştir. Çünkü sadece inflamasyon gibi patolojik durumlarda açığa çıkar. Bu aşırı miktarda NO sentezlenmesine neden olur. Stimulasyon olduğu zaman vasküler düz kas, endotelyal ve glial hücreler iNOS sentezleme yeteneğine sahiptirler. iNOS açığa çıkması serebral iskemide, eksperimental allerjik ensefalitde, sepsisteki hastalarda gelişen kardiovasküler yetmezlikde ve multipl sklerozda gösterilmiştir^{74,75,76,77}. Hepsinde patolojik sürecin gelişmesinde iNOS'un önemli rol oynadığı düşünülmektedir. iNOS'un aktive olması SR'lerin açığa çıkmasına ve lipid peroksidasyonuna

neden olur^{78,79}. Lipid peroksidasyonu araşidonik asid döngüsünün ve proteinkinaz C sisteminin aktivasyonuna neden olur^{80,81}. Ayrıca NO, tek başına peroksinitrit ve hidroksil radikalleri gibi ikincil oksidanlar üzerinden sitotoksik rol oynar. Peroksinitrit tirozinin patolojik nitrasyonuna neden olur. Böylece nitrotirosin oksidatif zedelenmenin gösterilmesinde indikatör olarak kullanılabilir^{79,82,83}.

SSS'de enflamasyon artışı olduğu durumlarda BOS endorfin seviyelerinin artışı ve iNOS'un aktivitesinde de paralel olarak artma olduğu açıklanmıştır^{2,23}. Spinal travma sonrası plazma beta-endorfin düzeylerinde de artış olur. Faden ve arkadaşları insan omurilik yaralanmasında en çok etkilenen opioidin dinorfin olduğunu ve dinorfin düzeyinin travmanın şiddeti ile direkt ilişkili olduğunu bildirmiştir³⁴. Aynı çalışmada μ -altıtipi opiat reseptörü blokeri olan naloksanı yüksek dozda kullanarak, zedelenme modelinde omurilikte önemli düzelme kaydedildiğini ilk olarak bildirmiştir⁶. iNOS immun reaktivitesinin ve enzimatik aktivitesinin nörotoksik dozda (20 nmol) intratekal dinorfin A verilmesinden sonra 4. saatte artışı ve bunun 24-48 saat sürdüğü göstermiştir³¹. Bir diğer çalışmada ise selektif iNOS inhibitörü olan aminoguanidinin intratekal dynorfin A uygulanmasından 10 dakika önce verildiği olgularda, nörolojik bulgularda anlamlı bir düzelme tespit edilmiştir⁸⁴. Aminoguanidin, ventral spinal kord'ta yapılan incelemede intratekal dinorfin A verilmesinden 4 saat sonra iNOS aktivitesini anlamlı şekilde antagonize etmiştir⁸⁴. Bizim çalışmamızda da iNOS aktivitesi tedavi gruplarında nisbeten azalma gösterdi ve naloksanın muhtemel etki mekanizmalardan biri olduğu ve bunun sonucu faydalı etkisinin olabileceği sonucunu elde ettik. NO'nın vasküler seviyede ılımlı üretilmesi nöroprotektif etkiye sahip iken, sellüler düzeyde aşırı üretilmesi ise nörotoksiteye sebep olur⁸⁴.

Spinal travmada ortaya çıkan iskemi anaerobik glikolizise neden olur. Dokuda hipoksi olması yüksek enerji fosfatlarının hemen azalmasına ve laktik asidozise yol açar. Kritik bir membran enzimi olan $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPaz enzimi travmadan 5 dakika sonra azalır². Fosfolipidlere bağımlı hücre membran duvarı enzimi olan $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın membran stabilizasyonunun korunmasında, hücrenin iyonik, osmotik dengesinde ve aktif transportunda önemli bir rol oynar. Bundan dolayı ATPaz aktivitesi hasarlanan dokuda azalır. Bu enzim serbest radikallere ve lipid peroksidasyonuna hassas bir enzimdir⁷. Spinal kord travmasından sonra intraperitoneal naloksan uygulanmasının $\text{Na}^+ - \text{K}^+ / \text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltarak, faydalı etkisinin bulunduğu bildirilmiştir⁷. Bizim çalışmamızda da ATPaz aktivitesi 3. gruplarda önemli azalma gösterdi, tedavi gruplarında ise dikkate değer bir artma oldu ve literatür ile uyumlu bulgular elde edildi.

