

**T.C.**  
**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Nöroşirürji Anabilim Dalı**

**Deneyisel Akut Omurilik Kontüzyon Modelinde Hücre Ölüm  
Tiplerinin Kronolojik Olarak İncelenmesi ve Hücre Zedelenme Şekli,  
Şiddeti ve Dağılımının Haritalanması**

**Dr. Selim AYHAN**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA**  
**2010**

**T.C.**  
**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi**  
**Nöroşirürji Anabilim Dalı**

**Deneyisel Akut Omurilik Kontüzyon Modelinde Hücre Ölüm**  
**Tiplerinin Kronolojik Olarak İncelenmesi ve Hücre Zedelenme Şekli,**  
**Şiddeti ve Dağılımının Haritalanması**

**Dr. Selim AYHAN**

**UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır**

**Tez Danışmanı:**  
**Doç. Dr. Atilla AKBAY**

**ANKARA**  
**2010**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında gerekli ortamı sağlayan başta Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Tunçalp Özgen, tez danışmanlığımı üstlenen Sayın Doç. Dr. Atilla Akbay, omurilik yaralanma tekniğini öğreten ve çalışma protokolünün her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Gökhan Bozkurt olmak üzere; eğitimini almaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Kemal Benli, Sayın Prof. Dr. Osman Ekin Özcan, Sayın Prof. Dr. Selçuk Palaoğlu, Sayın Prof. Dr. Nejat Akalan, Sayın Prof. Dr. Servet İnci, Sayın Prof. Dr. İbrahim Ziyal, Sayın Doç. Dr. Hakan Oruçkaptan, Sayın Doç. Dr. Mustafa Berker, Sayın Doç. Dr. Melike Mut, Sayın Yrd. Doç. Dr. Burçak Bilginer'e; çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesini yapan Sayın Doç. Dr. Mutlu Hayran'a, çalışmanın çeşitli aşamalarında katkısı bulunan Nörolojik Bilimler Enstitüsü öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Turgay Dalkara ve Sayın Doç. Dr. Yasemin Özdemir Gürsoy ile Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu'na, çalışmanın immünohistokimyasal ve morfometrik analizlerini yaparak değerli yorumu ile çalışmanın tamamlanmasını sağlayan Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı emekli öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşe Ayhan'a; eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Ailesi'ne; ve beni her zaman destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

## ÖZET

**Ayhan S. Deneysel akut omurilik kontüzyon modelinde hücre ölüm tiplerinin kronolojik olarak incelenmesi ve hücre zedelenme şekli, şiddeti ve dağılımının haritalanması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Uzmanlık Tezi, Ankara, 2010.** Akut omurilik yaralanması tedavisinde birincil ve ikincil hasar mekanizmalarının iyi anlaşılması gerekmektedir. Birincil hasar travmanın şiddeti ile ilgilidir. Birincil hasarı takip eden reaktif patolojik süreç ikincil hasar olarak isimlendirilir ve bu süreç hücre ölümüne kadar uzanabilir. Nekroz ve apoptozun yaralanma sürecinde farklı yer ve zamanlarda etkili olması nedeniyle, bu hücre ölüm mekanizmalarının kronolojik olarak oluşum ve gelişim sürecini, hasar yerindeki coğrafi dağılımını, lezyona kranial ve kaudal yöndeki sağlam ya da az hasarlı bölgelerdeki durumunu ve oranlarını anlamak, bu lezyonlarla başa çıkabilmek açısından önemlidir. Akut omurilik yaralanmalarında hücre ölüm mekanizmalarını karakterize etmek amacıyla yapılan bu çalışmada, denek olarak 35 adet, 200-300gr ağırlığında, erkek Wistar rat kullanılmış ve orta-ağır şiddette, kontüzyon tipi deneysel omurilik yaralanması oluşturulmuştur. Travma sonrası 1, 6, 24, 48, 72 ve 168. saatlerde çıkarılan omurilik segmentleri sırasıyla lezyon merkezi, lezyon merkezi çevresi (kranial ve kaudal yönde) 0.5 cm aralıklar ile alınan toplam 2.5 cm lik omurilik segmentinde lezyon boyunca Hematoksilen Eozin (HE) kesitlerinde nöronal ve glial hasar incelenmiş, paralel kesitler kullanılarak immünohistokimyasal yöntemlerle ssDNA antikoru ile DNA hasarı ve apoptoza uğrayan hücre sayımı, katepsin B antikoru kullanılarak nekroz ve proteolitik enzim hasarı saptanarak elde edilen tüm veriler haritalanmış ve görsel ve sayısal hale getirilmiştir. ssDNA incelemelerinde, en rostral, rostral, santral, kaudal, en kaudal için, ayrı ayrı her grup, istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde zamanla artan DNA zedelenmesi ve apoptotik cisim artışı göstermiştir ( $p < 0.001$ ). Katepsin B'nin omurilik yaralanmasında doku yıkımında 24. saatten itibaren etkili olabileceği izlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışma, deneysel omurilik kontüzyon tipi yaralanma modelinde hem ssDNA hem de Katepsin B bulgularını birarada toparlayan ilk çalışmadır. ssDNA, apoptozis tanı ve değerlendirmesi yanısıra DNA hasarını en erken ve detaylı biçimde gösteriyor olması yanında, kolay uygulanabilirliği, tekrarlanabilirliği de göz önünde tutularak; zedelenme sonrası oluşan patofizyolojik olayların detayının anlaşılmasına yardımcı olacağı ve gelecek çalışmalara temel oluşturacağı düşünülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** akut omurilik yaralanması, apoptoz, katepsin B, nekroz, ssDNA

