

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
ARAŞTIRMA VE UYGULAMA HASTANESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD TRAVMALARINDA
GERANYLGERANYLACETON'UN İKİNCİL HASARLANMA
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Varol AYDIN

Dr. Cengiz TEKİN

AYDIN

2007

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, değerli hocalarım Yrd.Doç.Dr. Mehmet TURGUT, Yrd.Doç.Dr.Soner YAYCIOĞLU ve Yrd.Doç.Dr.Varol AYDIN başta olmak üzere, Bir çok güzel anıyı ve çalışmayı birlikte paylaştığımız asistan arkadaşlarım Dr. Orhan AKYÜZ, Dr.Süleyman DAMGACI,Dr. Hakan AK ,Dr. Mehmet Ali BİLGEN ve Dr. Halil SAMANCIOĞLU ile tüm poliklinik, servis ve ameliyathanede görevli hemşire, personellerine ve çok özlediğim sevgili BABACIĞIM'a teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Cengiz TEKİN

İÇİNDEKİLER

1 GİRİŞ ve AMAÇ

2 GENEL BİLGİLER

2.1. PRİMER HASAR MEKANİZMALARI

2.2. SEKONDER HASAR MEKANİZMALARI

2.2.1. APOPTOZ

2.2.2. APOPTOZ MEKANİZMASI ve BİOKİMYASI

2.2.3. APOPTOZİSİN ENGELLENMESİ

2.2.4. OMURİLİK YARALANMALARINDA KASPAZLARIN ROLÜ

2.2.5. OMURİLİK YARALANMASINDA LEZYON BÖLGESİNDEKİ PATALOJİK DEĞİŞİKLİKLER

2.2.6. ISI ŞOK PROTEİN 70 (HSP 70)

2.2.7. GERANYL GERANYL ACETONE (GGA)

3. MATERYAL ve METHOD

3.1. ANESTEZİ

3.2. CERRAHİ İŞLEMLER

3.3. PATALOJİK İNCELEME

3.4. İMMİNO BİOKİMYASAL İNCELEME

3.5. İSTATİSTİKSEL İNCELEME

4. BULGULAR

4.1. HSP 70 DEĞERLERİ

4.2. TNF-ALFA DEĞERLERİ

4.3. MPO DEĞERLERİ

4.4. İSKEMİ VE NEKROZ ALANININ DEĞERLENDİRİLMESİ

5. TARTIŞMA

6. SONUÇ

7. KAYNAKLAR

8. EKLER

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Akut travmatik omurilik yaralanmasının mortalite ve morbidite oranları yüksektir. Akut travmatik omurilik yaralanması bireysel, sosyal ve ekonomik olarak ağır sonuçlara neden olmaktadır.

Akut travmatik omurilik yaralanması öncesi sosyal ihtiyaçlarını gidermede kendine yetebilen birey, travma sonrası tamamen bu ihtiyaçları için başka bireylere bağımlı hale gelebilir. Yaşam mücadelesindeki zorluğa ek olarak psikolojik sorunlarla da mücadele etmek zorunda kalmaktadırlar.

Akut travmatik omurilik yaralanmasının mortalite oranı; % 48.3 – 79 arasında değişmektedir. Bu oran, travma oluştuğunda ve hastaneye kaldırılanları da içermektedir. Hastaneye yatırılıp tedavi edilenlerde mortalite oranı % 4.4 – 16.7 arasında değişmektedir(29).

Akut travmatik omurilik yaralanması sonrası yaşamı etkileyen prognostik faktörler; yaş, omurilikte yaralanmanın düzeyi, nörolojik muayene bulguları en önemlileridir. Omurilik yaralanması olan hastalarda lezyon seviyesine göre motor ve duyu defisitler oluşmaktadır(13,35,45).

Tam omurilik yaralanmasında; yaralanma seviyesinin altında motor ve duyu fonksiyonlarının tam olarak kaybı vardır. Bu tip yaralanmanın prognozu kötü olup yıllık mortalite oranı % 34 olduğu görülmüştür(13,35,45).

Tam olmayan omurilik yaralanmalarında; yaralanma seviyesinin altında motor ve duyu fonksiyonları kısmi olarak korunmuştur.

Akut omurilik yaralanmasına bağlı oluşan hasar iki mekanizma ile açıklanmaktadır.

Bunlar :

- 1- primer hasarlanma
- 2- sekonder hasarlanma

Primer hasarlanma, omurilik yaralanmalarında travmanın olduğu anda ortaya çıkan ve omuriliğin kompresyon, kontüzyon veya laserasyonu ile sonuçlanan durumuna denir. Primer yaralanmanın derecesi, yaralanmaya neden olan travma Őiddetinin genliğine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına göre değişir. Primer hasarlanmadaki patoloji geri dönüşümsüzdür(13,31,35,45).

Sekonder hasarlanma, primer yaralanmayı takiben dakikalar içinde başlayıp haftalarca devam eden patolojik bir süreçtir. Sekonder yaralanmanın ortaya çıkmasındaki en önemli etkenlerden birisi enerji yetersizliğidir. Bunun erken dönemdeki başlıca sebebi bozulmuş perfüzyona bağlı iskemidir. Perfüzyon bozukluğunun düzeltilmesine yönelik tedavi, oluşacak ikincil hasarlanmanın sınırlandırılmasına yol açacağı dşnlmektedir(13,22,30,35,45).

Bilinen ilk omurilik insizyonunu M.Ö 2. yy'da Galen yapmıştır (13,35,45). 1911 yılında Allen'in kedi omuriliği üzerine yüksekte ağırlık düşürerek, omurilikte oluşan kanamayı myelotomi yaparak boşaltmıştır. Cerrahi sonrası nörolojik fonksiyonlarda kısmi düzelme olduğunu deneysel olarak göstermiştir. Böylece sekoder yaralanma konseptinin ortaya çıkmasına öncülük etmiş(2,13,35). Allen 1914 yılında omurilikteki hemorajik ve nekrotik materyal içinde biyokimyasal bir faktörün varlığı olabileceğini ortaya atmıştır. Bu faktör nedeniyle lezyon çevresindeki hasarlanmanın devam ettiğini ne sürmüştür(15).

1990 yılında Strokes ve Reier omuriliğe yapılacak darbenin şiddetini ve hızını önceden belirleyip, darbe sonunda ön görülen travmanın olup olmadığını denetleyen elektro-mekanik cihaz geliştirmişlerdir. Tüm bu çalışmaların amacı, sekonder hasarlanmanın patofizyolojisini açıklamaya ve bu hasarın sınırlandırılmasına yöneliktir(16).

1978 yılında Rivlin ve Tator tarafından klip kompresyon modeli geliştirilmiştir. Mekanik travmaya ek olarak vasküler etkilenme ile iskemi oluşturulmuştur(10). Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak ve aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model olmaktadır. Bu modellerle birlikte birçok deneysel omurilik hasarı modeli geliştirilmiştir(2,7,35).

Deneysel omurilik yaralanma modellerinin geliştirilmesi ve terapötik çalışmalarının amacı sekonder hasarlanmanın fizyopatolojisinin anlaşılmasına yöneliktir(2,7,35).

1980 yılına kadar ikincil hasarlanmadan; serbest oksijen radikalleri, kalsiyum, opiat reseptörleri ve lipid peroksidasyonlarının sorumlu olduğu düşünülmüştür. Çalışmalar bu yönde yapılmıştır(6,33).

Günümüzde ikincil hasarlanmadan, apoptozis, intraselüler protein sentezi ve glutaminerjik mekanizmalar sorumlu tutulmaktadır(33).

Bu çalışmada, nöroprotektif etkinliği araştırma sonuçlarında gösterilen Geranylgeranylaceton'un(GGA), akut deneysel omurilik yaralanmalarında ikincil hasarlanma üzerine olan etkilerini inceledik.

HSP 70(Isı Şok Protein), hücre koruyucu özellikleri deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. HSP 70'in iskemi ve enflamasyon cevabını da azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(1,8,41).

GGA (Geranylgeranylacetone);

GGA; Japonya'da geliştirilmiş bir anti ülser ajanıdır. Japonya'da deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. GGA, yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda mide asit salgısını azaltmadığı, mukus salgısını arttırdığı ve mukazal kan dolaşımını arttırarak mukozanın bütünlüğünün korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir(38). Retinoid iskeleti bulunan acyclic isoprenoid yapısında farmakolojik ajandır(17).

1996 yılında deneysel bir çalışmada GGA'nın, Isı şok protein 70(HSP 70) salınımını arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir(40).

GGA'nın apoptozisi engelleyici etki yaptığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. GGA'nın bu etkisini HSP 70 salınımını arttırarak yaptığı düşünülmektedir. HSP 70 artmış salınımı, antiapoptotik protein olan bcl-2 gen ekspresyonunu arttırdığı ve kaspazların aktivasyonunu engelleyerek apoptozisi önlediği gösterilmiştir (25,32,41).

2 GENEL BİLGİLER

Akut omurilik yaralanması; yüzyıllardır bilinen fakat son 50 yıla kadar tedavi edilmesi imkansız bir patolojik süreç olarak değerlendirilmekteydi(2,36).

Santral sinir sistemindeki nöronal hasarlanmadan sonra ortaya çıkan fonksiyon kayıpları tüm tıbbi tedavilere rağmen ortadan tamamen kaldırılamamıştır(39). Fakat son 15 yıldır neuroprotektif tedavi üzerinde deneysel çalışmalar artmıştır(16).

Akut omurilik yaralanması, bireyden başlayarak toplumsal etkileride olan önemli bir sorundur. Bu etkiler fiziksel, sosyal, psikolojik ve ekonomik olarak ele alınabilir. Sonucun birey ve toplum açısından kaybı ciddi boyutlardadır(2,16,21).

Son yüzyılda motorlu araçların kullanımının artması sonucu trafik kazalarında omurilik yaralanmalarının sıklığı artmıştır(2,16,20,33). Bütün bunlara rağmen evrensel olarak kabul edilmiş tedavi protokolü yoktur(2,6,16).

Günümüze kadar insan omurilik yaralanmasını taklit edebilecek, tanı ve tedavide gelişme sağlanmasında yardımcı olacak, birçok deneysel omurilik yaralanma modeli geliştirilmiştir(2,16). 1911 yılında Allen'in kedi omuriliği üzerine yüksekten ağırlık düşürerek omurilikte oluşan kanamayı myelotomi yaparak boşaltmış ve nörolojik fonksiyonlarda kısmi düzelme olduğunu deneysel olarak göstermiştir. Böylece sekonder yaralanma konseptini ortaya çıkmasına öncülük etmiştir(2,16,30). 1914 yılında omurilikteki hemorajik ve nekrotik materyal içinde bir biyokimyasal faktörün varlığı olabileceğini ortaya atmıştır. Bu faktör nedeniyle lezyon çevresinde hasarlanmanın devam ettiğini öne sürmüştür(30).

1978 yılında Rivlin ve Tator tarafından klip kompresyon modeli geliştirilmiştir. Bu modelde mekanik travmaya ek olarak vasküler yaralanma ile iskemi oluşturulmuştur(2). Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı, omuriliğin tamamının travmaya maruz bırakılarak ve aynı zamanda travma alanında iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen

travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir modeldir(2,16). Tablo 1’de omurilik yaralanma modelleri gösterilmektedir(2).

1990 yılında Strokes ve Reier omurlığe yapılacak darbenin şiddetini ve hızını önceden belirleyip, darbe sonunda ön görülen travmanın olup olmadığını denetleyen elektro-mekanik cihaz geliştirmişlerdir. Tüm bu çalışmaların amacı, sekonder hasarlanmanın patofizyolojisini açıklamaya ve bu hasarın sınırlandırılmasına yöneliktir(16).

<p>A) Travmatik Yaralanma</p> <p>1-Akut Kinetik Kompresyon – kaf,klip,balon,vertebral dislokasyon ,impactor.</p> <p>2)Akut Statik Kompresyon –ağırlık uygulanması</p> <p>3)Ağırlık Düşürme</p> <p>4)Akselerasyon-Deselerasyon</p> <p>5)Distraksiyon</p> <p>6)Transeksiyon-parsiyal,komplet,lazer,bistüri</p> <p>B) Non-tavmatik Yaralanma</p> <p>1)İskemi-aort oklüzyonu,selektif arter veya ven oklüzyonu</p> <p>2)Tümör kompersyonu</p> <p>3)Kimyasal</p>

Tablo1: Deneysel omurilik yaralanma modelleri (2)

Akut omurilik hasarlanması sonrasında ,travmaya maruz kalan bölgede patolojik olarak değişikliklerin görülmesi ve bunların devam etmesi klinik ve deneysel çalışmaların önemli noktasını oluşturmaktadır(2,6,16). Bu değişiklikler, omurilik yaralanmasının patofizyolojisinde oluşan hasarın primer ve sekonder mekanizmalarla olduğu açıklanmaktadır(2,6).

2.1. PRİMER HASAR MEKANİZMALARI

Travmatik omurilik yaralanması sonrasında, omuriliğin içinde oluşan kanama erken dönemde ortaya çıkar. Fakat perfüzyonun azalması ileri dönemlerde ortaya çıkmaktadır(2,6,16,30).

Tator ve arkadaşları klip kompresyon modeli ile omurilikte travma oluşturarak yaptıkları deneysel çalışmada, yaralanma bölgesinde, yaralanmanın proksimali ve distalinde kanlanmanın azaldığını göstermişlerdir(2,16).

Omurilikte, travma sonrasında beyaz cevherdeki kan akımının 5.dakikada azaldığı ve 15.dakikada normale döndüğü gösterilmiştir. Gri cevherdeki kan akımının ise saatler sonra bile olmadığı gösterilmiştir. Bu durumun, sekonder hasarlanma mekanizmasını başlattığı düşünülmektedir(2,6,16,22,30).

Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşsüz hasarının, ilk saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat'ten sonra geri dönüşsüz hasarlandığı düşünülmektedir (2,6,16).

2.2. SEKONDER HASAR MEKANİZMALARI

Akut travmatik omurilik yaralanması sonrası, hasar sadece travmaya bağlı oluşmamaktadır(6). Travma sonrasında erken dönemde omuriliğin kanlanması bozulur ve enerji yetersizliği ortaya çıkar (6,16,30). Bu süreç hızla ilerleyerek hücrelerde nekroza kadar gider (16). Sekonder hasarlanmadan sorumlu olan nedenlerin öğrenilmesi ve tedavi planının yapılması deneysel çalışmaların amacı haline gelmiştir(2,6,16,30).

1911 yılında Allen'in kedi omuriliği üzerine yüksekte ağırlık düşürerek travmatik omurilik yaralanması oluşturmuştur. Travma sonrası omurilikte oluşan kanamayı myelotomi yaparak boşaltmış ve nörolojik fonksiyonlarda kısmi düzelme olduğunu deneysel olarak göstermiştir(2,16,33). 1914 yılında omurilikteki hemorajik ve nekrotik materyal içinde biyokimyasal bir faktörün varlığı olabileceğini ortaya atmıştır. Bu faktör nedeniyle lezyon çevresinde hasarlanmanın devam ettiğini öne sürmüştür(33).