Spinal travmadan sonra geri dönüşümlü bir kommosyo ve ilk saatler içinde hemorajik nekroza ilerleyen bir kontüzyon olur. Sinir liflerinde kopmalar ve ödem görülür. Hasta travmadan hemen sonra paraplejik bile olsa bu evrede omurilik histolojik olarak normal görülebilir^{2,23}. Spinal travmadan sonra 15 dakika içinde gri cevherde peteşiyel kanamalar, beyaz cevherde ödem olur. İkinci saat içerisinde gri cevher kanamaları artar, 4. saat içerisinde çok sayıda şişmiş akson silindirleri oluşur⁴³. Klinik bulgulara bağlı kalmaksızın 6.güne kadar kötüleşme devam eder ve ciddi bir nekroz oluşur. EM çalışmalarında ise 5.dakikada aksonlar normal iken gri cevherdeki venüller eritrositlerle şişerler. 15-30. dakıda da eritrositler kapiller ile venüllerin etrafına ekstrasvaze olurlar. 4.saatte myelin kılıflar yırtılır, aksonlar dejenere olur ve iskemik endotel zedelenmesi gelişir⁴⁴. Ödem çevreye yayılır ve 24-48 saatte özellikle hemorajilerin olduğu bölgelerde nekroz oluşur. Hücresel olarak polimorf nüveli lökositlerin akut infiltrasyonu olur. Bunların yerini daha sonraki günlerde makrofajlar alır¹⁸. Çalışmamızda örneklerin EM incelemesinde, travma grubunda literatür ile uyumlu bulgular elde ettik. Tedavi grubunda ise hücre ultrastrüktürel yapısı 3. gruplara göre daha korumuş durumdaydı. Böylece spinal travmada naloksanın yararlı etkisinin bulunduğu, ultrastrüktürel olarakda desteklemiş oldu.

Naloksanın spinal kord travmasındaki faydalı etkisinin mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Yapılan çeşitli araştırmalarda naloksanın etkisi opiyat reseptörleri üzerine etkisine, opiyat benzeri peptitlerin etkisini antagonize etmesine, lizozomal membranı stabilize etmesine, cAMP'yi etkilemesine, proteolizizi inhibe etmesine, Ca^{+2} akımını değiştirmesine, antioksidan aktivitesine ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmesine bağlanmıştır^{7,8,9,10,134,35}. İldan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise Naloksanın Na^{+} ve K^{+}/Mg^{+2} ATPaz inaktivasyonunu ve lipid peroksidasyonunu azaltarak hücre membran stabilizasyonunu etkilediği ve bu etkisiyle faydalı etkisinin olduğu bildirilmiştir^{7,53}. Naloksanın posttravmatik kan akımını düzelttiği ve klinik olarak spinal kord travmasında iyileşmeye neden olduğu da rapor edilmiştir^{8,9,10,17,34}. Bu bulgu naloksanın post travmatik hipotansiyon yapıcı etkisi ile ters düşmektedir^{8,9,17}. Opiyat reseptör antogonisti naloksanın spinal kord travmasını tedavisindeki faydalı etkilerine yönelik bu sonuçlara rağmen, bazı yayınlarda etkisiz olduğu sonucuna da varılmıştır⁴⁷. Sonuç olarak opiyat reseptör blokajının ikincil zedelenme üzerindeki etkisi komplike ve tartışmalıdır. Çalışmamızda spinal kord travmasından sonra intraperitoneal naloksan uygulanmasının $Na^{+}-K^{+}/Mg^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltarak, iNOS aktivasyonunu azaltarak ve SR'lerin açığa çıkmasını engelleyerek faydalı etkisinin bulunduğu sonucunu elde ettik ve bunu da ultrastrüktürel olarak gösterdik. Endorfinlerin travmatik kord

lezyonlarında enflamasyondan ve ikincil hasardan sorumlu alan faktörlerden biri olduğu, aynı zamanda naloksanın spinal kordu kısmen ikincil hasardan koruduğu sonucu elde edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneysel spinal kord yaralanmasında naloksan uygulanması sonrası elde ettiğimiz sonuçlar şu şekilde sıralanabilir.