**Destekleyen Kuruluşlar:** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, 05 D11 105 001.

## ABSTRACT

**Ayhan S. The chronologic evaluation of cell death types and mapping the intensity and the distribution of the injury in an experimental acute spinal cord contusion model. Hacettepe University School of Medicine, Thesis in Neurosurgery, Ankara, 2010.** It is mandatory to understand the primary and secondary injury mechanisms in details in the management of acute spinal cord traumas. The primary injury is correlated with the severity of trauma. It is followed by a reactive pathological phase called secondary injury which may lead to cell death through necrosis and apoptosis. The cell death mechanism varies in different locations and at different time points at the injured spine. To elucidate the underlying injury process, it is important to demonstrate the temporal and spatial distribution pattern of necrotic and apoptotic cells in and around the lesion and at relatively intact areas at the cranial and caudal borders of the injury for relation between the damage and its consequences. To characterize the cell death mechanisms in a moderate-severe acute spinal cord contusion injury model, 35 Wistar male rats, weighing between 200-300gr, were used. Rats were sacrificed 1, 6, 24, 48, 72 and 168 hours after injury, and spinal cord segments of 0.5 cm-thick- were taken in and around the lesion cranially and caudally up to a total of 2.5 cm. These segments were evaluated for neuronal and glial damage by Hematoxylin and Eosin (HE) sections, serial sections were used in immunohistochemical studies with anti-ssDNA antibody to evaluate both DNA damage index and apoptotic counts. Anti-Cathepsin B antibody was used to evaluate necrosis and proteolytic enzyme damage. The final results were mapped in order to visualise the extent, intensity and the distribution for all the parameters examined. Cells subject to DNA damage and apoptotic index was significantly increased in and between each localizations (proximal rostral, rostral, central, caudal and distal caudal) ( $p < 0.001$ ). Cathepsin B seems to have an effect on cell damage at about 24 hours in spinal cord injury. This is the first study which demonstrates the combination of results of ssDNA and Cathepsin B in an experimental acute spinal cord contusion injury model. Since ssDNA immunostaining is easy to perform and can detect DNA damage and apoptosis in earliest phases and in detail; we think this method can be used to search the details of pathophysiologic mechanisms of traumatic spinal cord injury and application is advisable in future studies.

**Key words:** acute spinal cord injury, apoptosis, cathepsin B, necrosis, ssDNA

**Supported by:** Hacettepe University School of Medicine, 05 D11 105 001.

**İÇİNDEKİLER**

<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLolar</b>	<b>ix</b>
<b>GİRİŞ ve AMAÇ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>3</b>
2.1. Omurilik Travmaları	3
2.1.1. Akut Omurilik Hasarında Deneysel Modeller ve Model Seçimi	4
2.1.2. Omurilik Zedelenmesi Patofizyolojisi, Birincil ve İkincil Hasar	5
2.1.3. Omurilik Zedelenmesinde Histopatolojik Değişiklikler	12
2.1.4. Nekroz ve Apoptoz, Benzerlik ve Farkları	14
2.1.5. Apoptozun Omurilik Hasarında Önemi	16
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
3.1. Çalışma Protokolü	18
3.1.1. Deney Grupları	18
3.1.2. Cerrahi İşlemler	19
3.1.3. Histopatolojik İncelemeler	22
3.1.4. İstatistiksel Analiz	23
<b>BULGULAR</b>	<b>24</b>
4.1. HE ve LFB Histokimyası	24
4.1.1. Histopatolojik İnceleme, Hasar Bölgesi / Nekroz Dağılım, Kronolojik Değerlendirme ve Haritalama	24
4.2. ssDNA İmmünohistokimyası ile Yapılan İncelemeler	25
4.2.1. DNA Hasarı, Rostro-Kaudal Dağılım ve Saatlere Göre (Kronolojik) Değerlendirme	25
4.2.2. Apoptoz, Rostro-Kaudal Dağılım ve Saatlere Göre Değerlendirme	28
4.3. Katepsin B İmmünohistokimyası Değerlendirme	33
<b>TARTIŞMA</b>	<b>36</b>
<b>SONUÇ</b>	<b>43</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>44</b>