Allen'nin bu çalışması, akut travmatik omurilik yaralanmalarındaki hasarın sadece travma anında olan patolojilere bağlı olmadığını göstermiştir(2,16,33). Bu çalışma sonucunda sekonder hasarlanma konseptini oluşturmuş ve deneysel çalışmalar bu yönde artmıştır(2).

Primer yaralanmaya yol açan mekanik hasar, sekonder yaralanmanın başlangıcını oluşturmaktadır. Sekonder hasar öncelikle, gri cevherde başlar sonra beyaz cevherde devam eder(22).

Omurilik yaralanmasına takiben, omurilikte kanama, ödem, demyelinizasyon aksonal ve nöronal hasar ile kavite oluşumu sonlanan patolojik değişiklikler oluşur. Ducker, oluşan bu patolojik değişikliklerin yaralanma sonrası başlayıp 6. güne kadar devam ettiğini göstermiştir. Nemecek, bu durumu otodestruksiyon olarak tanımlamıştır(16).

Omurilik yaralanması, omurilikte yaralanma bölgesi ile sınırlı kalan patolojik bir süreç değildir. Beyindeki inen yolların nöronları, lokal yaralanmadan etkilenerek atrofi, apoptozis ve nekroza kadar giden patolojik seyir izleyebilir(6,16).

1980' li yıllara kadar ikincil hasarlanmadan, serbest oksijen radikalleri, kalsiyum'un hücre içinde artması, opiat reseptörleri ve lipid peroksidasyonu öncelikli olarak düşünülmüştür(33). Bunlara yönelik çalışmaların deneysel olarak başarılı bulunmasına rağmen insanlarda istenen sonuçlar alınamamıştır (16,33).

Günümüzde sekonder hasarlanma için yapılan deneysel çalışmalar, apoptoz ve nöroprotektif ajanlar üzerinde yoğunlaşmıştır(2,33).

Omurilik yaralanmasının patofizyolojisinde etkili olan ikincil hasarlanma mekanizmaları;

A) Sistemik Etkiler;

- 1- Kalp hızında travma sonrasında kısa süreli artış. Daha sonra uzun süreli kalp hızında düşme.
- 2- Kan basıncında travma sonrasında kısa süreli artış (hipertansiyon). Daha sonra uzun süreli kan basıncında düşme. (hipotansiyon)
- 3- Periferik dirençte azalma
- 4- Kalp debisinde azalma

B) Lokal Etkiler;

- 1- kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
- 2- hemoraji, özellikle omuriliğin gri cevherinde
- 3- mikrodolaşımda bozukluk; mekanik, intra vasküler tromboz, vasospazm

C) Biyokimyasal Değişiklikler;

D) Enflamasyon Cevabı

E) Ödem

F) Apoptoz

G) Enerji Yetersizliği olarak belirlenmiştir(16).

Vasküler Mekanizmalar

Akut travmatik omurilik yaralanması, sistemik vasküler etkilerle birlikte sekonder yaralanmayı tetikleyen mikrovasküler değişiklikler oluşturmaktadır (2,6,22,33).

Sistemik vasküler etkiler;

Omurilik yaralanmasında , travma sonrasında sistolik arter basıncında kısa süreli hafif bir artış olur. Ortalama arter basıncında ve kardiyak output'ta kalıcı azalma ortaya çıkar(2,6). Travma sonrası kalp atımı ve kan basıncındaki ani artışın nedeni olarak; torakal sempatik ganglionların uyarılması ve adrenal bezlerden steroid salınımının artmasının sorumlu olabileceği düşünölmektedir(6,22,33). Akut omurilik yaralanmasına bağlı gelişen omurilik ve diğer organların iskemisine neden olan nörojenik şok tablosu, tedavi edilmezse nöral doku hasarını şiddetlendirir(2). Oluşan nörojenik şokun derecesi, meydana gelen omurilik yaralanmasının seviyesi ile ilişkilidir. Özellikle servikal düzeyde meydana gelen yaralanmanın, çok ciddi nörojenik şok tablosunu ortaya çıkarmaktadır(2,6,16,33).

Normalde, omurilikteki kan akımı otonöregölasyon ile sabit tutulmaktadır. Omurilik yaralanmasından sonra otonöregölasyon sistemi bozulur. Sistemik hipotansiyon nedeniyle omurilikteki kan akımı azalır(16,33).

Ortalama kan basıncının 160 mmHg'ya çıkarılması, omurilikte yaralanma bölgesindeki kan akımını arttırmadığı ve yaralanma bölgesine komşu bölgelerde hiperemi / hemorajilere neden olduğu gösterilmiştir. Kan basıncının normotansif tutulması bu olumsuzlukları ortadan kaldırır(2,6,16,22).

Lokal vasküler etkiler;

Travmatik omurilik yaralanması sonrasında, gri cevher'de ve omuriliğin santralinde hemoraji görülür(16,22,33).

Deneysel çalışmalarda, arteria spinalis anterior ve arteria sulkalis anterior'da mekanik travma sonrasında kan akımının devam ettiği gösterilmiştir. Omurilikteki yaralanma sonrasında venüllerde ve kapillerde kan akımı bozulur. Mikrosirkülasyonun bozulması, travma alanında, travmanın proksimali ve distalinde de görülür. Mikrosirkülasyonun bozulması, travmanın etkisiyle oluşan vazospazm ve vazoaktif aminlerin etkisiyle olmaktadır(2,6,16,22,33). Trombositlerden salınan Tromboxan A2 (TXA2) intravasküler tromboza neden olur ve buda iskeminin şiddetlenmesini arttırır(2).

Tator ve arkadaşlarının klip kompresyon modeli kullanarak omurilik yaralanması çalışmasında, travma bölgesi ve komşuluklarında mikrosirkülasyonun durduğu gösterilmiştir(2,16). Beyaz cevherde, travmadan 15dakika sonra sirkülasyonun normale dönmeye başladığı gösterilmiştir. Gri cevherde ise travmadan saatler sonra bile kan akımının olmadığı ve bunun sonucunda da iskemi olduğu belirtilmiştir. Omurilikteki kan akımını düzenleyen otheregülasyonun bozulması ve sistemik hipotansiyon oluşması sonucu, omurilik kan akımı azalır ve omurilikte iskemi oluşur(2,16,22).

BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

İyonik mekanizmalar;

Potasyum kanalları(K^+);

Potasyum kanalları(K^+); myelin tarafından sarılmış olan paranodal yada internodal bölgelerde yerleşmişlerdir. Myelin hasarı olduğunda Potasyum(K^+) kanalları hızla aktive olurlar. Membran potansiyeli, Potasyum(K^+) denge potansiyeline yaklaşır ve aksonal ileti bloğu oluşur. Potasyum(K^+) kanal blokerlerinin deneysel ve insan omurilik yaralanmaları sonrasında aksonal iletiyi arttırdığı gösterilmiştir(2,16).

Sodyum kanalları(Na^+);

Omurilik yaralanması sonrasında iskemi hipoksiye / anoksiye neden olur. Bunun sonucunda nörondaki membran depolarizasyonun ve ATP kaybına neden olur. Sodyum kanallarının fonksiyonu bozulur. Sodyum(Na^+) hücre içine girerek konsantrasyonu artırır. Membran depolarizasyonu ile birlikte Sodyum – Kalsiyum değişimi başlar. Hücre içine, Kalsiyum (Ca^{+2}) girişi artar ve nöron hücresinde hasarlanmayı artırır. Voltaja bağımlı kanalların bkoke edilmesi ile koruyucu etkinliğin olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir(2,16).

Kalsiyum kanalları(Ca^{+2});

Kalsiyum, ekstraselüler bir iyonudur. İntraselüler iyon konsantrasyonundan 1000 kat daha fazlası ekstraselüler alanda bulunur. Omurilik yaralanması sonrası, hücre hasarı ile birlikte kanlanmanın azalmasına bağlı olarak enerji yetmezliği oluşur. Bunun sonucunda enerji bağımlı olarak fonksiyon gören, Sodyum - Kalsiyum ($Na^+ - Ca^{+2}$) değiştirici pompalar iyi çalışmaz. Kalsiyum'un hücre dışında ki konsantrasyonun fazla olmasına bağlı olarak hücre içine girişi artar. Hücre içindeki Kalsiyum (Ca^{+2}) iyonları, fosfolipazları ve proteazları aktive eder. Fosfolipazlar hücre membranının yıkılmasına neden olur. Hücre

membranının yıkılması sonucunda, araşidonik asit ve metabolitlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Araşidonik asit, siklooksijenaz ve lipooksijenaz ile yıkılarak Prostaglandinler(PG) ve Lökotrienler(LT) oluşur. Vazojenik ve enflamatuar özellikleri olan bu ürünler, kan akımını azaltır ve membranın geçirgenliğini artırır. Kalsiyum kanal blokerlerinin, omurilik yaralanmalarında klinik iyileşme sağlamamasına rağmen yaralanma bölgesinde kan akımını arttırdığı gösterilmiştir(2,16,22).

Eksitatör Amino Asitler;

Omurilik yaralanması sonrası, Glutamat ve Aspartat yaralanma bölgesinde kısa sürede hızla yükselirler. Eksitatör Amino Asitler, omurilik yaralanmasında artar. Glutamat(Glu), yaralanmadan 15dakika sonra lezyon bölgesinde pik yapar. 120 dakika kadar yüksek kalır. Glutamat(Glu) ve Aspartat(Asp) salınımının, omurilik yaralanmasının şiddeti ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Kafa travmalarından sonra eksitatör amino asitler, eksitotoksik etkilerini N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) reseptörleri üzerinden yaparlar. Omurilik yaralanmalarında, a-amino-3hydroxy-5-methyl-4isoxazole propionate(AMPA) ve non-NMDA reseptörleri üzerinden yaparlar. Omurilik yaralanmalarında kullanılan a-amino-3hydroxy-5-methyl-4isoxazole propionate(AMPA) ve non- NMDA reseptör blokerlerinin nöroprotektif etkili oldukları yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir(2,6,16).

Enflamatuar Cevap;

Omurilik yaralanmasından sonra, enflamatuar cevabın oluştuğu ve bununda ikincil hasarlanma üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir(9,16,22).

Omuriliğin travmatik yaralanmasından sonra, enflamasyon cevabı saatler sonra başlar ve 72 saat içinde de maksimum düzeye ulaşır. Enflamasyon cevabı; endotel yaralanması, enflamasyon mediatörlerinin salınımı, endovasküler geçirgenliğin artışı, yaralanma bölgesinde ödem oluşması, periferal enflamatuar

hücrelerin yaralanma bölgesine göç etmesi ve mikrogliaların aktivasyonu olarak gözlenmiştir(2,16,22,33).

Deneysel omurilik yaralanmalarından sonra enflamasyon cevabının mekanizması ve zaman içindeki değişimleri incelenmiştir. Ratlarda, omurilik yaralanmasında 4-6 saat içinde polimorfo nükleer lokositler(PMNL), lezyon çevresinde artmaya başladığı ve 24 saat içinde maksimum düzeye ulaştığı görülmüştür(9). Yaralanmadan 2 gün sonra ise makrofaj ve monositlerin, omuriliğin lezyon bölgesinde artmaya başladığı ve 7.günde maksimum seviyeye çıktığı gösterilmiştir(9).

Yaralanma bölgesindeki, kanama miktarı ile polimorfo nükleer lokositlerin (PMNL) birikmesi arasında doğru orantılı olduğu gösterilmiştir.yaralanma bölgesinde kanamanın oluşması, granülositik hücrelerin yaralanma bölgesinde birikmesini sağlayan mediatörlerin olduğu sonucunu çıkarmıştır. Bu mediatörler, bradikinin, prostaglandinler, lökotrienler, trombositler ve serotonin'dir. Bu mediatörlerin omuriliğin yaralanma bölgesinde biriktiği gösterilmiştir(2,16).

Omurilik yaralanma bölgesinde, enflamasyon hücrelerin birikmesiyle proteazlar ve serbest oksijen radikalleri artar. Buda yaralanma bölgesindeki doku hasarını arttırır(9).

Myeloperoksidaz (MPO), lökositlerden salınan oksidatif bir enzimdir. Omurilikteki enflamatuar hücrelerin aktivitesini belirtirler. Myeloperoksidaz (MPO) oksidatif bir enzim olarak bilinmektedir. Bu enzimin aşırı artımı omurilikte nöron hücrelerin membranını da öldürücü hasara neden olduğu belirtilmiştir(9).

Enflamasyon hücrelerden salınan, Matriks Metallo Proteinaz-9(MMP-9)'un omurilikte hasara neden olduğu gösterilmiştir(9).

Tümör Nekroz Faktörü-alfa (TNF-alfa); travmatik omurilik yaralanması sonrası gelişen iskemi/reperfüzyon, kompleman sistemini aktive eder. Kompleman aktivasyonunun başlangıç dönemi ve mekanizması halen tartışmalıdır ve tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman aktivasyonu sonucu oluşan, proinflamatuvar komponentler bir yandan lökositleri aktive ederken, diğer yandan TNF-alfa, İnterlökin-1 (IL-1) ve İnterlökin-6 (IL-6) oluşumunu uyararak inflamatuvar cevabı güçlendirir. Ciddi bir ameliyata bağlı doku travması veya infeksiyonlar sonucu oluşan inflamatuvar kompleks, bir proinflamatuvar sitokin döngüsünün başlamasına neden olur. Bu sitokinler arasında TNF-alfa, konakçı cevabının oluşumuna yol açan ilk ve en güçlü mediyatörlerden biridir(26,41).

TNF-alfa sentezinin kaynağı, monositler, makrofajlar ve T lenfosit hücreleridir. Travmatik yaralanmalar, inflamatuvar mediatörlerin oluşumu ve akut faz proteinlerinin yapımı gibi homeostatik cevapların oluşumunda belirgin etkiye sahiptir(9,41).

Akut travmaya cevap olarak TNF-alfa, salınımı hızlı ve kısa sürelidir. Endotoksin uyarısı ile akut inflamatuvar cevap gelişimini taklit eden deneylerde tümör nekroz faktörünün monofazik bir eğri izlediği, 90 dakikada pik yapıp 4 saat içinde ölçülemeyecek düzeye kadar indiği saptanmıştır. Yarı ömrü (15-18) dakika olmasına rağmen, TNF-alfa'nın kısa süreli ortamda bulunması bile önemli metabolik ve hemodinamik değişikliklerin gelişmesine ve döngünün ileri kısmındaki sitokinlerin aktive olmasına neden olur(9,26,41).

TNF-alfa üretiminin kısa sürmesi, ortamda regüle edilemeyecek kadar çok TNF-Alfa aktivitesinin oluşmasını engelleyen efektif endojen mediatörlerin olduğuna işaret eder. TNF-Alfa yapımı ve aktivasyonunu engelleyen birçok doğal

mekanizma bulunduğu gösterilmiştir. Dolaşımında transmembranöz TNF-Alfa reseptörlerinin (solubl TNF reseptörleri = sTNFR) endojen inhibitörleri saptanmıştır. Bu reseptörlerin kompotetif olarak dolaşımında bulunan fazla TNF-alfa'yı sekestrize ederek koruyucu rol aldıkları sanılmaktadır(4,9,26,41).

TNF-Alfa pro-enflamatuar olarak görev alan sitokin olduğu gibi nöron hücrelerinin apoptoz mekanizmasını uyaran yolların önemli bir yapıtaşıdır(41).