1- Naloksan tedavisinin SR'lerin açığa çıkmasını engellediği ve bunun spinal zedelenmedeki yararının muhtemel etki mekanizmalarından biri olabileceği sonucu elde edildi.

2- Çalışmamızda iNOS aktivitesi tedavi gruplarında nisbeten azalma gösterdi ve bunun naloksanın, omuriliği ikincil hasardan korumada muhtemel etki mekanizmalardan biri olduğu sonucu elde edildi.

3- Spinal kord travmasından sonra intraperitoneal naloksan uygulanmasının Na^+ - $\text{K}^+/\text{Mg}^{+2}$ ATPaz'ın inaktivasyonunu azaltarak, omuriliği ikincil hasardan korumada faydalı etkisinin olabileceği sonucu elde edildi.

4- Çalışmamızda örneklerin EM incelemesinde, tedavi grubunda hücre ultrastrüktürel yapısı 3. gruplara göre daha korumuş durumdaydı. Böylece spinal travma kontüzyon modelinde naloksanın yararlı etkisinin bulunduğu, ultrastrüktürel olarak desteklemiş oldu.

5- Endorfinlerin travmatik kord lezyonlarında enflamasyondan ve ikincil hasardan sorumlu alan faktörlerden biri olduğu, aynı zamanda naloksanın spinal kordu kısmen ikincil hasardan koruduğu sonucu elde edildi.

Spinal kordun yenilenme kabiliyeti olmadığından, omurilik zedelenmesi geçiren hastalarda kalıcı sakatlıklar oluşur. Total omurilik lezyonu çok büyük iş gücü kaybı ve bakım masraflarına neden olmaktadır. Kord travmasının erken döneminde meydana gelen ilerleyici lezyon sürecinde yer alan olaylar henüz tamamen bilinmemektedir. Son yıllarda yapılan tüm araştırmalara rağmen total omurilik lezyonunda MPD'un olası etkisi dışında işlevi yerine getirecek bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Omurilik zedelenmesinde, birincil hasardan sonra gelişen ikincil hasardan omuriliği korunmak, kalıcı sakatlıkların ortaya çıkmasını önlemek için tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine ve bu konuda yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