**SİMGELER ve KISALTMALAR**

AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksil-5-metil-4-isoksazol-propionat
CPP	3-propil-1-fosfonik asit
DNA	Deoksiribonükleik asit
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein
HE	Hematoksilen Eozin
IHC	İmmünohistokimya
LFB	Luxol Fast Blue
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KOB	Kan Omurilik Bariyeri
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
MPS	Metilprednizolon
NMDA	N-metil-D-aspartik asit
PAF	Platelet Aktive edici Faktör
PMNL	Polimorfonükleer Lökosit
ssDNA	Tek sarmal deoksiribonükleik asit
TUNEL	Deoxynucleotidyl transferase biotin nick end labelling

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Apoptoz ve nekroz, benzerlik ve farkları	15
3.1. Deney planı diyagramı	19
3.2. Ratta kontüzyon tipi akut omurilik yaralanması oluşturulması	21
4.1. Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostrale ve kaudale doğru primer hasar dağılımı haritası	25
4.2. Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanma bölgesine göre nükleer DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesinin zamana göre değişimi	26
4.3. Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanmanın yerine göre DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesinin zamana göre değişimi	27
4.4. Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostrale ve kaudale doğru DNA hasarlı hücre yüzdesi dağılımının haritası (anti ssDNA antikoru, IHC)	28
4.5. Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanma bölgesine göre omurilik yüzeyi başına median apoptotik hücre sayısının zamana göre değişimi	29
4.6. Lezyon epimerkezinde, 1. (üstte) ve 48. (altta) saatteki lezyon histopatolojisi	30
4.7. Omurilik yaralanmasından bir hafta sonra en kaudalde yapılan histopatolojik inceleme	31
4.8. Akut omurilik yaralanma modelinde, zamana göre median apoptotik cisim sayısının yaralanma bölgesine göre değişimi	32
4.9. Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostral ve kaudale doğru median apoptotik cisim dağılımının haritası	33
4.10. Katepsin B ile normal omurilik incelemesi	34
4.11. Travma sonrası omurilikte Katepsin B incelemesi	35

**TABLÖLAR**

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Akut omurilik yaralanması evreleri ve önemli patolojik olaylar	14

## GİRİŞ ve AMAÇ

Omurilik yaralanmaları 1900'lü yıllardan beri incelenmektedir. Akut omurilik yaralanmalarında tedavinin planlaması veya yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için birincil ve ikincil hasar mekanizmalarının iyi anlaşılması ve hücresel düzeyde gerçekleşen olayların doğru yorumlanması gerekir. Bu tür yaralanmalarda olumsuz patofizyolojik mekanizmaları durdurabilecek yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için bir asırdan uzun süredir pek çok araştırma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. Birincil hasara bağlı olarak omurilikte hemoraji, ödem, aksonal ve nöronal zedelenme, nekroz, infarkt ve kist oluşumunu takiben demiyelinizasyon gibi erken posttravmatik patolojik değişikliklerin ortaya çıkması Allen tarafından 1914'de gösterilmiştir<sup>4</sup>. Zedelenme sonucu oluşan nekroz, sonraları 'otodestruksiyon' olarak tanımlanmış<sup>65</sup> ve elektronmikroskopik incelemeyle hasar sonrası 15-30. dakikada hemoraji, 4. saatten sonra akson dejenerasyonu, daha sonra iskemik endotel hasarı ve miyelin parçalanması gösterilmiştir<sup>30</sup>. Sonraki birkaç günde progresif akson değişiklikleri ve nekrotik bölgeler ortaya çıkmaktadır<sup>9,42</sup>. Travma sonrasında hasar alanındaki ödem komşu segmentlere yayılır, 24 – 48. saatte hemorajiyle işgal edilmiş hasarlı santral zon nekroza gider; sonra ise bu alanda kavitasyon gelişir. Bu değişiklikler patolojik olarak infarkt görüntüsü çizdiğinden 'posttravmatik infarkt' olarak da isimlendirilir<sup>85</sup>. Travmaya bağlı omurilik yaralanmasında başlangıçtaki mekanik hasarı; iskemi-hemoraji ve ödem varlığında gerçekleşen doku dejenerasyonu izler<sup>4</sup>.

Travma sonrası görülen omurilikteki hücre ölümü, "nekroz" olarak değerlendirilmiş<sup>24</sup>; bu yorum erken hasar döneminde nöron ölüm nedenlerinden biri olan, hücrelerin parçalanıp sitoplazmadan glutamatın açığa çıkması sonucu oluşan "eksitotoksisite" kavramı ile de uyumlu bulunmuştur<sup>93</sup>. Sonraki yıllarda iskemide görülen beyin hücre kayıplarının, apoptoz olarak isimlendirilen programlanmış hücre ölümüne bağlı olduğunun anlaşılması<sup>31,67</sup>; oksijen ve glikozdan yoksun korteks hücre kültürlerinde nöronal apoptoz görülmesi nedeniyle<sup>45</sup> apoptotik hücre ölümünün omurilik yaralanmalarında da mevcut olabileceği düşünülmüştür<sup>73</sup>. Destekleyici bir gelişme olarak oligodendrositlerde travma sonrası hücre kaybına eşlik eden apoptoz varlığının gösterilmesi üzerine insan omurilik hasarında da gecikmiş apoptoz olabileceği fikri desteklenmiştir<sup>17</sup>. Kompresyon hasarı modellerinde rat omuriliğinde,

kontüzyon hasarı modellerinde ise maymun omuriliğinde `biotin nick end labelling (TUNEL)'-pozitivitesi ile karakterli apoptotik oligodendrositler gösterilmiştir<sup>15,52</sup>. Ratlarda omurilik travmasından sonra antiapoptotik bir ajan olan sikloheksimid ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir<sup>58</sup>.