Isı Şok protein 70(HSP 70); Metalloproteinaz-9(MMP-9) ve Tümör Nekroz Faktör – Alfa (TNF-Alfa)'nın enflamatuar etki mekanizmasını, Inter Kapa B Kinase(IKK)'ı bloke ederek inhibe eder(9,26,41).

2.2.1 APOPTOZ

Programlanmış hücre ölümü, normal gelişim sırasında, belli zamanda ve bölgelerde görülür. Ayrıca programlanmış hücre ölümünün istenmeyen ve potansiyel zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasında rol oynadığı da bildirilmiştir(2,16,44). Apoptozis terimi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Kerr fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını görmüş ve buna büzüşme nekrozu adını vermiştir(20).

Olayın, dokularda tek tek hücre kaybına sebep olduğundan latince ayrı düşmek anlamına gelen apoptozis denmiştir(Apo; ayrı, Ptozis; düşmek)(16,44).

Apoptozis, doku dengesinde, farklılaşmada ve gelişmede önemli rol oynayan genetik olarak düzenlenen hücre ölüm şeklidir. Ayrıca dejeneratif hastalıkların gelişiminde de rol alır. Apoptozis, protein sentezi ve enerji gerektiren hücrenin aktif ölümüdür. Apoptozis, önceleri hücre ölümünün fizyolojik bir şekli olarak

düşünülmesine rağmen, patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği gösterilmiştir(33,41,44).

Apoptosis, genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilir. Embriyonik gelişim esnasında nöronal hücre ölümünün bir formu olarak apoptozis uzun zamandan beri bilinmektedir(12,16,20,36,43).

Merkezi Sinir Sistemin(MSS)'de apoptozis, hem nöronları hem de glial hücreleri etkiler. Glutamat, Kalsiyum iyonları, serbest radikaller, fas bağımlı protein faktörleri ve hücreler tarafından salınan sitokinler apoptozisin oluşumundan sorumludur(5,16,20).

Apoptozis veya programlanmış hücre ölümü, omurilik yaralanmalarında önemli rol oynar ve glutaminerjik eksitotosisite, serbest radikal hasarı, sitokinler ve inflamatuvar yaralanma tarafından tetiklenir. Başlangıç yaralanmasından sonra spinal korda uygulanan travma ani fiziksel yaralanmaya neden olur. Günler ve aylarca süren doku yaralanması bu olayı izler(5,9,16,20).

Sonuç olarak, hücre nekroza veya apoptozise giderek son bulur(5,9,16,20,44).

2.2.2. APOPTOZİSİN MEKANİZMASI VE BİYOKİMYASI

Apoptozisin indüklenmesinde 3 prototip sinyal yolu gösterilmiştir(16,33,41).

1. Yol; Ölüm reseptörlerinin prokaspaz-8'i ve muhtemelen diğer başlatıcı kaspazları aktiflemek üzere bağlanmasıdır. Omurilik yaralanmaları sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik dejenerasyon, ölüm reseptörleri (fas ve p75) ile bağlantılıdır. Bu reseptörler, Tümör Nekroz Faktör Reseptör (TNFR) gen

ailesinin üyeleridir(16,41,45). Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği biliniyor. Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptozis oluşumunda, fas ve p75 reseptörleri'nin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Fas reseptörü ile fas ligandının karşılıklı etkileşimi FADD (FAS bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar. Kaspaz-3, fas ve p75 reseptör'lerinin her ikisi ile de aktiflenen efektör kaspazdır(16,41).

2. Yol ise; mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 u içerir. Ko-faktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom c ve Apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3'ü aktive ederek kaspaz kaskadı sürdürülür. Mitokondri normal şartlar altında Adenozin trifosfat (ATP) oluşturmak üzere sitokrom c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom c, apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder(2,6,16,20,45).

Kalsiyum bağımlı nötral sistein proteaz kalpain; Omurilik yaralanması, travmatik beyin yaralanması ve diğer nörodejeneratif durumlarda doku haraplanması ve hücre ölümünde önemlidir. Omurilik yaralanmalarında sekonder olaylara bağlı hücre ölüm mekanizması kaspaz-3 ve kalpaine bağlıdır. Mitokondriye ait yaralanmaları olan lezyonlarda yaralanmadan 4 saat sonra nöronlardan kalpain salınımında ciddi bir artış görülmüştür. Spinal kord lezyonlarında, yaralanmayı takiben kaspaz aracılı apoptozis, sitozole sitokrom c salınımı ve bax/bcl-2 gen oranında artış görülür. Eğer mitokondri yapısı korunur ise, kalpain akut fazda inhibe edilir ve motor fonksiyonlar korunarak nöronların bütünlüğü sağlanır(16,20,41).

3. Yol; endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol, son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12 bağımlı endoplazmik retikulum

aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir. Kaspaz-12 ,endoplazmik retikulumdan salınır. Son çalışmalar Kalsiyum seviyelerinin ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur(6,16,20,41).

Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir ve kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Son çalışmalar, in vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiğini göstermektedir(6,16,41).

Apoptozisin biyokimyasında ise;

1. basamak başlangıç fazı; hücrenin içinden ve dışından gelen çok farklı sinyaller hücre ölümünü başlatır; plazma membranı reseptör aracılı, genotoksik, fiziksel stres.

2. basamak efektör fazı; gelen sinyaller değerlendirilir ve hücre ölümüne karar verilir.

3. faz ise yürütme fazı; aktiflenmiş apoptotik mekanizma farklı hedefler üzerinden DNA ve hücre proteinlerin parçalanmasını başlatır(16,33,41,44). Apoptozis'in başlangıç ve basamakları şekil-1'de gösterilmektedir.

2.2.3. APOPTOZİSİN ENGELLENMESİ

Hücre içi ve hücre dışı sinyallerin her ikisi de hücre ölümünün aktif formu olan apoptozis tarafından başlatılır ve hücre içinde biyokimyasal reaksiyonlar ve moleküler kompleks kaskadları içerir. Kaskadın bütün basamakları tam olarak açıklanamamasına rağmen bazı maddeler önemlidir(2,16,20,41,44).

Bcl-2 protein ailesi, apoptozis'in kontrolünde en önemli gruptur ve bir düzineden fazla üyesi vardır. Bunlardan bazıları (bax ve bad gibi), apoptotik aktivitenin

öncüleri iken diğerleride antiapoptotik(hücre koruyucu) proteinlerdir. Bu proteinlerin seviyeleri hücrenin öleceğine veya yaşayacağına karar verir. Bax ve bad proteinleri, etkilerini diğer bir protein ailesi olan kaspazlar üzerinden gerçekleştirir(41,44).

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aktiviteleri hücre ölüm yolunda ortaya çıkar. Kaspaz-9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. TNF- α gibi sitokinler tarafından aktive edilir. Bcl-2 (antiapoptotik protein) spinal kordun, kompresyon yaralanmasından sonra beyaz maddede arttığı görülmüştür(5,9,26,44).

Deneysel omurilik yaralanmalarında kaspaz -8 ve kaspaz-9 yaralanmadan 30 dakika sonra aktifleştğini, 1 saat sonrada kaspaz-3'ün aktif hale geldiği gösterilmiştir(16).

Bethe ve arkadaşları travmatik omurilik yaralanmasından sonra TNF-Alfa düzeylerinin hızla yükseldiğini ve apoptotik uyarıya neden olduğunu göstermişlerdir(2,16).

Bcl-2

Bcl-2 proteinlerinin etki yeri mitokondridir ve apoptozisin regulasyonunda rol alır. Bcl-2 güçlü bir ölüm inhibitörüdür. Antioksidan yolda mitokondriden sitokrom c salınımını engellemede rol alır. Bcl-2 mitokondri membranı dışında, endoplazmik retikulum ve nükleer membranlarda bulunur. Bcl-2 ayrıca Raf 1 ve kalsinörine bağlanır(20,25,30,41).

Bcl-xl mitokondri membranı dışında lokalizedir. Bcl-xl ve Bcl-2 beraberce mitokondri membran geçirgenliğini korur. Proapoptotik proteinleri (Bax ve Bak)

inhibe ederek apoptozisi engeller. Bcl-xl kaspaz aktivasyonunu, Apaf 1 üzerinden engeller(5,30,41,44).

HSP 70, bcl-2 düzeyini arttırarak antiapoptotik etkili olduğu gösterilmiştir(25,41).

KASPAZLAR

Apoptozisin tam olarak mekanizması anlaşılamamasına rağmen apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay hücre içi sistein proteazlarının yani kaspazların aktivasyonudur. Kaspazlar, apoptozisi aktive eden sinyaller tarafından tetiklenir(2,20,25,44).

Apoptozisin efektör fazında önemli bir rol oynayan sistein proteaz ailesi kaspazlardır(16,41,44).

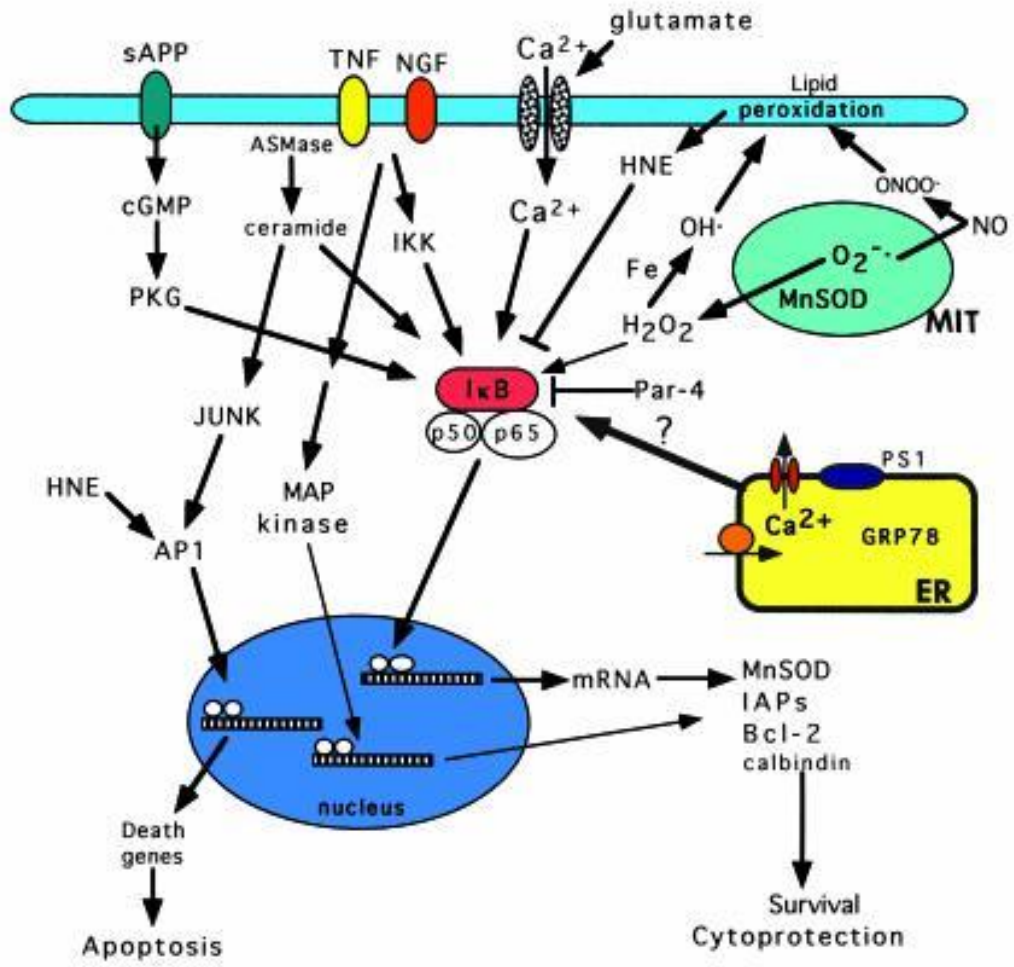
Kaspazlar,(cysteine-dependent aspartate-spesific proteases) kalsiyum bağımsız sistein sınıfının en önemli bölümünü oluşturur(14,16,20,26).

Proksimal veya başlatıcı kaspazlar, terminal veya efektör kaspazlar olmak üzere iki grupta incelenir. Başlatıcı kaspazlar 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10 ve 12 olmak üzere 8 adettir. Efektör kaspazlar ise, proteinazlar tarafından aktive olur ve kaspaz 3, 6, 7, 11, 13 olmak üzere 5 adettir(26,41,44).

Kaspaz 3'ün nöronal gelişim ve yaralanmada oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bu proteazın bozulması nörolojik defektlere yol açar(26,36,41,44).

Deneysel iskemi ve travmatik beyin yaralanması sonucunda nöronal hücre ölümüne kaspaz 3 aktivitesi katkıda bulunur. Bu iki yaralanmada da kaspaz

inhibitörleri apoptozisi azaltmakla kalmayıp ayrıca hayvanlarda fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmıştır(14,25,26,41).



Şekil 1: Apoptoz ve antiapoptotik mekanizmalar (23).

Apoptozisi engeleyen nedenlerin bazıları tablo 2’de gösterilmiştir(26,41,44).

Fizyolojik faktörler	Viral Nedenler	Farmakolojik Ajanlar	Hastalıklar
Growth hormon	Adenovirüsler	Kalpain İnhibitörleri	Kanserler
Çinko	Herpes virüsler	Sistein Proteaz İnhibitörleri	Otoimmün Hastalıklar
Östrojen	Ebstein-Barr virüsü	Alfa-Hekzaklorohekzan	
Androjen		Fenobarbital	

Tablo 2

Apoptozisi arttırıcı etki yapan nedenlerin bazıları tablo 3’de gösterilmiştir(26,41,44).

Fizyolojik aktivatörler	Yaralanma	İlaçlar	Toksinler	Hastalıklar
TNF-Alfa	Isı şoku	Kanser ilaçları	Etanol	AIDS
Glutamin	Viral Enfeksiyonlar			Alzheimer
Dopamin	Bakteriyal Toksinler	Gamma Işını		İskemi
Kalsiyum	Onkogenler	ultraviöle ışını	B-amiloid	Parkinson
Glukokortikoidler	Beslenme Bozukluğu		peptid	Aplastik Anemi

Tablo 3

Geranly geranyl aceton(GGA)'un apoptozisi engelleyici etki yaptığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. GGA'nın bu etkisini HSP 70 salınımını arttırarak yaptığını düşünölmektedir. HSP 70'in artmış salınımı, antiapoptotik protein olan bcl-2 gen ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir(25,32,41).

2.2.3. Spinal kord yaralanmasında kaspazların rolü

Deneysel omurilik yaralanmalarında, apoptotik yolakta kaspaz'lar önemli bir yer tutmaktadır. Omurilikte yaralanma sonrasında kaspazlar'ın aktive olduğu ve yaralanma bölgesinde arttığı gösterilmiştir(43).

Kaspazlar, nöronal apoptozisde önemli bir yer teşkil ederler. Merkezi sinir sistemi yaralanmasında görölen apoptozisde en önemli rol kaspaz 3'e ve kaspaz 9 aittir. Kaspazlar inaktif proenzimlerdir ve çoğu proapoptotiktir(16,41,44).

Apoptozisin dış ve iç sinyallere bağlı olmak üzere iki yolu mevcuttur.