7.KAYNAKLAR

1. Kraus JF, Franti CE, Riggins RS. Incidence of Traumatic Spinal Cord Lesions. *J Chronis Dis*, 1975; 28: 471-492.
2. İplikçioğlu C. Omurilik Yaralanmasının Fizyopatolojisi. *Omurilik ve Omurga Cerrahisi*. Zileli M, Özer F. 1.Baskı, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, 1997: 459-465.
3. Nathan C, Xie QW. Nitric Oxide Synthases: Roles, Tolls, and Controls. *Cell*, 1994; 78:915-918.
4. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric Oxide Synthase in Models of Focal Ischemia. *Stroke*, 1997; 28:1283-1288.
5. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; 43:109-142.
6. Faden A, Jajobs T, Holaday J. Opiate Antagonist Improves Neurologic Recovery After Spinal Injury. *Science*, 1981; 211:493-494.
7. İldan F, Polat S, Öner A, İsbir T, Çetinalp E, Kaya M, Karadayı A. Effects of Naloxone on Sodium and Potassium Activated and Magnesium Dependent Adenosine –5^I- Triphosphatase Activity and Lipid Peroxidation and Early Ultrastructural Findings After Experimental Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*, 1995; 36:797-805.
8. Faden A, Jajobst T, Holaday J. Endorphins in Experimental Spinal Injury. Therapeutic Effect of Naloxone. *Ann Neurol*, 1981; 10:326-332.
9. Flamm E, Young W, Demopoulos H. Experimental Spinal Cord Injury Treatment With Naloxone. *Neurosurgery*, 1982; 10:227-231.
10. Holaday J, Faden A. Naloxone Acts at Central Opiate Receptors to Reverse Hypotension, Hypothermia and Hypoventilation in Spinal Shock. *Brain Res*, 1980; 189:245-300.
11. Allen AR. Surgery of Experimental Lesion of Spinal Cord Equivalent to Crush Injury of fracture Dislocation of Spinal Column. *Jama*, 1941; 57:878-880.
12. Nemeck S. Morphological Evidens of Microsirculatory Disturbences in Experimental Spinal Cord Trauma. *Adv Neurol*. 1978; 20:395-405.
13. Bullock R, Fujisawa H. The Role of Glutamate Antagonists for the Treatment of CNS Injury. *J Neurotrauma (Supp)*, 1992; 9:443-462.
14. Ducker TB, Kindt GW, Kempe LG. Pathological Findings in Acute Experimatal Spinal Cord Trauma. *J Neurosurg*, 1971; 35:700-708.
15. Fehlings MG, Tator CH, Linden RD. The Effect of Nimodipine and Dextran on Axonal Function and Blood Flow Following Experimental Spinal Cord Injury. *J Neurosurg*, 1989; 71:403-416.
16. Hall ED, Wolf DL, Braughle JM, Kia T. Effects of a Single Large Dose of Sodium Metylprednisolone Succinate on Experimental Pastraumatic Spinal Cord İschemia Dose Response and Time-action Analysis. *J Neurosurg*, 1984; 61:124-130.
17. Young W, Flamm ES, Demopoulos HB. Effect of Naloxone on Pastraumatic İschemia in Experimental Spinal Contusion. *J Neurosurg*, 1981; 55:209-219.
18. Guha A, Tator CH, Piper I. Increase in Rat Spinal Cor Impact Injuries. Part I. Changes in the Myelin

Sheath During the Initial Five Weeks. *J Neurol Sci*, **1983**; 58:335-349.

19. **Osterholm JL, Mathews GJ.** Altered Norepinephrine Metabolism Follow Experimental Spinal Cord Trauma. *Adv Neurol*, **1978**; 20:395-405

20. **Tator CH, Fehlings MG.** Review of Secondary Injury Theory of Acute Spinal Cord Trauma With Emphasis of Vascular Mechanisms. *J Neurosurg*. **1991**; 75:15-26.

21. **Benveniste H, Dreger J, Schousboe A.** Elevation of the Extracellular Concentration of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *J Neurochem*, **1984**; 43:1369-1374.

22. **Faden A, Simon RA.** Potential Role for Excitotoxins in the Pathophysiology of Spinal Cord Injury. *Ann Neurol*, **1988**; 23:623-626.

23. **Zileli M, Özer F.** Omurilik Yaralanmasının Farmakolojik Tedavisi. Zileli M. *Omurilik ve Omurga Cerrahisi*. 1.Baskı, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık, **1997**: 466-478.

24. **Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK.** Biochemistry and Pharmacology of Lipid Antioxidant in Acute Brain and Spinal Cord Injury. *J Neuro Trauma*, **1992**; 9 (1): 165-172.

25. **Demopoulos H, Flamm E, Pietronigro D.** The Free Radical Pathology and the Microcirculation in the Major Central Nervous System Disorders. *Acta Physiol Scand*, **1980**; 492 (3):91-119.

26. **Brocken M, Shepard M, Collins N.** A Randomised, Controlled Trial of Methylprednisolone or Naloxone in the Treatment of Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med*. **1990**; 322:1405-1411.

27. **Fridovich I.** Superoxide Dismutase. *Ann Rev Biochem*, **1975**; 44:147.

28. **McCord JM, Fridovich I.** Superoxide Dismutase: An Enzymic Function For Erythrocyte. *The Journal of Biological Chemistry*, **1969**; 22:6049-55.

29. **Arese P, De Flora A.** Pathophysiology of Hemolysis Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Deficiency Seminars in Hematology*, **1990**;27: 1- 40.