Programlanmış bir hücre ölüm mekanizması olan apoptoz, gen ve protein ekspresyonu gerektirir, DNA'nın düzenli kırılması ile karakterlidir ve membranlar intakttır. Nekrotik ölüm ise tam aksine, hücre şişmesi, membran bütünlüğü kaybı ile karakterlidir, DNA rastgele kırılır. Apoptoz ve nekroz temel mekanizmalar açısından da farklıdır: apoptozda hücre, tamir mekanizmalarını çalıştırarak kendini yenileme çabaları sonuç vermediğinde ölüm kararı verir - bir anlamda intihar eder -, nekroza yol açan zedelenmede ise tamir mekanizmaları da hasarlı olduğundan, hücre ölümü kaçınılmazdır. Her iki ölüm tipinde de bazı ortak mekanizmalar bulunmasına rağmen, akut omurilik yaralanması ve hemen sonrasında gelişen nekroz ve apoptoz gibi farklı hücre ölüm tiplerinin prognoz üzerinde ayrı ayrı etkili olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hücre ölümlerinin tiplenmesi, kronolojik olarak oluşum ve gelişim süreci, travmanın oluşturduğu lezyon ve bu lezyonun kranial ve kaudal sınırlarında yer alan nisbeten daha az hasarlı bölgelerdeki oranları, tedavinin yönlendirilmesi ve yeni tedavi yöntemlerinin etkinliğinin araştırılması açısından önemli parametreler olarak kabul edilmektedir.

Bu çalışmada orta – ağır şiddette bir deneysel omurilik kontüzyon tipi travma modelinde, apoptozis ve nekroz ile giden hücre ölümü tiplerinin histopatolojik ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak saptanması; lezyonun merkezi, rostral ve kaudalinin kronolojik olarak incelenmesi ve zedelenme şekli, şiddeti ve dağılımının haritalanması amaçlanmıştır.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Omurilik Travmaları

Akut travmatik omurilik yaralanmaları, ağır sakatlıklara yol açması nedeniyle, sadece kişiyi değil, tüm toplumu ilgilendiren önemli tıbbi ve sosyoekonomik sorunlardan biridir. Akut omurilik yaralanması insidansı yılda yaklaşık bir milyonda 15 – 40 kişi olarak bildirilmiştir<sup>82</sup>. Omurilik travmalı hastaların en azından yarısı, yaşamlarının üretken evresindeki genç insanlardır. Bu tip hastaların başlangıçta hastanede kalış maliyetleri, takip eden süreçte ise tıbbi bakım masrafları oldukça yüksektir.

Omurilik yaralanmaları konusunda yapılan araştırmaların başlıca amacı hasar sonucu işgörmezliği engellemek veya azaltmak için yeni tedavi yaklaşımları geliştirmektir. Hayvan deneylerinde çok sayıda tedavi yaklaşımı ümit verici olsa da henüz hiçbiri omurilik hasarlı hastalarda başarılı olamamıştır. Herşeye rağmen son yıllarda prospektif, randomize, çift – kör klinik bir çalışmada, farmakolojik ajanlarla nörolojik iyileşmeyi sağlayan iyimser sonuçlar yayınlanmıştır. NASCIS II (The Second National Acute Spinal Cord Injury Study) omurilik hasarlı hastalarda, hasarın ilk 8 saati içerisinde yüksek doz intravenöz metilprednizolonun (MPS) verilip 24 saat süreyle devam edilmesinin nörolojik sonucu iyileştirdiğini göstermiştir<sup>13</sup>. Maryland'ın GM1 klinik çalışmasında GM1 gangliosid ile tedavi edilen hastalar ve plasebo alan grup karşılaştırdığında hasardan sonra bir yıl içerisinde nörolojik iyileşmenin anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir<sup>38</sup>. Her iki çalışmada da MPS ve GM1 gangliosidin travmatik omurilik hasarının vasküler, metabolik, patolojik ve fonksiyonel sonuçlarını iyileştirmedeki etkinliğinin, hasarın erken değerlendirilmesine bağlı olduğunun önemi üzerinde durulmaktadır. Daha sonraları her iki çalışmaya da karşı tezler üreten ve sözü edilen iyileşmenin fonksiyonel açıdan anlamlı olmadığını ileri süren çalışmalar olsa da bu iki çalışma sayesinde araştırmacılar, omurilik yaralanmalarında etkin nöroprotektif tedavinin bulunması için yaralanmanın patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasının önemini ve asıl amacın ikincil hasarın önlenmesi üzerine hedeflenmesini gerektiğini anlamışlardır.