Apoptozisin son fazı kaspaz 3 aktivasyonudur. Spinal kord yaralanmasını takiben nöronlar ve glial hücreler apoptozise giderler(26,41,44).

Dış sinyallerle meydana gelen apoptozis'de kaspaz kaskadı, TNF- α 'nın TNFR1'e bağlanması ile başlar. TNF reseptör aracılı domain (TRADD) aracılığı ile ilerler ve trimerized ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu da başlatıcı kaspazlardan prokaspaz 8 veya prokaspaz 10'a bağlanır. Kaspaz 8, travmatik beyin yaralanması sonrası görölen apoptozisde kaspaz 3 aktivasyonuna neden olur. Nöronal apoptozisde dış sinyallere bağlı kaspaz kaskadında kaspaz 8'e bağlı mitokondri aracılı sitokrom c salınımı uyarılır(16,26,41,44).

İç sinyallere bağlı kaspaz kaskadı ise mitokondri tarafından oluşturulur. Apoptotik uyarıları alan mitokondri, sitozole sitokrom c salınımını gerçekleştirir. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktivatör faktör 1 (APAF 1)'e bağlanır. Bu da prokaspaz 9'u aktive eder. Aktive olan kaspaz 9 ise kaspaz 3 aktivasyonuna neden olur(16,36,41,44).

Spinal kord yaralanmasında, kaspaz bağımlı apoptozis oldukça iyi açıklanmıştır. Son çalışmalar kaspaz 8, kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün spinal kord yaralanmalarında meydana gelen apoptozisdeki rollerini açıklar(36,41,43,44).

Kaspazlardan bağımsız olarak apoptoz indükleyici faktör(AIF), mitokondri ve transloke olmuş nükleusdan salınır ve hücrenin apoptotik yola girmesine neden olur(41). Bu mekanizmada antiapoptotik protein olan bcl-2 tarafından inhibe edilmektedir(5,30,41).

2.2.4. Omurilik yaralanmasında lezyon bölgesindeki patolojik değişiklikler

Omurilik yaralanması sonrası gelişen patolojik süreç akut, subakut ve geç faz olarak 3 kısımda incelenir(2,6,16).

Akut faz

Akut yaralanmanın en erken makroskopik bulguları, zedelenmenin şiddetine bağlı olarak omurilikte yumuşama, yuvarlaklaşma ve pembe-kırmızı renk değişikliği oluşmasıdır. Bu makroskopik görünüm değişikliği gri cevherin mikrovaskülaritesindeki patolojilerden kaynaklanır. Yaralanma bölgesinde santral kanal etrafında ve ön boynuz sinir hücrelerinde multifokal peteşiyal kanamalar şeklinde başlar ve radial olarak yayılır. Santral peteşiyal kanamaların

yayılması arttıkça glial reaksiyon ve nöranal dejenerasyon belirgin hale gelir(2,16).

Nöronlarda ki nekrotik değişiklikler yaralanmadan 1 saat sonra gri cevherde görülmeye başlanmıştır. Beyaz cevherde 8. saatten sonra nekrotik değişiklikler görülmeye başlar. Sitoplazmik eozonofili, hayalet hücreler, Nissl cisimciğinin kaybolması, hiperkromatizasyon, nöronlarda düzensiz şekiller nekrotik değişiklik göstergeleri olarak değerlendirilmiştir(2,6,16).

Yaralanma sonrası ilk saatlerde sinir hücrelerinin aksonu ile myelin kılıfı arasında ayrılma gözlenmiştir. Bu ayrılmanın nedeni, oluşan ödem ve myelin içerisinde vakuoller olarak değerlendirilmiştir. Travma sonrası eritrosit ve lökositler damar dışına çıkarlar. Eritrositlerin damar dışına çıkmasıyla peteşial kanamalar oluşur. Yaralanmadan sonra ilk 72 saat içinde Polimorfo Nükleer Lökosit (PMNL)' ler lezyon alanında hakim olarak bulunurlar. Daha sonra ise lenfosit ve makrofaj hakimiyeti oluşur(2,6,16,22).

Nöron hücresi öldüğünde (1-4) saat içinde hücre ve stoplazması üçgen şeklinde büzülür. Çekirdekte kromatin yapısının kabalaşıp parçalanarak dağılması, stoplazmada nissl cisimciklerinin kaybı ve koyu eozinofilik boyanma şeklindeki "Kırmızı nöron" olarak adlandırılan değişikliğe uğrar. Ölen nöronlar makrofajlar ve mikroglialar tarafından fagosite edilirler ve bu olay travmadan (10-12) saat sonra ışık mikroskobunda saptanabilir(2,16,22,43).

Subakut faz

Omurilik yaralanmasından sonra 8. günde akut dönemdeki değişiklikler azalmaya başlamıştır. Ödem azalmış ve küçük kanamalar rezorbe olmuştur. Büyük

kanamalar ise organizasyon ile giderilmeye çalışılır ve rekanalizasyon izlenir(2,16,22).

Damarların çoğunun lümeninde fibrin trombüsleri vardır. Ortamda lipid ve hemosiderin yüklü makrofajlar mevcuttur. Fagositik hücreler hasarın olduğu alanda özellikle damarlar çevresinde rozetler halinde gruplar oluşturur(2,16).

Myofibroblastların kollajen üreten fibrositlere dönüşümü ile nedbe dokusu oluşurken, astrositik glial hücre artışı ile gliosis izlenir. Asrositik yanıt yaralanmadan 14 gün sonra maksimum düzeye ulaşır(2,6,16).

Eğer santral hemorajik nekroz oluşmuşsa, onarım boru şeklinde kistik boşluk olarak gerçekleşir. Aksonal bağlantısı kesilmiş nöronda "santral kromatolizis" olarak adlandırılan sitoplazmanın belirgin homojenizasyona uğradığı ve şiştiği, çekirdeğin ise kenara itildiği değişiklikler görülür(2,16,22).

Nöron hücrelerinin aksonunda kesi olduğunda, aksonun distal kısmında wallerian dejenerasyonu meydana gelir. Yaralanmanın ilk zamanlarında ödem ve kanama nedeniyle şişmiş olan omurilik onarım sonuna doğru incelmış ve atrofik görünüm almıştır(2,6,16,22).

Geç faz

Travma bölgesinde medulla spinalis üzerinde dura mater ve araknoid membran kalınlaşmıştır. Meningial zar, adheziv araknoidit olarak isimlendirilen bu durum korda veya duraya yapışıklık gösterir. Medulla spinalis makroskopik olarak büzülerek küçülmüştür, gri ve sert kıvamlıdır. Mikroskopik olarak fibrozis ve meningeal hücre proliferasyonu görülür(2,16,22).

Omurilik yaralanmasından 8 hafta sonra, yaralanmanın olduğu omurilik bölgesinde santral kanal ile birleşmiş ve içlerinde Beyin omurilik sıvısı (BOS)

bulunan kistik oluşumlar gelişir. Guizar ve arkadaşları omurilik yaralanması sonrasında kist oluşumunda 3 dönemin olduğunu bildirmişlerdir.

1- Nekroz dönemi; yaralanmadan sonraki ilk gün başlar.14 güne kadar devam eder.

2- Tamir dönemi; omurilik yaralanmasından sonraki 2. – 8. haftalar arası zamanı kapsar.

3- Stabilizasyon dönemi; omurilik yaralanmasından sonraki 8. hafta ile 1. yıl arasındaki süredir. Kistik oluşumları nedeni olarak makrofajların yaralanmadan sonra oluşan nekrotik dokuları adsorbe etmesi olarak görülmüştür(2,6).

Geç faz döneminin ikinci önemli kompeneti myelin kaybıdır. Yaralanmanın şiddetine göre myelin kaybı oranı değişmektedir. Myelin kaybı ilk 24 saat içinde başlar. Myelin kaybı 2.haftanın sonuna da maksimum seviyeye ulaşır. 3.haftadan sonra myelinizasyon oluşmaya başlar. Bu fonksiyondan oligodentrositler sorumlu tutulmuş olmasına rağmen DREZ(Dorsal rot enter zone) bölgesinden göç eden schwann hücrelerinin de rol alabileceği belirtilmiştir(2,6,16,22).

2.2.5. Isı Şok Protein 70 (HSP 70)

Isı şok proteinleri, moleküler şaperonlardır(1,8). Tüm hücrelerin yapısında bulunurlar. Hücrelerin stoplazmalarında, mitokondrilerinde ve endoplazmik retikulumlarında bulunurlar. HSP'ler molekül ağırlıklarına, hücre içindeki lokalizasyonlarına ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmışlardır(8,40).

Isı şok proteinleri, canlılığın devamı için önemlidirler. Proteinlerin uygun konfigürasyonunda bulunmasını ve proteinlerin stabilizasyonlarının sağlanmasında görevlidirler. Hücrelerin strese maruz kalmaları durumunda salınımlarında artış olur. Proteinler görevlerini yerine getirmeleri için uygun şekilde katlanmaları gerekir. Moleküler şaperonlar proteinlerin uygun şekilde

katlanmalarında önemlidirler. Yanlış katlanmış proteinlerin bıkimini engel olurlar. Örneğin; bozuk proteinlerin nöronlarda birikmesiyle oluşan Alzheimer's hastalığına karşı koruyucu özellikleri vardır(1,8). Proteinlerin stabilizasyonun da ve yapılarının bozulmasını engellemede görevlidirler(1,40). Isı şok proteinleri, molekül ağırlıklarına göre isimlendirilmektedir. Hepsinin görevleri birbirinden farklı olabilmektedir(1,8,40).

Isı şok proteinlerinin salınımında artışa neden bazı durumlar;

- 1- Isı şoku
- 2- Ağır metaller
- 3- Enerji yetersizliği
- 4- Amino Asit analogları
- 5- Kemoterapik ajanlar
- 6- Viral infeksiyonlar
- 7- Ateş
- 8- İnflamasyon
- 9- İskemi
- 10-Oksidatif hasarlanma
- 11-Tümörler
- 12- Hücre döngüsü bozukluğu
- 13- Growth faktör yetersizliği
- 14- Gelişme ve farklılaşma yetersizliği

Çalışmamızda kullandığımız HSP 70; 70 kDa(kilo Dalton) ağırlığındadır(41).

HSP 70'in amino ve karboksi terminalleri vardır. Amino terminalinde Adenozin tri fosfataz(ATP ase) bulunur.Karboksi terminalinde peptid bağlama yeri bulunur. Proteinlerin; Endoplazmik retikulum(ER), mitokondri ve stoplazma içinde

taşınmalarında yardımcıdırlar. Proteinlerin uygun şekilde katlanarak stabilizasyonunun sağlanmasında ve uygun olmayan proteinlerin birikiminin önlenmesinde rol alırlar(8).

HSP 70, hücre koruyucu özellikleri yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. İskemi ve enflamasyon cevabına karşı hücre koruyucu özellikleri önemlidir. HSP 70'in, anti- apoptotik özellikleri tanımlanmış ve yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir(1,8,41).

Hücre koruyucu özelliklerini hangi mekanizma ile yaptıkları tam olarak belirlenememiştir(41).

Sinir sistemindeki HSP 70' in artmış sekresyonu hipokampal glial ve periferik sinir hücre kültürlerinde sağlanmıştır. Yapılan deneysel çalışmalarda HSP 70, sinir hücrelerini ısı şoku ve metabolik stres durumlarında da koruyucu özelliği olduğu gösterilmiştir(8,41).

HSP 70'in hücre koruyucu etkilerini sadece protein yapılarının korunması üzerinden değil, apoptoz ve enflamasyon cevabını düzenleyerek etkili olduğu gösterilmiştir(1,41).

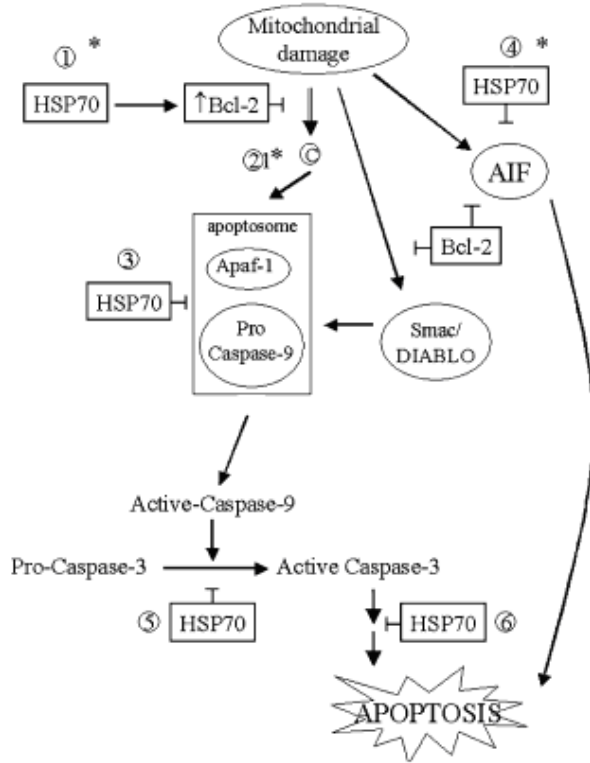
Mitokondrinin stoplazmasında apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ile prokaspaz 9 bağlanarak apoptozom oluşur. HSP70'in, Apaf-1'e bağlanarak, kaspaz 9 aktivasyonunu engellendiği düşünülmektedir. Kaspaz 9 aktive olmadığından diğer kaspazları (kaspaz 3) aktive edemez. Bunun sonucunda da anti- apoptotik etkinin olduğu düşünülmektedir(8,40,41).

Diğer yandan kaspaz aktivasyonu olmadan anti-apoptotik mekanizmanın aydınlatılması için yeni bir çalışma yapılmış. Bu çalışmada virüsler vektör olarak

kullanılmıştır. HSP 70 salınımı arttırıldığında anti-apoptotik protein olan bcl-2'nin düzeyinin arttığı spesifik olarak gösterilmiştir(41).

Bcl-2, AIF (Apoptoz inducing faktör) mitokondriden salınımını bloke eder. Kaspazlardan bağımsız apoptoz yolağında bloke edilmiş olur. Buna ek olarak mitokondriden sitokrom-c salınımını da engellediği görülmüş ve kaspaz aktivasyonu engellenmiştir.