30. **Alen IG, Louis TM, Kopelman AE.** Brain Prostaglandin E2 and F2alpha Following Neonatal Asphyxia in the Guinea Pig. *Biol*, **1982**;42: 8 - 14.

31. **Hu WH, Qiang WA, Li F, Liu N, Wang GQ, Wang HY, Wan XS, Liao WH, Liu JS, Jen MF.** Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthases after Dynorphin-Induced Spinal Cord Injury. *J Chem Neuroanat*, **2000**; 17: 183-197.

32. **Banik N, Hogan E, Hsu C.** The Multimolecular cascade of Spinal Cord Injury Studies on Prostanoids, Calcium, and Proteinases. *Neurochem Pathol*, **1987**; 7:57-77.

33. **Puniak M, Freeman G, Agresta C.** Comparison of a Serotonin Antagonist, Opioid Antagonist, and TRH Analog for the Acute Treatment of Experimental Spinal Trauma. *J Neurotrauma*, **1991**; 8:193-203.

34. **Faden A, Jajobs T, Holaday J.** Comparison of Early and Late Naloxone Treatment in Experimental Spinal Injury. *Neurology*, **1982**; 32:677-681.

35. **Naftchi NE, Gennaro J.** Prevention of Damage in Acute Spinal Cord Injury by Peptides and Pharmacologic Agent. *Peptides*, **1982**; 3:235-247.

36. **Pryor W, Stanley J, Blair E.** Autoxidation of Polyunsaturated Fatty Acids. II. A Suggested Mechanism for the Formation of TBA-reactive Materials From Prostaglandin-like Endoperoxides. *Lipids* **1976**; 370-379.

37. **Wallace M, Tator CH.** Failure of Blood Transfusion or Naloxone to Improve Clinical Recovery After Experimental Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*, **1986**; 19:489-494.

38. **Roitt Z, Brostoff J, Mole D.** *Cytokines Immunology*. 4th Ed, Berlin: Springer-Verlag, **1996**: 88-89.