### 2.1.1. Akut Omurilik Hasarında Deneysel Modeller ve Model Seçimi

Akut travmatik omurilik hasarının tedavisi ile ilgili gerçek yaklaşımlar, standart ve tekrarlanabilir deneysel modellerin tanımlanması ile hız kazanmıştır. Deneysel modellerde oluşturulan lezyonların, gerçek hayatta görülen omurilik lezyonunun morfolojisi ve fonksiyonel iyileşmesi ile uyumlu olması gerekir. Örneğin, akut omurilik hasarı olan bir hastada hasar seviyesinde klinik olarak nörolojik fonksiyon tamamen kaybolursa dahi anatomik anlamda tam transeksiyon son derece nadirdir<sup>38</sup>. İnsan omurilik yaralanmalarının çoğunluğunda birincil hasar mekanizması, omurganın kırıklı çıkığı veya patlama kırığı esnasında kemik veya diskin omuriliğe doğru yer değiştirmesiyle oluşan omuriliğin akut kompresyonu veya laserasyonudur<sup>88</sup>. Kompresyon tipi akut omurilik travması için geliştirilen modellerden ilki, Allen'in köpeklerde ortaya koyduğu ağırlık düşürme tekniğidir<sup>5</sup>. Pek çok araştırmacı bu metodu kullanmış ancak elde edilen sonuçlardaki büyük farkları Allen'in orjinal aparatında modifikasyon yaparak düzeltmişlerdir. Daha sonra, omurilikte epidural mesafeye parafin gibi maddeler enjekte edilerek veya "Parmak kompresyonu (finger compression), bistüri sapı (scalpel handle), bone wax, Kocher's clamp ve thumb forceps" gibi farklı kompresyon modelleri de geliştirilmiştir<sup>85</sup>. Tarlov ve arkadaşları, köpeklerde kompresyon süresini iyi kontrol eden ancak lokalizasyonun tam sağlanamadığı ekstradural şişirilebilir balon kompresyon tekniğini ortaya koymuştur<sup>86</sup>. Hansebout daha iyi lokalize edilebilen bir balon kullanmıştır<sup>47</sup>. Bu teknik, insanda omurganın redükte edilmemiş çıkık ve kırıklı çıkığı ile oluşan omurilik kompresyonuna benzemektedir. Martin ve Bloedel ise küçük hayvanlarda kolay uygulanan küçük, şişirilebilir balonlar kullanmıştır<sup>62</sup>. Khan ve Griebel de, fogarty arteriel embolektomi balon kataterini kullanarak ratlarda başarılı bir şekilde omurilik travması oluşturabilmişlerdir<sup>53</sup>. Croft kedilerde "blocking weight"<sup>25</sup>, Holtz ise ratlarda ağırlık düşürme tekniği kullanarak hasar yerinde omurilik kan akımının azalması ve nörolojik defisit arasında tekrarlanabilir korelasyon olduğunu göstermiştir<sup>48</sup>. Distraksiyon gibi, insanlarda akut omurilik hasarının diğer primer mekanizmaları da deneysel modellerle ortaya konmuştur. Rivlin ve Tator, ratlarda "modifiye anevrizma klip" modelini kullanarak birçok araştırmacı tarafından benimsenen güvenilir ve ucuz bir yaralanma modeli

yaratmıştır<sup>74</sup>. Bu modeller yardımıyla, omurilik yaralanmasında görülen ikincil olayların patofizyolojisi ve tedavisi değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Khan ve Griebel ratlarda ağırlık düşürme, anevrizma klip kompresyon ve ekstradural balon kompresyon tekniklerini karşılaştırmış, son iki modelde lezyonların tekrarlanabilir ve ortaya çıkan omurilik hasarının patogenezinde esas faktörün mekanik ve vasküler olduğunu, buna karşın ağırlık düşürme modelinde ise yaralanmanın yalnızca mekanik olup posttravmatik iskemi belirtisinin bulunmadığını ileri sürmüşlerdir<sup>53</sup>. Holtz ise ratlarda ağırlık düşürme tekniğinin biyomekanik olarak klip kompresyon tekniği ile benzer olduğunu göstermiş ve ana dezavantajın klipin ön ayağını yerleştirirken laminektomi ile birlikte pediküllerin çıkarılması olduğunu ifade etmiştir<sup>48</sup>. Teknik olarak ağırlık düşürme modeli basit, nisbeten az deneyim gerektiren, ucuz bir düzenek olup minimal yumuşak doku diseksiyonu ve kemik çıkarılmasını gerektirir<sup>53</sup>. Ağırlık düşürme, tekrarlanabilir ve standart bir travma oluşturabilmektedir<sup>70,85</sup>. Son yıllarda Kouyoumdjian tarafından eş-zamanlı analize imkan veren uzaktan kontrollü bir model de geliştirilmiştir<sup>55</sup>. Bir diğer omurilik yaralanma modeli de “transeksiyon” dur. Bir kısım araştırmacılar rejenerasyon çalışmaları için tam kesiye uğramış omurilik modeli kullanmaktadır. İnsanlarda tam kesili omurilik hasarına nadiren rastlanması nedeniyle bu model pek tercih edilmemektedir<sup>38</sup>.