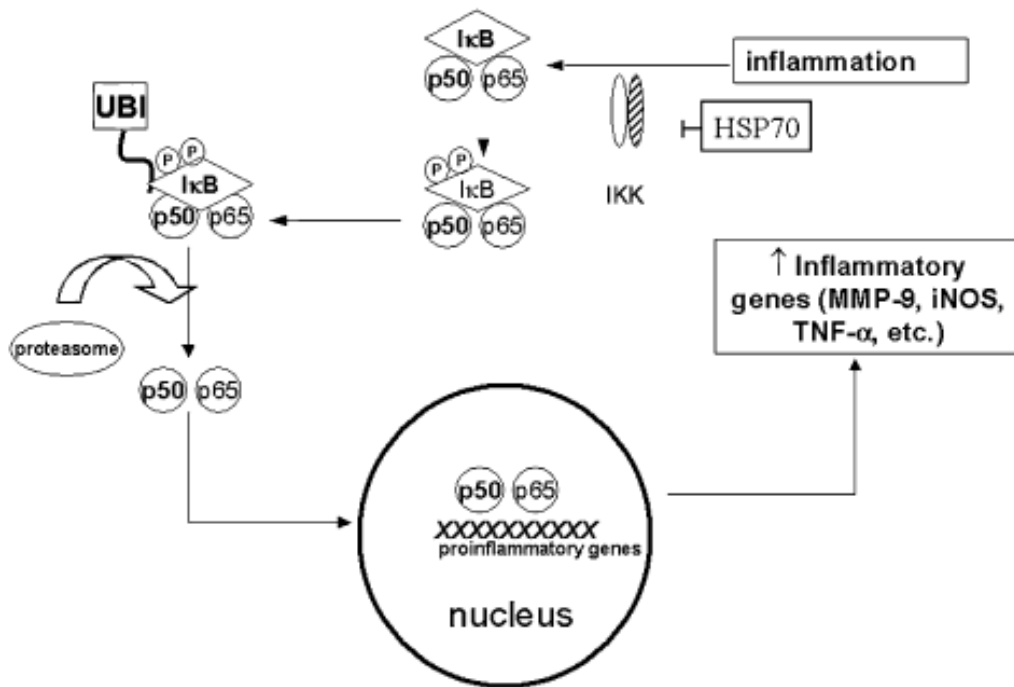
Bu sonuçla; HSP 70 salınımının artması, anti- apoptotik proteinleri ve mekanizmaları uyararak apoptozu engellediği gösterilmiştir. Şekil - 2'de HSP 70'in apoptoz'daki etki mekanizması gösterilmiştir(41).



Şekil 2: HSP 70 ve Apoptoz arasındaki ilişki (41)

HSP 70 ve enflamasyon cevap arasındaki ilişki;

Günümüzde immün yanıtın düzenlenmesinde, transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NFkB) rol alır. Normal hücrenin stoplazmalarında inaktif halde bulunan NFkB ve Ikb, oksidatif stres, iskemi, endotoksin maruziyetinde aktive olur. Ikb kinaz (IKK) aktif hale gelerek Ikb fosforillenir. Protezom parçalanır ve NFkB kontrolünde nükleusta translokasyon olur. Sonuçta inflamasyondan sorumlu genlerin (MMP-9, TNF-alfa, IL-1, COX-2 ...) salınımının da artma olur(22,31). Şekil -3 te HSP 70'in inflamatuvar cevabın düzenlenmesindeki rolü gösterilmiştir(41).



Şekil - 3 : HSP 70 ve inflamasyon cevap arasındaki ilişki(41).

Ran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HSP 70 artmış salınımının IKK'yi inhibe ederek IκB fosforilasyonunu engeller ve protozom parçalanması önlenerek sitokinlerin salınımı için nükleus uyarılamaz(7,32,36,41).

Meng ve Harken, HSP 70 artmış salınımının monositler/makrofajlar da inflamatuvar cevapta, TNF-Alfa düzeyini azalttığı gösterilmiştir(15,32,41).

Yenari ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, artmış HSP 70 salınımı olan astrosit hücrelerinde Matriks Metallo Proteinaz-9 (MMP-9) ve NFκB düzeylerinin azaldığını göstermişler. Apoptotik uyarılardan, TNF-Alfa salınımının artımı proenflamatuvar olarak bilinirler. HSP 70, TNF-Alfa düzeyini düşürerek etkilidir. Sonuçta enflamasyon cevabının azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir(41).

HSP 70'in hücrelerdeki enflamasyon cevabının azaltılmasındaki mekanizma kesin olarak açıklanamamıştır(36,41).

2.2.6. Geranylgeranylacetone (GGA);

GGA; Japonya'da geliştirilmiş anti ülser ajanıdır. Japonyada deneysel ve klinik çalışmalarında kullanılmaktadır. GGA, yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda mide asit salgısını azaltmadığı, mukus salgısını arttırdığı ve mukazal kan dolaşımını arttırarak mukozanın bütünlüğünün korunmasında yardımcı olduğu gösterilmiştir(38). Retinoid iskeleti bulunan acyclic isopronoid yapısındadır(17).

İnsanlarda tedavi amacıyla kullanılan maksimum doz 2.5 mg/kg olarak belirtilmiştir(27). Deneysel çalışmalarda, LD50 dozu; 15.000 mg/kg oral ,4.000 mg/kg intra-peritoneal kullanım olduğu gösterilmiştir(38).

1996 yılında deneysel çalışmalarda GGA'nın, HSP 70 salınımını arttırıcı etkisi olduğu gösterilmiştir(40).

GGA, mide mukozası, bağısıklar, karaciğer, kalp, retina, ve sinir sisteminde HSP 70 salınımını arttırdığı gösterilmiştir(17).

Hiroshi YASUDA ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmayı yayınlamışlar. Deneysel olarak mice'larda kalıcı a. Cerebri media (MCA) tıkanması oluşturulmuştur. GGA'nın sınırlı beyin iskemisindeki etkileri incelenmiştir. GGA, lezyon oluşturulmadan 1 saat önce intra peritoneal verilerek doza bağımlı etkisini incelemişler. Deneysel çalışmanın sonucunda, GGA' nın nekroz hacmindeki azalma ve HSP 70 salınımındaki artış yapma etkisinin doza bağılı olarak değıştiğı gösterilmiştir(40).

Yasuyuki NAGAİ ve arkadaşları da 2004 yılında daha kapsamlı bir çalışma yayınlamışlar. Deneysel olarak ratlarda kalıcı MCA tıkanması yapılarak lezyon oluşturulmuş. GGA'nın doza ve veriliş zamanına göre etkileri incelenmiştir. Deneysel çalışmanın sonucunda; GGA'nın lezyon oluşturulmadan 48 saat önce ve 800 mg/kg oral verildiğinde, nekroz hacmindeki azalma ve HSP 70 salınımındaki artış yapma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Lezyon oluşturulduktan 48 saat sonraki deneysel çalışmanın sonucunda, GGA' nın nekroz hacmindeki azalma ve HSP 70 salınımındaki artış yapma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Deneysel çalışma da GGA'nın oral olarak kullanıldığında maksimum etkinin doz ve zamana bağılı olarak yaralanma sonrası koruyucu etkisinin değıştiğı gösterilmiştir(27).

Bizde çalışmamızda GGA'nın deneysel akut omurilik yaralanmalarında sekonder yaralanma üzerini etkilerini inceledik. GGA'nın neuroprotektif etkisini HSP 70

salınımını arttırarak yaptığı deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Fakat mekanizması tam olarak bilinmemektedir(40).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Laboratuvarda üretilmiş, 6 – 8 haftalık erkek Wistar Albino cinsi ratlar kullanılmıştır. Her grupta kullanılan ratlar 150 – 200 gr ağırlığında olacak şekilde hazırlandı.

Deneysel başlamadan 7 gün önce tüm gruplardaki ratlar aynı diyetle beslendiler ve aynı odada tutuldular. Çevre değişikliklerinden etkilenmeleri aynı düzeyde tutulmaya çalışıldı.

Çalışma 5 grup olarak planlandı.

Bunlar;

1. Grup: Kontrol
2. Grup: GGA, intra-peritoneal olarak 200 mg/kg verildi
3. Grup: Omurilik yaralanması yapıldı
4. Grup: Omurilik yaralanması oluşturulmadan 2 saat önce intra-peritoneal olarak 200 mg/kg GGA verildi. GGA verildikten 2 saat sonra omurilik yaralanması oluşturuldu.
5. Grup: Omurilik yaralanması oluşturuldu. Yaralanma oluşturulduktan 2 saat sonra intra-peritoneal olarak 200 mg/kg GGA verildi.

Her grupta 6 adet rat bulunduruldu. Ratlar gruplardan rastgele seçildi.

1. Grup: Kontrol grubudur. ***Omurilik yaralanması oluşturulmayan gruplardaki tanımlanan cerrahi işlemler*** yapıldı. Başka bir müdahale yapılmadı.
2. Grup: Torakolomber bölge traş edilmeden önce 200 mg/kg GGA intra-peritoneal olarak uygulandı. ***Omurilik yaralanması oluşturulmayan gruplardaki tanımlanan cerrahi işlemler*** yapıldı. Başka bir müdahale yapılmadı.
3. Grup: ***omurilik yaralanması oluşturulan gruplardaki tanımlanan cerrahi işlemler*** yapıldı. Başka bir müdahale yapılmadı.
4. Grup: Omurilik yaralanması oluşturulmadan 2 saat önce intra-peritoneal olarak 200 mg/kg GGA verildi. GGA verildikten 2 saat sonra ***omurilik yaralanması oluşturulan gruplardaki tanımlanan cerrahi işlemler*** yapıldı.
5. Grup: ***Omurilik yaralanması oluşturulan gruplardaki tanımlanan cerrahi işlemler*** yapıldı. Bu grup ta omurilik yaralanması oluşturulduktan 2 saat sonra intra-peritoneal olarak 200 mg/kg GGA verildi.

3.1. Anestezi

Cerrahi işlemler başlamadan önce ratlar IM 10 mg/kg Xylazin (Rompun, Bayer) ve 20 mg/kg Ketamin (Ketolar, Eczacıbaşı) uygulanarak anestezi sağlandı.

3.2. Cerrahi işlemler

Cerrahi işlemler iki şekilde planlandı.

1-Omurilik yaralanması oluşturulmayan gruplardaki cerrahi işlemler

Ratlar seçildikten sonra prone pozisyonunda operasyon masasına yatırıldı. Torakolomber bölge traş edildi. Torakolomber bölge % 10 Polyvidon İyot (Batticon) solüsyonu ile temizlenerek sterilite sağlandı. Th 6 – Th 10 arasında cilt insizyonunu takiben Th 8 düzeyinde mikro-disektöler yardımıyla laminalar ve fasetler bilateral ortaya kondu. Th 8 total laminektomi ve bilateral fasetektomi yapıldı. Bu düzeyde omurilik tamamen görülecek şekilde ortaya çıkarıldı. Hemostazı takiben katmanlar anatomik pozisyonuna uygun olarak 3/0 ipek ile kapatıldı. Cerrahi işlem tamamlandıktan 24 saat sonra intrakardiyak % 10 formaldehit ile ratlar öldürüldü. İnsizyon bölgesi tekrar açıldı. Th8 düzeyinde omurilik proksimal ve distalden serbestleştirildi. Omurilik iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan birisi patolojik inceleme için % 10'luk formaldehit içine konuldu. Diğer parçada İmmünobiyokimyasal çalışma için saklama kabına konuldu ve - 80°C derin dondurucuya yerleştirildi.

2- omurilik yaralanması oluşturulan gruplardaki cerrahi işlemler

Ratlar seçildikten sonra prone pozisyonunda operasyon masasına yatırıldı. Torakolomber bölge traş edildi. Torakolomber bölge % 10 Polyvidon İyot (Batticon) solüsyonu ile temizlenerek sterilite sağlandı. Th 6 – Th 10 arasında cilt insizyonunu takiben Th 8 düzeyinde mikro-disektöler yardımıyla laminalar ve fasetler bilateral ortaya kondu. Th8 total laminektomi ve bilateral fasetektomi yapıldı. Bu düzeyde omurilik tamamen görülecek şekilde ortaya çıkarıldı. Sonra

Th8 düzeyinde omuriliğe ekstra dural olarak sağ taftan, kapanma basıncı 76 gr, yana kıvrık standart Yaşargil anevriza klibi ile omurilik yaralanması yapıldı. Anevrizma klibinin uç kısmı omuriliğin sol tarafında görüldü. Anevrizma klibinin omuriliği çepeçevre sardığı görüldü ve klip 10 sn süre ile kapalı tutuldu. Anevrizma klibi süre bittikten sonra omurilik üzerinden çıkarıldı. Hemostazı takiben katmanlar anatomik pozisyonuna uygun olarak 3/0 ipek ile kapatıldı. Cerrahi işlem tamamlandıktan 24 saat sonra intrakardiyak % 10 formaldehit ile ratlar öldürüldü. İnsizyon bölgesi tekrar açıldı. Th8 düzeyinde omurilik proksimal ve distalden serbestleştirildi. Omurilik iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan birisi patolojik inceleme için % 10'luk formaldehit içine konuldu. Diğer parçada İmmünohistokimyasal çalışma için saklama kabına konuldu ve -80°C° derin dondurucuya yerleştirildi.

3.3. PATOLOJİK İNCELEME

Bu çalışma A.D.Ü Patoloji A.D da yapılmıştır.

İnceleme için tüm tokular %4'lük formalin ile 24 saat tespit edildi. Dokular rutin doku takip işlemine alındı. Daha sonra parafin bloklara gömülen dokulardan 4µm' lik en az 10 seri kesit alındı. Hematoksilen – Eozin ile boyalı preparatlar ışık mikroskopunda incelendi. En geniş nekroz alanı içeren kesitlerde µm oküler ile bir kesitteki toplam nekroz alanı ölçüldü.

Ölçümde; ölçülen birim/ oküler x objektif = mm² alan kullanıldı.

3.4. İMMÜNO BİYOKİMYASAL İNCEME

Bu çalışma A.D.Ü Biyokimya A.D yapılmıştır.

DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI:

Dokuların homojenezasyonu, doku homojenizasyon tamponu ile 1:20(w/v) olacak şekilde yapıldı. doku homojenizasyon tamponu (1 Mm Ph : 7.4); fenilmetilsülfanilflorid ($C_7H_7HPO_4$, Sigma, Kat. No: P-7626) disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4, 2H_2O$, MERCK, Kat. No. K25979680), Potasyum dihidrojen fosfat(H_2KPO_7 , MERCK, Kat. No. A986373), etilenediamin tetraasetik asid disodyum tuzu (Na_2EDTA , Sigma, Kat. No: E-1644) kullanılarak hazırlandı.

TNF – Alfa düzeyinin Saptanması

Doku homojenatlarında, Rat TNF-Alfa saptanması için üretilmiş olan ticari kit (BİOSOURCE İmmünossay Kit, Katolog No: KRC3011, Biosource International, Inc, California, USA) kullanıldı. Sonuçlar Mikroplate okuyucuda direkt olarak standart eğri yoluyla saptandı. Daha sonra yaş doku başına hesolanıo, sonuçlar TNF- Alfa /gr yaş doku olarak verildi.

HSP 70 düzeyinin Saptanması

Doku homojenatlarında, Rat HSP 70 saptanması için üretilmiş olan ticari kit (StresXpress ELISA Kit, Katolog No: EKS-700B) kullanıldı. Sonuçlar Mikroplate okuyucuda direkt olarak standart eğri yoluyla saptandı. Daha sonrada yaş doku başına hesaplanıp, sonuçlar HSP70/gr yaş doku olarak verildi.

Myeloperoksidaz (MPO) düzeyinin saptanması

Dokular 50 mM fosfat tamponu (Ph: 7.4) bir proteaz inhibitörü olan 0.2 mikroM fenilmetilsülfonilflorid ($C_7H_7FO_{25}$, Sigma, Katolog No: P-7626) ve etilendiamintetraasetik asid ($C_{10}H_{16}N_2O_6$, Sigma Katolog No: E-9884) içeren bir tamponda 1/10 (w/v) olacak şekilde + 4 C' de 30 saniye aralıklarla POTTER S (B.BRAUN, Germany) marka homojenizatör ile homojenize edildi. Daha sonra dokulardaki enzim aktivitesi için 3,3',5,5'-terametilbenzidin'in Myeloperoksidaz ile katalizlenmesi incelendi. Reaksiyon H_2O_2 ile başlatılarak 37C 'de gerçekleştirildi. Absorbans artışı 655 nm'de Shimadzu UV (Ultraviole) 160 spektrofotometresinde izlenmiştir. Enzim aktivitesi U/ gr yaş doku olarak verildi.