39. **Asadullah K, Woicienchowsky C, Dücke W.** Immunodepression Following Neurosurgical Procedures. *Critical Care Medicine*, 1995; 23:1976-1982.
40. **Young W, Huang P, Kuive J.** Cellular, Ionic and Biomolecular Meshanisms of the Injury Process. In: Benzel E, Tator CH Eds. *Contemporary Menagement of Spinal Cord Injury*. American Association of Neurological Surgeon, New York: Semby Co; 1995: 27-42.
41. **Skou JC.** Further Investigations a Mg^{++} Na^{++} Activated Adenosine Triphosphatase Possibly Related to the Active Linked Transport of the Na^{+} , K^{+} Across the Membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1960; 42:23.
42. **Skou JC.** The Relationship of the (Na^{+} - K^{+}) Activited Enzyme System to Transport of Sodium and Potassium Across Cell. *Membrane Bioenergy*, 1972; 4:30.
43. **Ducker TB, Kindt GW, Kempe LG.** Pathological Findings in Acute Experimental Spinal Cord Trauma. *J Neurosurg* 1971; 35:700-708.
44. **Dohrmann GJ, Wagner FC, Bucy PC.** The Micro Vasculature in Transitory Traumatic Paraplegia. An Electron Microscopic Study in Monkey. *J Neurosurg*, 1971; 35:263-271.
45. **Dolan EJ, Tator CH.** The Effect af Blood Transfusion, Dopamine and Gamma Hydroxybutyrate on Posttraumatic Iskemia of the Spinal Cord. *J Neurosurg*, 1982; 56:350-358.
46. **Guha A, Tator CH, Piper I.** Increase in Rot Spinal Cord Blood Flow With the Calcium Channel Blocker Nimodipine. *J Neurosung*, 1985; 63:250-259.
47. **Zileli M, Ovül I, Dalbastı T.** The Effect of the Methyprednisolone, Dimethyl Sulphoxide and naloxone in Experimental Spinal Cord Injury in Rats. *Neuro Res*, 1988; 60:232-235.
48. **Faden A, Jacobs T.** Effect of TRH Analogs on Neurologic Recovery After Experimental Spinal Trauma. *Neurology*, 1985; 35:1331-1334.
49. **Young W.** The Post-Injury Response in Trauma and Ischemia Seconder Injury of Protective Mechanisms?. *Cent Nerv Syst Trauma*, 1987; 4:27-51.
50. **Guha A, Tator CH, Smith CR.** Improvement in Post Traumatic Spinal Cord Blood-flow With a Combination of a Calcium Channel Blocker and a Vasopressor. *J Trauma*, 1987; 29:1440-1448.
51. **Hady RW, Brodkey JS, Richards DE.** Effect of Systemic Hypertension on Compression Block of Spinal Cord. *Surg Forum*, 1972; 23:434-435.
52. **Bracken MB, Shepord MJ, Collins WF.** Methylprednisolone or Naloxone Treatment After Acute Spinal Cord Injury. 1-Year Follow-up Data. *J Neurosurg*, 1992; 76:23-31.
53. **İldan F, Polat S, Öner A, Isbir T, Çetinalp E, Kaya M, Karadayı A.** The Effect of the Treatment of High-dose Methylprednisolone on Na^{+} - K^{+} / Mg^{2+} ATPaz Activity and Lipid Peroxidation and Ultrastructural Findings Following Cerebral Contusion in Rat. *Surg Neurol*, 1995; 44:573-580.
54. **Enderson DK, Means ED, Waters TR.** Micro Vascular Perfusion and Metabolism in Injured Spinal Cord After Methylprednisolone Treatment. *J Neurosurg*, 1982; 56:106-113.
55. **Young W, Flamm ES.** Effect of High-Dose Corticosteroid Therapy on Blood Flow, Evoked Potentials, and Extracellular Calcium in Experimental Spinal Cord Injury. *J Neurosurg*, 1982; 57:617-673.
56. **Anderson DK, Saunders RD, Demediak P.** Lipid Hydrolysis and Peroxidation in Injured Spinal Cord After Methylprednisolone or Vitamin E and Selenium. *Cent Nerv Sys Trauma*, 1985; 2:257-267.
57. **Hall ED.** Effects of the 21-Amino Steroid of U74006F on Posttraumatic Spinal Cord. Ischemia in Cats. *J Neurosurg*, 1988; 68:462-465.
58. **Hall ED, Braughler JM, Mc Call JM.** Antioxidant Effect in Brain and Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*,

1992; 9(2):425-442.

59. **Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP.** GM-1 Ganglioside in Human Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma*, 1992; 9 (1):517-530.

60. **Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP.** Recovery of Motor Function After Spinal Cord Injury a Randomized Placebo-Controlled Trial With GM-1 Ganglioside. *N Eng J Med*, 1991; 324:1829-1838.

61. **Rivlin AS, Tator CH.** Effect of Duration of Acute Spinal Cord Compression in a New Acute Cord Injury in the Rat. *Surg Neurol*, 1978; 10:39-43.

62. **Reading HW, İsbir T.** Action of Lithium on ATPase in Transmitter Release From Rat İris. *Biochem Pharmacol*, 1979; 28: 3471-3477.

63. **Reading HW, İsbir T.** The Rol of Cation-activated ATPases in Transmitter Release From Rat İris. *Q J Exp Physiol*, 1980; 65: 105-116.

64. **Roth EF, Gilbert HS.** The Pyrogallol Assay for Superokside Dismutase: Absence of a Glutathione Artifact. *Anal Biochem*, 1984; 137: 52-53

65. **Millonig G.** Advantages of a Phosphate Buffer for OsO₄ Solutions and Fixation. *J App Physics*, 1961; 32:637

66. **Reynolds EA.** The Use of Lead Citrate at High PH as an Elelectron Opaque Stain in Electronmicroscopy. *J Cell Biol*, 1963; 17:208

67. **Murphy S, Simmons ML, Agullo L, Garcia A, Feinstein DL, Galea E, Reis DJ, Mincgolomb D, Schwartz JP.** Synthesis of Nitric Oxide in CNS Glial Cells. *Trends Neurosci*, 1993; 16: 323-328.