### **2.1.2. Omurilik Zedelenmesinde Patofizyoloji, Birincil ve İkincil Hasar**

Akut travmatik omurilik hasarına eşlik eden patoloji iki aşamalıdır: birincil mekanik hasar ve birincil hasarın başlattığı yıkım sürecine bağlı olarak gelişen ikincil hasar. İkincil hasar kavramı ilk olarak Allen<sup>4,5</sup> tarafından ortaya atılmıştır. Allen'in omurilik hasarı yaratan hemorajik nekrotik materyal içerisinde zararlı bir biyokimyasal faktörün varlığını ileri sürdüğü zamandan beri omurilik dokusunda ilerleyici posttravmatik otodestruksiyonu açıklamak için birçok çalışma yapılmış ve pek çok patofizyolojik mekanizma ileri sürülmüştür<sup>10,94</sup>.

#### **Birincil Hasar**

Omurilik yaralanması ile sonuçlanan travma, yalnızca omuriliğin kendisini veya beraberinde vertebral kolonu etkileyebilir. Fleksiyon, ekstansiyon veya rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetlerin hepsi, nöral elemanların kendisinde veya

omurilik damarlarında gerilme veya yırtılmaya sebep olur. Diğer olası mekanik etkiler, kemik kısımlardan, ligamentlerden veya spinal kanal içerisindeki hematomdan kaynaklanan kompresyonu içerir. Dolayısı ile hasarın boyutu, çeşitli biyomekanik faktörlere dayanmaktadır. Bu kuvvetler sadece yaralanma esnasında akut travma ile değil, oluşturabilecekleri kalıcı deformitelere bağlı olarak da omuriliği tahrip edebilirler. Yaralanmanın yaygınlığı kuvvet uygulanan düzeyde spinal kanalın göreceli boyutuna da dayanmaktadır. Geniş kanallar mekanik strese karşı tampon sağlayabilse de, stenotik kanallarda böyle bir rezerv yoktur. Ayrıca yaralanmanın anatomik yerleşimi de kısmen prognostik öneme sahip olabilmelidir. Kauda ekuina yaralanmaları, omuriliğin kendisine göre daha iyi bir iyileşme prognozuna sahiptir, zira alt motor nöronlar travmaya daha dirençlidirler<sup>50</sup>.

### **İkincil Hasar**

Birincil mekanik hasarın tetiklediği bir dizi patofizyolojik olay ile uzamış ikincil hasar süreci başlamış olur.

### ***Serbest Radikaller***

Demopoulos'un hipotezine göre serbest oksijen radikalleri ve ürünleri ilerleyici doku hasarına sebep olmaktadır<sup>28</sup>. Fizyolojik koşullarda oluşan serbest radikaller ya sitokrom oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimatik anti-oksidan mekanizmalar; ya  $\alpha$ - tokoferol,  $\beta$ -karoten, glutatyon askorbik asit, ürik asit, sistein, bilirubin, albumin gibi enzimatik olmayan anti-oksidanlar; ya da serüloplazmin, transferrin, laktoferrin gibi metal bağlayıcı maddeler ile inaktive edilmekte, böylece hücre ve doku hasardan korunmaktadır. Ancak merkezi Sinir Sistemi (MSS), süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerinin az olması nedeni ile serbest radikal hasarına oldukça yatkındır. MSS başlıca askorbat, glutatyon ve  $\alpha$ -tokoferol gibi anti-oksidan maddeler açısından zengindir<sup>94</sup>. Ancak travma sonrası bu anti-oksidan maddeler de hızla azalmakta; oluşan serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitler ile reaksiyona girerek sıklıkla lipid peroksitleri oluşturmaktadır. Sonuç olarak ortamda daha fazla serbest radikal oluşmakta ve bu da doku hasarını arttırmaktadır. Omurilik yaralanmasından sonra kanamayı takiben hemoglobin, ferritin ya da transferrinden açığa çıkan demir, membran fosfolipidlerinin peroksidasyonunu katalizlemekte ve

sonuçta membran parçalanarak hücre ölmektedir. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin yapmış olduğu endotel hasarı neticesinde kan omurilik bariyeri (KOB) bozulmakta ve zedelenme bölgesinde zararlı maddeler birikmektedir. Serbest radikaller ile kolayca reaksiyona girebilen doymamış yağ asitleri ve kolesterol ile serbest radikal oluşma reaksiyonlarını katalizleyen askorbik asit ve demirin fazla miktarda olması da, MSS'nin travmatik ve iskemik yaralanmadan daha çok etkilenmesine sebep olmaktadır.