3.5. İstatistiksel çalışma

Yapılan deneysel çalışma sonucunda elde edilen değerler, gruptaki bütün sonuçlar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasında ki

sonuçların karşılaştırılmasında, T- testi kullanıldı. Ortalama \pm Standart Hata (Mean \pm SEM) kullanıldı. $P < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

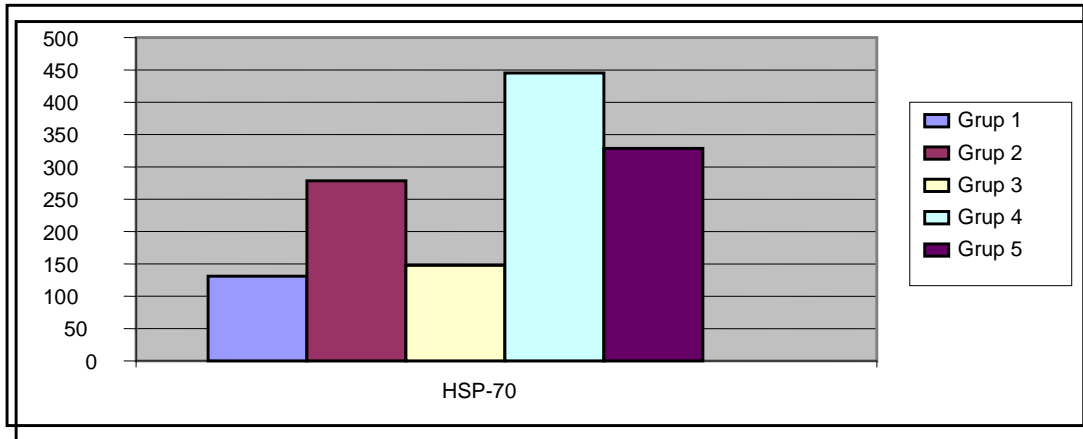
4.1. HSP 70 değerleri

Doku örneklerinin hazırlanması ve HSP 70 düzeylerinin saptanması için yapılan çalışmalar uygulandı. HSP 70 düzeyleri gruplarda aşağıda ki tabloda belirtildiği gibi bulunmuştur

	1.Grup	2.Grup	3. Grup	4. Grup	5.Grup
Ortalama	131.36	279.61	148.72	445.30	389.33
Standart hata	27.15	65.73	15.69	50.16	14.13

Tablo – 4 : HSP 70 düzeyleri (ng / gr yaş doku)

Bu sonuçların grafik ile şekillendirilmesi aşağıdaki gibidir.



GRAFİK - 1 : HSP 70 düzeyleri (ng / gr yaş doku)

Sonuç olarak:

1- Travma oluşturulmayan gruplar karşılaştırıldı (Grup1 ve Grup2). GGA verilmesinin omurilik dokusundaki HSP 70 düzeylerini arttırdığı görüldü. Fakat bu sonuç istatistiksel olarak sınırda değerlendirildi ve **anlamli bulunmadı**.

$P= 0.06 (P>0.05)$

2- Travma oluşturulan grup (Grup3) ile kontrol grubu (Grup1) karşılaştırıldı. Grup 3 'de omurilik dokusundaki HSP 70 düzeylerinde artış görüldü. Bu beklediğimiz bir sonuçtur. Stresin (yaralanma) HSP 70 salınımını arttırdığı bilinmektedir. Fakat artış istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı**.

$P=0.5 (P>0.05)$

3- Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup4). Yaralanmadan 2saat önce GGA verilmesi (Grup 4) omurilik dokusundaki HSP 70 düzeyini belirgin olarak arttırdığı görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulundu**.

$P= 0.00 (P<0.05)$

4- Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup5). Yaralanmadan 2saat sonra GGA verilmesi (Grup5) omurilik dokusundaki HSP 70 düzeyini belirgin olarak arttırdığı görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulundu**.

$P= 0.00 (P>0.05)$

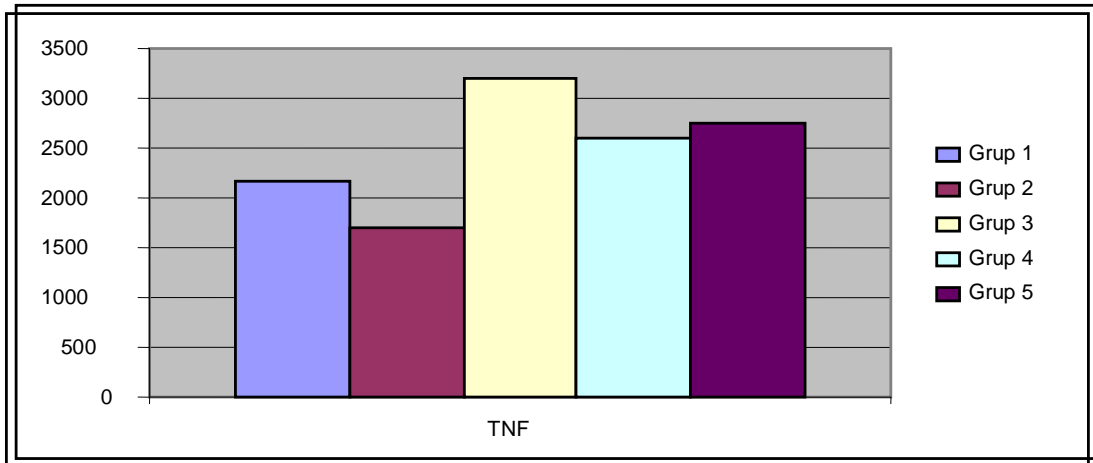
4.2. Tümör Nekroz Faktör – Alfa(TNF-Alfa) değerleri

Doku örneklerinin hazırlanması ve TNF-Alfa düzeylerinin saptanması için yapılan çalışmalar uygulandı. TNF-Alfa düzeyleri gruplarda aşağıda ki tabloda belirtildiği gibi bulunmuştur.

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Ortalama	2169.90	1698.00	3203.91	2598.79	2751.97
Standart hata	330.64	304.14	474.18	160.44	212.98

Tablo – 5 : TNF-Alfa düzeyleri (ng/gr yaş doku)

Bu sonuçların grafik ile şekillendirilmesi aşağıdaki gibidir.



Grafik – 2 : TNF-Alfa düzeyleri (ng/gr yaş doku)

Sonuç olarak:

1- Travma oluşturulmayan gruplar karşılaştırıldı (Grup1 ve Grup2). GGA verilmesinin TNF-Alfa düzeylerini düşürdüğü görüldü. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı**.

P= 0.31 (P>0.05)

2-Travma oluşturulan grup (Grup3) ile kontrol grubu (Grup1) karşılaştırıldı. Grup 3 'de TNF-Alfa düzeylerindeki artış belirgin olarak görüldü. Sonuçlar istatistiksel olarak beklediğimiz gibi **anlamli bulundu**.

P=0.02 (P<0.05)

3-Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup4). Yaralanmadan 2saat önce GGA verilmesi (Grup 4) dokudaki TNF-Alfa düzeyini beklediğimiz gibi belirgin olarak düşürdüğü görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulundu**.

P= 0.03 (P<0.05)

4-Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup5). Yaralanmadan 2saat sonra GGA verilmesi (Grup5) dokudaki TNF-Alfa düzeyini düşürdüğü görüldü. Fakat bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı**.

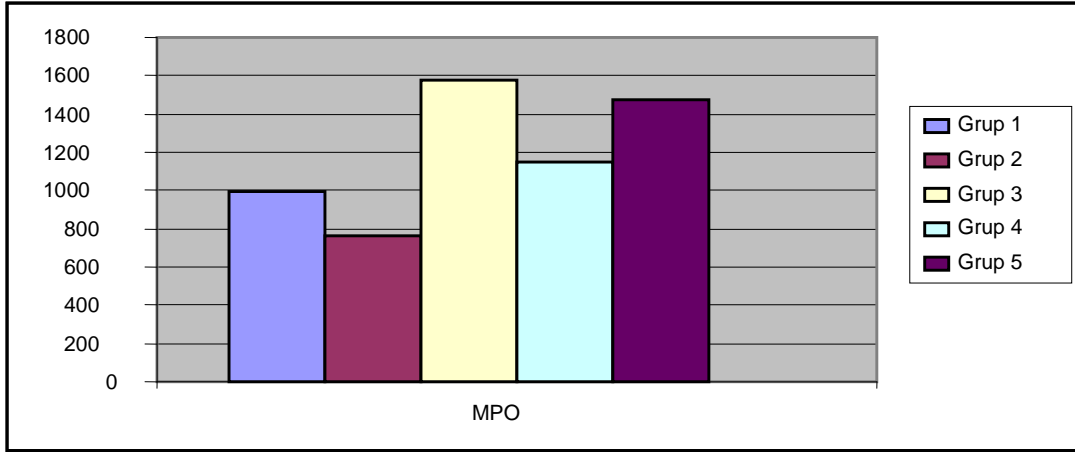
P= 0.14 (P>0.05)

4.3. Myeloperoksidaz (MPO) değerleri

Doku örneklerinin hazırlanması ve MPO düzeylerinin saptanması için yapılan çalışmalar uygulandı. MPO düzeyleri gruplarda aşağıda ki tabloda belirtildiği gibi bulunmuştur.

	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Ortalama	997.55	760.06	1580.23	1450.25	1475.16
Standart hata	313.21	101.04	160.44	289.58	247.03

Tablo - 6 : MPO düzeyleri (U/gr yaş doku)



Grafik – 3 : MPO düzeyleri (U/gr yaş doku)

Sonuç olarak:

1- Travma oluşturulmayan gruplar karşılaştırıldı (Grup1 ve Grup2). GGA verilmesinin MPO düzeylerini düşürdüğü görüldü. Fakat bu sonuçlar istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı.**

$$P= 0.48 (P>0.05)$$

2- Travma oluşturulan grup (Grup3) ile kontrol grubu (Grup1) karşılaştırıldı. Grup 3 'de MPO düzeylerindeki artış görüldü. Fakat sonuçlar istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı.**

$$P=0.24 (P>0.05)$$

3- Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup4). Yaralanmadan 2saat önce GGA verilmesi (Grup 4) dokudaki MPO düzeyini düşürdüğü görüldü. Fakat bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı.**

$$P= 0.07 (P<0.05)$$

4- Travma oluşturulan gruplar karşılaştırıldı (Grup3, Grup5). Yaralanmadan 2saat sonra GGA verilmesi (Grup5) dokudaki MPO düzeyini düşürdüğü görüldü. Fakat bu sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı.**

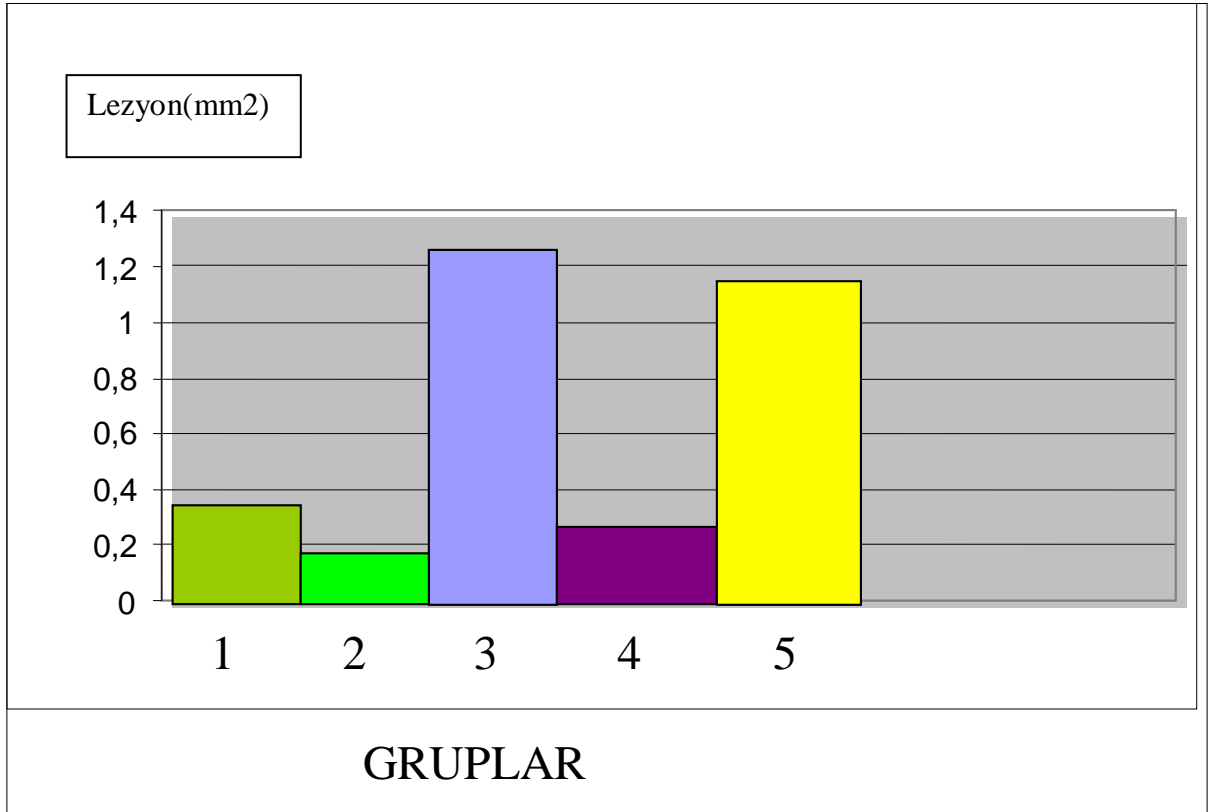
$$P= 0.14 (P>0.05)$$

4.4. İskemi ve nekroz alanının değerlendirilmesi

Dokuların patolojik olarak hazırlanması için yapılan işlemler uygulandı. İskemi ve nekroz görülen alanlar belirlendi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi bulundu.