68. **Chao CC, Hu S, Molitor TW, Shaskan EG, Peterson PK.** Activated Microglia Mediate Neuronal Cell Injury Via a Nitric Oxide Mechanism. *J Immunol*, 1992; 149: 2341-2741.

69. **Nathan C.** Nitric Oxide as a Secretory Product of Mammalian cells. *J Faseb*, 1992; 6: 3051-3064.

70. **Marletta MA.** Approaches Toward Selective Inhibition of Nitric Oxide Synthase. *J Med Chem*, 1994; 37: 1899-1907.

71. **Sayama T, Suzuki S, Fukui M.** Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Rats Following Subarachnoid Hemorrhage. *Neurological Research*, 1998; 20: 79-84.

72. **Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Ding A, Troso T, Nathan C.** Cloning and Characterization of Inducible Nitric Oxide Synthase from Mouse Macrophages. *Science*, 1992; 256: 225-228.

73. **Xie QW, Kashiwabara Y, Nathan C.** Role of Transcription Factor NF- κ B/Rel in Induction of Nitric Oxide Synthase. *J Biol Chem*, 1994; 269: 4705-4708.

74. **Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME.** Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression in Brain Following Cerebral Ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1995; 15: 378-384.

75. **Zhao W, Tilton RG, Corbett JA, McDaniel ML, Misko TP, Williamson J, Cross AH, Hickey WF.** Experimental Allergic Encephalomyelitis in the Rat is Inhibited by Aminoguanidine, an Inhibitor of Nitric Oxide Synthase. *J Neuroimmunol*, 1996; 164: 123-133.

76. **Bagasra O, Michaels FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spitsin SV, Fu ZF, Tawadros R, Koprowski H.** Activation of the Inducible Form of Nitric Oxide Synthase in the Brains of Patients with Multiple Sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995; 92: 12041-12045.

77. **Sparrow JR.** Inducible Nitric Oxide Synthase in the Central Nervous System. *J Mol Neurosci*, 1994; 5: 219-229.

78. **Beckman JS.** The Double-edged Role of Nitric Oxide in Brain Function and Superoxide-mediated Injury. *J Dev Physiol*, 1991;15: 53-59.
79. **Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA.** Apparent Hydroxyl Radical Production by Peroxynitrite: Implications for Endothelial Injury from Nitric Oxide and Superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 1620-1624.
80. **Peterson JW, Kwun BD, Hackett JD, Zervas NT.** The Role of Inflammation in Experimental Cerebral Vasospasm. *J Neurosurg*, 1990; 72: 767-774.
81. **Seifert V, Stolke D, Kaever V, Dietz H.** Arachidonic Acid Metabolism Following Aneurysm Rupture. Evaluation of Cerebrospinal Fluid and Serum Concentration of 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ and Thromboxane B_2 in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *Surg Neurol*, 1987; 27: 243-252.
82. **Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS.** Peroxynitrite Formation from Macrophage-Derived Nitric Oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1992; 298: 446-451.
83. **Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin JC, Smith CD, Beckman JS.** Peroxynitrite-mediated Tyrosine Nitration Catalyzed by Superoxide Dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 1992; 298: 431-437.
84. **Hu WH, Li F, Qiang WA, Liu N, Wang GQ, Xiao J, Liu JS, Liao WH, Jen MF.** Dual Role for Nitric Oxide in Dynorphin Spinal Neurotoxicity. *J Neurotrauma*, 1999; 16: 85-98.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tahsin ERMAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 14.04.1968 - Adana
Medeni Durumu : Evli
Adres : Güzel Yalı Mah. 3 Sok. No:8
Ürünsak Apt. 3/3 Adana
Telefon : 0-322-4533122
Fax :
E-mail : Dr_Erman@yahoo.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Çukurova Üniversitesi Tıp Fak.
Varsa Mezuniyet Derecesi : 8.
Görev Yerleri : Adana Numune Hast. Acil Kliniği
Dernek Üyelikleri :
Alınan Burslar :
Yabancı Dil(ler) : İngilizce
Diğer Hususlar :