Serbest radikal tutucular pek çok omurilik yaralanması modelinde denenmiştir. Bunlardan klinik uygulama bulan sentetik steroid metilprednizolonun çok yüksek dozlarının, non-spesifik serbest radikal tutucu etkileri ortaya konulmuştur<sup>46</sup>, buna rağmen klinikte kullanımı halen tartışmalıdır<sup>49,66</sup>. Deneysel çalışmalarda siklosporin-A<sup>16</sup>, EPC-K1<sup>37</sup>, vitamin E, selenyum<sup>6</sup>, melatonin, meksiletin, eritropoetin, tiyopental ve propofolün<sup>50,51</sup> de gerek serbest radikal tutucu özellikleri, gerekse lipid peroksidasyonunu önleyici etkileri ile omurilik yaralanmalarında etkin oldukları ve klinik koruma sağlayabilecekleri gösterilmiştir.

### ***İyonik Mekanizmalar: Potasyum, Sodyum ve Kalsiyum Kanalları***

Omurilik yaralanmasından sonra subpial bölgede kalan aksonlarda refrakter dönem uzar, aktivasyon eşiği yükselir, ısı bağımlı ileti bloğu olur ve ileti hızı azalır. Hızlı aktive olan potasyum kanalları, miyelin tarafından sarılmış olarak paranodal ya da internodal bölgelerde yerleşmiş olduğundan miyelin zedelenmesinde hızlı potasyum kanallarının aktivitesi artar, membran potansiyeli denge potansiyeline yaklaşır ve aksonal ileti bloğu oluşur. Hızlı aktive olan voltaj bağımlı potasyum kanallarının 4-aminopridin ile bloke edilmesinin gerek omuriliği yaralanmış kedilerde klinik bulguları iyileştirdiği, gerekse kronik omurilik yaralanması olan insanlarda aksonal iletiyi arttırarak orta derecede fonksiyonel iyileşme sağladığı gösterilmiştir<sup>64</sup>.

MSS beyaz cevher yaralanmasındaki anoksi, ATP ve membran depolarizasyonunun kaybına sebep olur. Sodyum kanallarından hücre içine sodyum geçişi olur. İntrasellüler sodyum konsantrasyonundaki bu artış, membran depolarizasyonu ile birlikte olunca, Na<sup>+</sup> - Ca<sup>++</sup> değiştiricinin ters çalışması ile hücre içine zararlı miktarlarda Ca<sup>++</sup> girer. Deneysel çalışmalarda voltaj bağımlı sodyum kanallarının saksitoksin, meksiletin ya da fenitoin ile bloke edilmesinin nöroprotektif

etki yaptığı, sodyum kanal permeabilitesini arttıran veratridinin ise yaralanmayı arttırdığı gösterilmiştir<sup>50,51,84</sup>.

Kalsiyum iyon konsantrasyonu ekstrasellüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Omurilik yaralanmasında hücre hasarı ile membranların parçalanması, hücrede enerji yetmezliği ve bunun neticesinde  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{++}$  değiştirici gibi elektrolit pompalarının iyi çalışmaması sonucunda büyük gradient farkı nedeni ile hücre içine  $\text{Ca}^{++}$  girişi olur.  $\text{Ca}^{++}$  iyonları hücre içinde fosfolipazlar, proteazlar ve fosfatazları aktive ederek hücre hasarının ilerlemesine neden olur. Fosfolipazlar hücre membranını yıkarak araşidonik asit gibi yağ asitlerini ortaya çıkarır; araşidonik asit, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri ile prostoglandinler ve lökotrienlere dönüştürülür. Fosfatazlar ise nitrik oksit sentetaz gibi enzimleri aktive eder,  $\text{Ca}^{++}$  ve diğer iyon kanallarının çalışmasını düzenler<sup>94</sup>. Hücreye  $\text{Ca}^{++}$  girişi ve serbest radikal oluşumu eş zamanlı olur ve sinerjistik etki gösterebilir.  $\text{Ca}^{++}$  iyonları mitokondriyal respiratuvar enzimlere bağlanır ve elektron transportunu bozarak serbest radikal oluşturur. Kuvvetli vazojenik ve inflamatuvar özellikleri de olan bu ürünler kan akımını azaltır, membranın iyonlara geçirgenliğini artırır ve sonuçta hücre içine daha fazla  $\text{Ca}^{++}$  girişine sebep olur<sup>94</sup>. Voltaj bağımlı  $\text{Ca}^{++}$  kanallarının nimodipin, nikardipin ile bloke edilmesinin kan akımını arttırdığı ama omurilik yaralanmasında klinik sonuçları iyileştirmediği gösterilmiştir<sup>44,75</sup>. Hücreye  $\text{Ca}^{++}$  iyonlarının girişi için diğer bir yol glutamat reseptörleridir. Glutamat reseptör blokerleri deneysel omurilik yaralanmasında nörolojik sonuçları iyileştirirler<sup>60</sup>. Aksonlarda bulunan beta adrenoseptörler ve serotoninerjik reseptörler aksonal uyarılmayı  $\text{Ca}^{++}$  bağımlı ve protein kinaz-C bağımlı mekanizmalar ile arttırlar. Mikrodiyaliz çalışmaları omurilik yaralanmasından sonra ekstrasellüler alana norepinefrin ve serotonin geçişi olduğunu ve serotonin reseptör antagonisti mianserinin nöroprotektif etkisini göstermiştir<sup>77</sup>. Bazı tedaviler hücre içine  $\text{Ca}^{++}$  girişi neticesinde oluşan olayları etkileyerek nöroprotektif etki gösterirler. Glukokortikoidler  $\text{Ca}^{++}$ 'un aktive ettiği fosfolipaz aktivitesini inhibe eden bir protein olan lipokortinin sentez ve salınımı önler. İndometazin ve diğer siklooksijenaz ve lipooksijenaz inhibitörleri eikazanoidlerin üretimini azaltırlar. Siklosporin ve FK-506 kalsinörini inhibe eder, nitrik oksit üretimini azaltır ve nöronları glutamat toksisitesinden korur<sup>27,57</sup>.