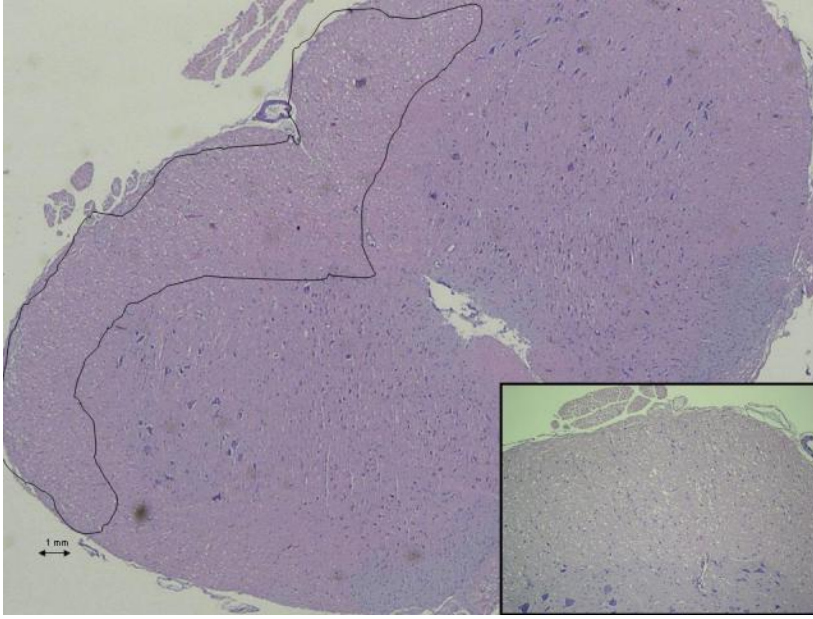
	1.Grup	2.Grup	3.Grup	4.Grup	5.Grup
Ortalama	0.36	0.16	1.28	0.28	1.18
Standart hata	0.05	0.05	0.07	0.03	0.05

Tablo - 7: İskemi ve nekroz alanı (mm²)

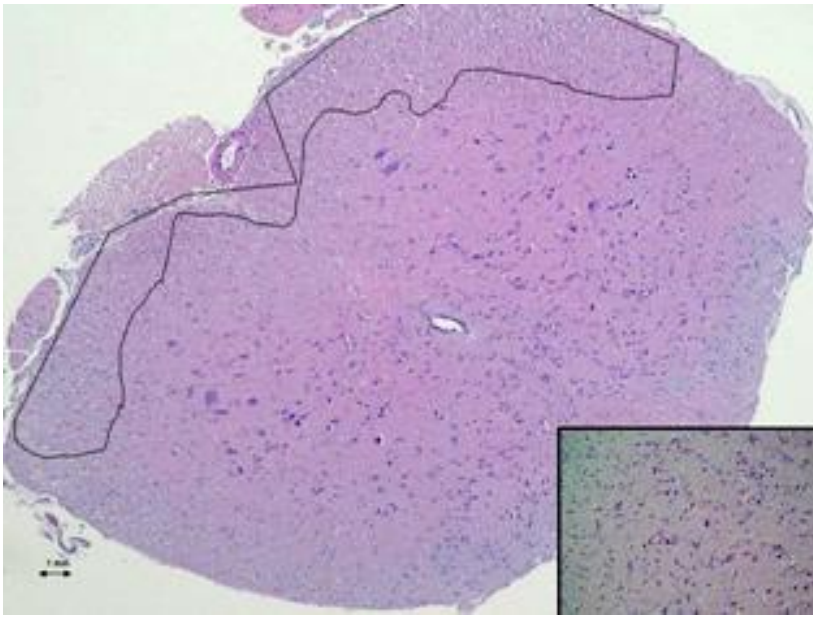


Grafik - 4: İskemi ve Nekroz alanı (mm²)

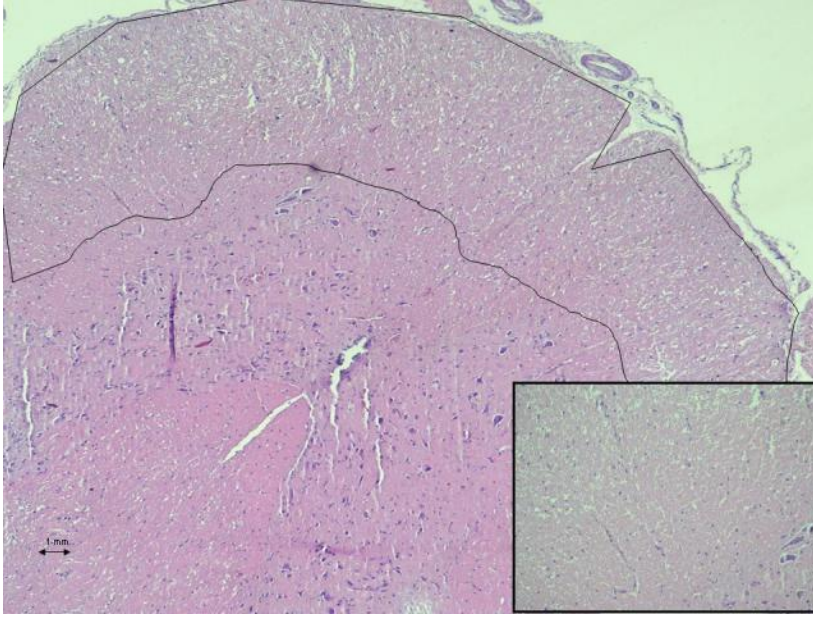
Aşağıda, her gruptan bir adet omurilik yaralanma bölgesinden alınan resimler gösterilmiştir.



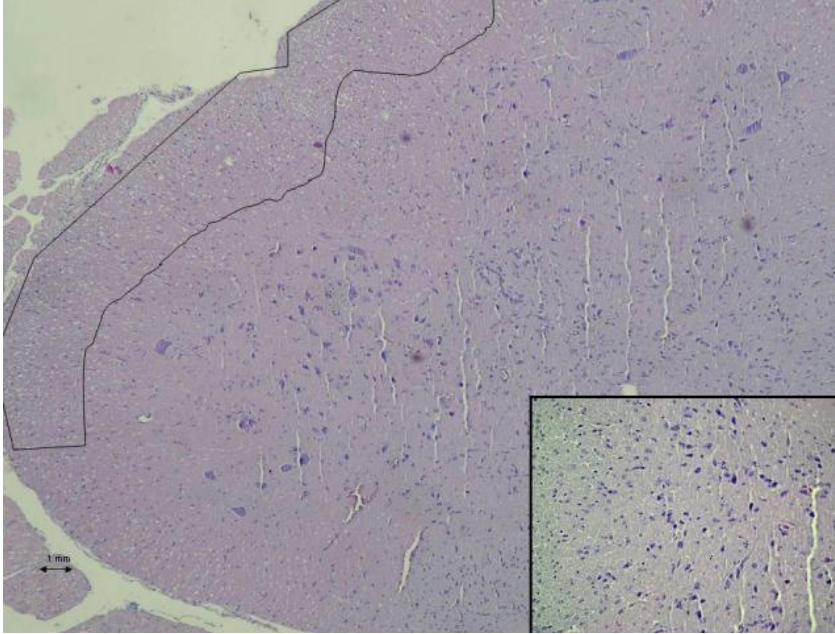
Resim 1: 1.Grup omuriliğın patolojik olarak inceleme görüntüsü.



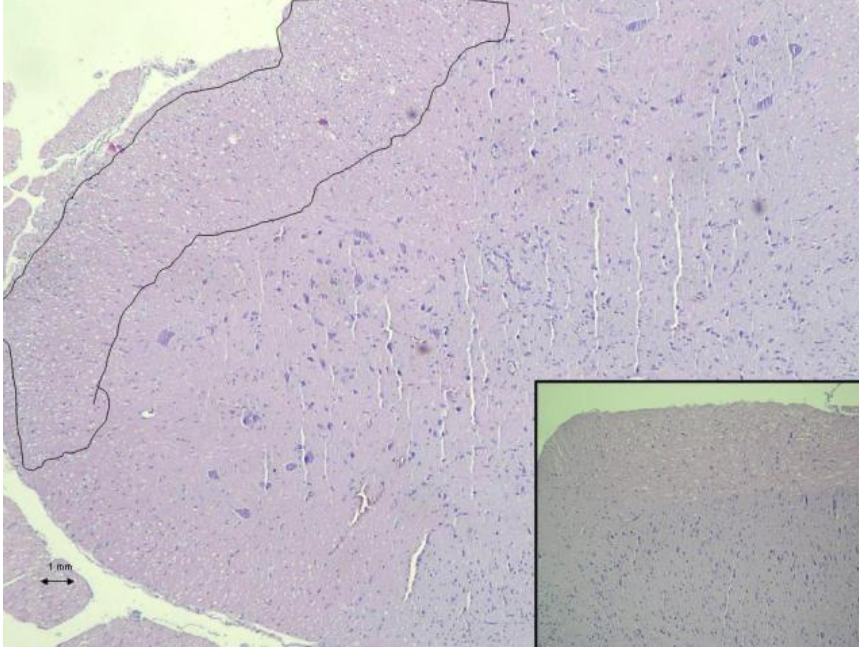
Resim 2: 2.Grup omuriliğın patolojik olarak inceleme görüntüsü



Resim 3: Grup omuriliğin patalojik olarak inceleme görüntüsü



Resim 4: 4.Grup omuriliğin patalojik olarak inceleme görüntüsü



Resim 5: 5.Grup omuriliğın patolojik olarak inceleme görüntüsü

Sonuç olarak:

GGA, omurlık dokusunundaki ikincil yaralanma düzeyini azaltıcı etki yapmaktadır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu etki görülmektedir.

1- Yaralanma oluşturulmayan gruplar karşılaştırıldı(Grup1 ile Grup2). GGA (torakolomber bölge traş edilmeden önce) verilen grupta (Grup2) iskemi ve nekroz alanının daha az olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak belirgin olarak **anlamlı bulundu.**

P = 0.00 (P < 0.05)

2- Yaralanma oluşturulan iki grup karşılaştırıldı(Grup3 ile Grup4). Yaralanmadan 2 saat önce GGA verilen grupta(Grup4) iskemi ve nekroz alanının belirgin olarak azalttığı görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak belirgin olarak **anlamlı bulundu.**

P = 0.00 (P<0.05)

3- Yaralanma oluşturulan iki grup karşılaştırıldı(Grup3 ile Grup5). Yaralanmadan 2 saat sonra GGA verilen grupta (Grup5) iskemii ve nekroz alanını kısmen azalttığı görüldü. Fakat sonuç istatistiksel olarak **anlamli bulunmadı.**

P = 0.28 (P>0.05)

4- Yaralanma oluşturulan ve GGA verilen iki grup karşılaştırıldı(Grup4 ile Grup5) Omurilik yaralanmasından 2 saat önce GGA verilen grupta (Grup4) iskemii ve nekroz alanında, yaralanmadan 2 saat sonra GGA verilen gruba(Grup5) göre azalma olduğu görüldü. Bu sonuç istatistiksel olarak yüksek derecede **anlamli bulundu.**

P = 0.00 (<0.05)

5. TARTIŞMA

Omurilik yaralanmaları son 50 yıl içinde hem tedaviye yönelik çalışmalar hemde sıklığında artış bulunmaktadır (2,16,21). Omurilik yaralanması, bağımsız hayat süren bireyin günlük ihtiyaçları için hatta nefes alabilmek için başka bireylere bağımlı hala gelebilmektedir. Kişisel bağımlılık dışında sosyal ve ekonomik etkileri çok ağırdır. A.B.D omurilik yaralanmasının yıllık maliyeti 10 milyon Dolar olarak tahmin edilmektedir (33).

M.Ö 2.yüzyılda Galen ile başlayan ve 1911 yılında Allen ile devam eden çalışmalar evrensel ve etkili bir tedavinin geliştirilmesine hala neden olamamıştır (2,16,33).

Santral sinir sisteminde nöronal rejenerasyon memeli türlerinde olmadığı bilinmektedir(39).

Deneysel çalışmalarda omurilik yaralanmasının sadece travma nedeniyle olmadığı gösterilmiş. Travmanın oluşundan itibaren ikincil hasarlanma merdiven basamakları şeklinde devam ettiği gösterilmiş. Çalışmalarda bu ikincil hasarlanmayı en az düzeyde tutmaya yönelmiştir(2,10,16,21,22).

İkincil hasarlanmayı başlatan nedenin yetersiz perfüzyon olduğu ve bunun sonucunda sitokinlerin lezyon bölgesinde birikmesi ilk basamağı oluşturduğu düşünülmektedir(2,16,22,33).

Travma sonrası omurilikte hücrelerin apoptoz miktarında artış olduğu gösterilmiş (20). Çalışmalar nöroprotektif ajanlar üzerinde yoğunlaşmıştır(2).

Japonya'da antiülser ajanı olarak deneysel ve klinik çalışmalarda GGA(Geranylgeranylaseton)'nun kullanılmaya başlanılmış. Bu ajanın sitoprotektif etkileri olduğu gösterilmiştir.1996 yılında Rokutan tarafından GGA'nın HSP 70 salınımını dokularda arttırdığı gösterilmiş. Deneysel çalışmalar sonucunda GGA'nın HSP 70 salınımını arttırdığı ve sitoprotektif etkileri deneysel çalışmalarda; karaciğer, retina, beyin, bağırsak ve mide hücrelerinde gösterilmiş(41).

HSP 70 salınımının artması antiapoptotik mekanizmada görevli proteinlerin artışına yol açmıştır. bcl-2 geni bunlardan en önemlisidir. Kaspazlara bağlı ve kaspazlardan bağımsız apoptotik mekanizmayı bloke ettiği, antiapoptotik etkili olduğu belirtilmiştir. Lezyon bölgesinde enflamatuar hücrelerin artışına yol açan ve apoptotik mekanizmada rol alan TNF-Alfa düzeyini düşürdüğü gösterilmiş. MPO(Myeloperoksidaz) lezyon bölgesinde artması, enflamatuar hücrelerin

aktivitesini gösterdiği görülmüş. HSP 70 lezyon bölgesindeki enflamatuar cevabı azalttığı ve hücre koruyucu olduğu düşünülmüş(40,41).

HSP 70 enflamasyon mekanizmasında IKK'yi bloke ederek NFkB aktive olmasını engeller. NFkB, TNF-Alfa, MMP-9 ve COX-2 enflamatuar sitokinlerin salınımını artırır. Böylece HSP 70 bu mekanizmalarla etkili olduğu gösterilmiş (41).

Bizim çalışmamızda; GGA'nın omurilikte travmatik yaralanma yapılmadan 2 saat önce verilmesi sonucu iskemi ve nekroz alanını azalttığını gösterdik. Fakat omurilikte travma yapıldıktan sonra 2 saat sonra GGA verdiğimizde iskemi ve nekroz alanında anlamlı bir azalma yapmadığını gördük.

HSP 70 salınımının da artış aynı şekilde 2 saat önce GGA verilen grupta anlamlı bulundu. 2 saat sonra GGA verilen grupta anlamlı derecede artış olmadığı gösterildi.

TNF-Alfa düzeyleri değerlendirildiğinde 2 saat önce GGA verilen grupta anlamlı derecede azalma olduğu gösterildi. 2 saat sonra GGA verilen grupta azalma anlamlı derecede olmadığı gösterildi.

MPO düzeylerindeki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Litaratürdeki çalışmalarda da GGA'nın hasar oluşturulmadan önce verildiğinde anlamlı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamıza katkıda bulunmuştur.

2004 yılında YASUDA H. ve arkadaşları; Kalıcı serebral iskemide GGA'nın etkisini ratlarda incelemişler. Deneysel olarak kalıcı MCA oklüzyonu yapılmıştır.

GGA oklüzyon yapılmadan 1 saat önce ve oklüzyon yapıldıktan 1saat sonra intraperitoneal olarak 200 ve 1000 mg/kg verilmiş. 24 saat sonra serebral dokuda iskemi ve nekroz alanını incelemişlerdir.

Oklüzyon oluşturulmadan 1 saat önce 200 mg/kg GGA verilenlerde iskemi ve nekroz alanında azalma olmadığı görülmüştür.

Oklüzyondan 1 saat önce 1000 mg/kg GGA verilenlerde iskemi ve nekroz alanında azalma gösterilmiş. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. $P= 0.01(P<0.05)$

Fakat oklüzyondan 1 saat sonra 200 ve 1000 mg/kg GGA verilenlerde iskemi ve nekroz alanında azalma görülmemiştir.

HSP 70 salınımındaki artış değerlendirilmiş. Oklüzyondan 1h önce 1000 mg/kg intraperitoneal verilenlerde HSP 70 salınımındaki artış gösterilmiştir. $P=0.01(P<0.05)$ Fakat oklüzyondan 1 saat sonra verilenlerde GGA'nın HSP 70 salınımında artışa neden olmamıştır.

Oklüzyondan 1 saat önce ve 1 saat sonra GGA verilmesinin HSP 70 salınımında artışa neden olmadığı gösterilmiştir (40).

2004 yılında NAGAI Y. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; Oral olarak GGA' nın doz aralıklarını ve uygulama aralıklarını değiştirerek deneysel olarak A.Cerebri Media (MCA) oklüzyonu yapılan serebral iskemideki etkilerini incelemişlerdir.

Serebral iskemi oluşturulmadan önce 800 mg/kg GGA verilmesi durumunda iskemi ve enfarkt alanında azalma olduğu görülmüştür. $P<0.05$

48 saat sonra 800 mg/kg GGA verilmesinin serebral iskemi ve nekroz alanını azaltmadığı gösterilmiştir.

200,400 mg/kg dozundaki GGA uygulaması sonrasında serebral iskemi ve nekroz alanında azalma olmadığı gösterilmiştir.

HSP 70 salınımindaki artışlar incelendiğinde, A.Cerebri Media (MCA) oklüzyonu yapılmadan 48 saat önce 800mg/kg GGA verilenlerde belirgin olduğu görülmüş.(P<0.05) 48 saat sonra GGA verilenlerde HSP 70 artışı anlamlı bulunmamıştır.

GGA'nın 100 mg/kg 8 gün uygulandığında da iskemi alanının azalması ve HSP 70 salınıminin da artış (oklüzyon öncesi ve oklüzyon sonrasında) istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır(27).

2003 yılında M.FUJİKİ ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada; beyinde GGA'nın astrosit aktivasyonunda ve HSP 70 salınım artışıdaki etkileri incelenmiştir. Oral olarak değişik dozlarda (0,100,200,400,600,800,1000 mg/kg) GGA ratlara verilmiştir. Ayrıca anestezi (fenobarbital) uygulayarak ve uygulamayarak 600mg/kg oral GGA verilen gruplar oluşturmuştur.

Anestezi verilmeden yapılan çalışmada 600 mg/kg dozunda HSP 70 salınımindaki artış ve astrosit aktivasyonunu göstergesi olan GFAP (glial fibriler asitik protein) de artış gösterilmiştir. Ama astrositlerde proliferasyon olmadığı görüldü. Fenobarbital alanlarda bu olumlu etkiler görülmemiş. Fenobarbitalin GGA'nın etkisini inhibe ettiği düşünülmüştür(11).

6 . SONUÇ

GGA' nın bizim çalışmamızda ve daha önce yapılmış çalışmalarda gösterildiği gibi sitoprotektif etkili olduğu düşünülmektedir. Fakat sitoprotektif etkinliğini hangi mekanizma ile yaptığı bilinmemektedir. Yapılan çalışmalar HSP 70 salınımını arttırarak yaptığı görüşü ağırlık kazanmaktadır. Apoptoz üzerine inhibe edici etkileri olduğu düşünülmektedir. Apoptoz uyarısı veren hücrelerdeki bozuk protein yapılarının tamirine ve uygun pozisyonda bulunmalarına yardımcı olduğu düşünülmektedir.

GGA dozunun ve uygulanım zamanının en etkin aralığın bulunması ve daha fazla çalışmanın yapılması gerekliliği oluşmuştur.

7.KAYNAKLAR

- 1 - Benjamin I. J, McMillan D.R,Adhern K G, Stress (Heat Shock) Proteins. Molecular Chaperones in Cardiovascular Biology and Disease Circulation Research, 83: 117-132. 1998
- 2 - Benzel E.C, Ferrara L, Omurga ve omurilik yaralanmasının biyomekaniği spinal stabilite. Omurilik ve Omurga cerrahisi (Zileli M. ve Özer A.F ; Editörler), sayfa 797-811. 2002
- 3- Bethea J R, Castro M, Keane R W, Lee T T. Traumatic Spinal cord injury induces nuclear faktor-k B activation. The Journal of Neuroscience, 18(9): 3251-3260. May 1. 1998
- 4 - Collins W F. Historical perspectives on spinal cord injury. Neurotrauma (Narayan R K, Wilberger J E, Povlishok J T.) pp. 1041-1048. 1996
- 5 - Dybdahl B, Wahpa A, Lien E. Inflammatory response after open heart surgery. Circulation. 105:685. 2002
- 6 - Emr M A, Howley S P. Hudgins L A, Varmus H. Spinal cord injury : Emerging concept. National instute of neurological disoders and stroke. Agust 05. 2005
- 7 - Fehrenbach E, Niess A.M, Schlotz E, Passek F. Transcriptional regulation of heat shock proteins in leukocytes of endurance runners. Journal of Applied Physilogy Vol. 89, 704-710. August 2000
- 8 - Fink A. L. Chaperone – mediated protein folding. Physiological Reviews Vol. 79, No.2, page 425-429. April 1999
- 9 - Fleming J.C, Norenberg M D, Ramsay D A, The cellular inflammatory response in human spinal cord s after injury. Oxford Journals Medicine Brain. Volume 129, no.12, pages 3249-3269. 2006

10- Franklin T B, Krueger-Naug A M, Clarke D B, Arrigo A P, Currie R W. The role of heat shock protein 70 and hsp 27 i cellular protection of the central nervous system. Internatinol Journal of Hyperthermia. Volume 21, pages 379 – 392. 5 August 2005

11- Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Ishii K. Astroglial activation accompanies heat shock protein upregulation in rat brain following single oral dose of geranlygeranylacetone. Brain Resrach Volume 991, Pages 254-257. 21 November 2003

12 - Hall E,D, Springer J,E. Neuroprotection and acute spinal cord injury ; A Reappraisal . NeuroRx 1(1) : 80-100. January 2004

13 - Hancı M, Gençosmanoğlu B,E. Omurilik yaralanmalarında sınıflama . Omurilik ve Omurga cerrahisi (Zileli M. ve Özer A.F ; Editörler), sayfa 867-880. 2002

14- Ishii Y, Kwong M K, Caprioli J. Retinal ganglion cell protection with geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer , in rat glaucoma model. İvestigative Ophtalmolgy and Visual Science, Vol. 44, pages 1982-1992. May 2003

15 - Jaattela M, Wising D , Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp 70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase -3 like proteases. The EMBO jounal Vol. 17 No.21 pp. 6124-6134. 1998

16 - Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Temel Nöroşirurji (Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları) Sayfa 1144-1153. 2005

17 - Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M. Pharmacological induction of heat shock proteins alleviates polyglutamine – mediated motor neuron disease. PNAS. Volume 102, no 46 . 16801-16806. November 15. 2005

18 - Keith B. Elkon. Apoptosis. Kelley’s Textbook of Rheumatology.(Edward D.HARRİS, Ralph C. Budd, Gary S. Firestein, Mark C. Genovese..) pages 390-406. 2006

- 19 - Lang-Rollin C, Rideout H, J. Noticewala M. Mechanism of caspase independent neuronal death : Energy depletion and free radikal generation. The Journal of Neuro Science 23 (35) 11015-11025. December 3. 2003
- 20 - Liu X Z, Xu X M, Hu R, Du C, Zhang S X, McDonald J W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. The Journal of Neuro Science Vol. 17, NO.14 PP. 5395-5406. 1997
- 21 - Lobosky C, M. The epidemilogoy of spinal cord injury. Neurotrauma (Raj K. Narayan, J, Wilberger E, Povlishok J, T.) pp. 1049-1073 .1996
- 22- Mautes AEM, Weinzierl M.R, Donovan F, Noble L.J. Vascular events after spinal cord injury : contribution to secondary pathogenesis. Physical Therapy Vol.80, No.7, pages 673-687. July 2000.
- 23 - Mattson M P, Cammandola S. NF-kB neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. The Journal of Clinical Investigation. Vol. 107(3): 247-254. 2001
- 24- Mcclnnes I,B. Cytokine. Kelley's Textbook of Rheumatology.(Edward D.HARRIS, Ralph C. Budd, Gary S. Firestein, Mark C. Genovese at all) pp. 379-389. 2006
- 25 - Mikami T, Sumida S, Ishibashi Y, Otha S. Endurance exercise training inhibits activiy of plasma GOT and liver caspase-3 of rats exposed to stres by induction of heat shock protein 70. J Appl Phisoly 96: 1776-1781. 2004
- 26 - Mosser D. D, Caron A W, Lucie Bourget L, Merin A. B. The Chaperone Function of HSP 70 is reguired for protection against stres-induced Apoptosis. Moleculer and Celuler Biology , vol. 20, No.19, p. 7146-7159. October 2000.
- 27 - Nagai Y, Fujiki M, Inoue R, Uchida S, Çetinalp N E. Neuroprotective effect of geranylgeranylacetone, a noninvazive heat shock protein inducer, cerebral infarction in rats. Neuroscience Letters Volume 374, Issue 3, p. 183-188, 21 February 2005

- 28 - Nakada J, Matura T, Okazaki N. Oral administration of geranylgeranyl acetone improves survival rate in an endotoxin shock model: administration timing and heat shock protein 70 induction. *SHOCK*, Vol. 24, No.5, pp. 482-487, 2005
- 29 - Nishida T, Matura T, Nakada J, Togawa A. Geranylgeranylacetone protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inducing heat shock protein 70. *Toxicology* Volume 219, Issues 1-3, pages 187-196. February 15 2006
- 30 - Park J, Kim I, Oh J, Lee K W. Activation of c-Jun- N- terminal Kinase antagonizes an anti-apoptotic action of Bcl-2 . *The AMERICAN Society for Biochemistry and Molecular Biology* VOL. 272, Number 27, pp. 16725-16728. July 4. 1997
- 31 - Pantoni L, Sarti C, Inzitari D. Cytokines and Cell Adhesion Molecules in Cerebral ischemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 18: 503-513. 1998
- 32 - Ran R, Lu A, Zhang L, Tang Y. Hsp 70 promotes TNF-mediated apoptosis by binding IKK and impairing NF- κ B survival signaling. *GENES and DEVELOPMENT* 18: 1466-1481. 2004
- 33 - Sekhon L H, Fehlings M G. Epidemiology, Demographics and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *SPINE*. Volume 26(24suppl) S2-12. 2001
- 34 - Spinal cord injury: Facts and Figures at a glance – National spinal cord injury statistical center. June 2006
- 35 - Tator C.H, Kaptanoğlu E, Strategies for Neuroprotection after spinal cord injury. *Omurilik ve Omurga cerrahisi (Zileli M. ve Özer A.F ; Editörler)*, sayfa 813-832. 2002
- 36 - Thompson C. B, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *SCIENCE* Vol. 267, no. 5203, pp. 1456-1462, 10 March 1995

- 37 - Torun F, Atar A. Omurilik yaralanması ve değerlendirilmesi. Temel Nöroşirurji. Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları(Editör: Aksoy K.) Sayfa 1156-1163. 2005
- 38 - Ushijima H, Tanaka K.I, Takeda M, Katsu T. Geranylgeranylacetone Protect membranes against Nonsteroidal Anti-Inflammatory drugs. Molecular Pharmacology 68: 1156–1161, 26 July 2005
- 39- Ünlü A, Çolpan E, Çağlar U.H, Yılmaz E, Iskandar B. Regeneration in central nervous system. Journal of neurological science (Turkish) NOROL BIL. D 17:4. 2000
- 40 - Yasuda H, Shichinohe H, Kuroda S, Ishikawa T. Neuroprotective effect of a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone in permanent focal cerebral ischemia. Brain Research, Vol 1032, Issues 1-2, Pages 176-182. January 2005.
- 41 - Yenari M , Liu J, Zheng Z ,Vexler Z, Lee J E, Giffard R D. Antiapoptotic and Anti-inflammatory Mechanism of Heat Shock Protein Protection. New York Academy of Sciences 1053 : 74-83. 2005
- 42 - Yhung W. Spinal cord injury pathophysiology and therapy. Neurotrauma (Narayan R K, Wilberger J E, Povlishok J T.) pp. 1075-1079. 1996
- 43 - Yılmaz N, Pençe S. Kaspazlar. İbni Sina Tıp Dergisi. 7: 127-146. 2002
- 44 - Zheng L, He M, Long M, Blomgran R. Pathogen induced apoptotik neutrophils Express heat shock proteins and elicit activation of human macrophages. The Journal of Immunology: 173, 6319-6326. 2004
- 45 - Zileli M. Omurilik yaralanmasında etyoloji ve prognoz. Omurilik ve Omurga cerrahisi (Zileli M. ve Özer A.F ; Editörler), sayfa 885-892. 2002

8.EKLER

Deneklerde çıkan sonuçlar aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup
1.denek	1030.20	236.26	3470.82	2940.01	1790.64
2.denek	1451.32	1860.12	3738.10	2213.60	2982.40
3.denek	3050.76	2249.20	3494.62	2670.62	2899.58
4.denek	2811.62	1819.96	2649.92	2177.60	3046.72
5.denek	2669.74	2231.66	2594.70	2443.70	2554.70
6.denek	2005.78	1790.84	3275.34	3147.26	3237.82

Tablo : TNF – Alfa düzeyleri (ng/gr doku)

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup
1.denek	51.98	457.05	152.26	455.32	347.64
2.denek	189.96	514.78	217.60	465.64	429.55
3.denek	191.92	182.64	123.50	254.36	417.78
4.denek	49.44	165.80	156.80	417.76	349.56
5.denek	128.78	186.64	106.82	639.50	386.56
6.denek	176.10	170.80	135.34	439.22	404.92

Tablo : HSP – 70 düzeyleri (ng / gr doku)

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup
1.denek	961.52	853.73	3250.0	751.76	571.42
2.denek	302.65	761.79	1752.04	665.95	1200.0
3.denek	942.86	538.23	859.38	1173.33	1430.67
4.denek	1153.10	1016.61	1457.67	1811.76	1357.01
5.denek	2369.23	990.0	1169.62	2486.96	2261.11
6.denek	255.81	400.0	992.68	1811.76	2030.77

Tablo : MPO düzeyleri (U / gr doku)

	1.grup	2.grup	3.grup	4.grup	5.grup
1.denek	0.3	0.2	1.1	0.4	1.0
2.denek	0.4	0.2	1.2	0.2	1.1
3.denek	0.3	0.2	1.5	0.3	1.3
4.denek	0.4	0.2	1.5	0.3	1.3
5.denek	0.4	0.1	1.2	0.2	1.3
6.denek	0.4	0.1	1.2	0.3	1.1

Tablo : Nekroz ve iskemi alanı (mm²)