Omurilik hasarında ikincil cevaptaki enzimatik süreç ve aktivasyonu ilgi uyandırmıştır. Hasar sonrası artan  $Ca^{++}$  düzeyine etki eden proteazlardan kalpain, kaspazlar ve Katepsin B'nin MSS hücre ölüm modellerinde nörodejenerasyon ve hücre ölümü ile ilişkisi bilinmektedir<sup>56</sup>. Katepsin B'nin rolü en geniş anlamda serebral iskemi modellerinde araştırılmıştır<sup>90</sup>. Kontüzyon tipi omurilik zedelenmesinde Katepsin B'nin hücre lokalizasyonu ve enzimatik aktivitesi ilk olarak 2005 yılında incelenmiş olup bu çalışma mekanik omurilik hasarında doku yıkımındaki önemini gösteren tek çalışmadır<sup>32</sup>.

### ***Eksitator Amino Asitler***

Eksitator amino asitler olan glutamat ve aspartat omurilik yaralanması sonrasında dakikalar içerisinde hızla artar<sup>57</sup>; hücre içinde  $Na^+$  ve  $Ca^{++}$  artışı sonucu hücre şişmesi ile proteazlar, kinazlar ve fosfolipazlar gibi kalsiyum bağımlı olayların başlamasına neden olur<sup>20</sup>. MSS'ne glutamat, NMDA, AMPA ve kainat gibi glutamat reseptör uyarıcılar ile enjekte edildiğinde glutamatın eksitotoksik etkisinin arttığı ve bu etkinin reseptör blokerleri ve serbest radikal tutucular ile önlendiği gösterilmiştir. Kafa travmalarının aksine, omurilik yaralanmalarında en güçlü eksitotoksik etki non-NMDA reseptörleri üzerinden olmaktadır<sup>71</sup>. Glutamat ve aspartat salınımı da omurilik yaralanmasının şiddeti ile ilişkilidir<sup>3</sup>. Travmatik beyin ve omurilik yaralanmasından sonra glutamat reseptörlerinin hızla azalması, hücrenin kendisini eksitotoksisiteden koruma çabası olabilir.

NMDA reseptör antagonisti olan 3-propil-1-fosfonik asit (CPP) ve dizosipin (MK-801) travmatik ve iskemik omurilik hasarında histolojik ve klinik iyileşmeye neden olmaktadır<sup>33</sup>. Magnezyum, glisin ve poliamin ile NMDA reseptörlerinin bloke edilebildiği ve bu ajanların da nöroprotektif etki oluşturdukları, magnezyumun yaralanmış omurilik bölgesinde vazoprotektif etkisinin de olduğu gösterilmiştir<sup>50</sup>. Ayrıca non-NMDA ve metabotropik glutamat reseptörleri de omurilik yaralanması sonrası görülen eksitotoksisitede yer almaktadır<sup>50</sup>.

### ***Opiat Reseptörleri***

Opiat reseptör blokajının ilerleyici doku hasarını önlemesi, ikincil hasar patofizyolojisinde endojen opioidlerin rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bilindiği gibi omurilik yaralanması sırasında dinorfin salınımı artar. Dinorfin'in intratekal

uygulaması paralizisi ve hücre hasarına yol açmaktadır. Opiat reseptörlerini aktive etmeyen bazı dinorfin fragmanlarının nörolojik fonksiyonu bozması, buna karşın kappa selektif opioid reseptör antagonistlerinin omurilik yaralanmasında nöroprotektif olması, bu mekanizmanın ne kadar karmaşık olduğunu göstermektedir<sup>94</sup>. NMDA reseptör blokerlerinin intratekal uygulanan dinorfinin hasar verici etkisini önlemesi ile, opioidlerin eksitotoksik amino asit salınımını arttırdığı ve zararlı etkilerini bu yapılar üzerinden yaptığı gösterilmiştir<sup>8</sup>. İkincil hasarın önlenmesinde opiat reseptörlerinin bloke edilme mekanizması dolaylı ve komplekstir<sup>50</sup>.

### ***İnflamasyon Cevabı***

Travmatik omurilik yaralanması sonrası inflamatuvar cevap saatler içerisinde başlamakta ve birkaç gün içerisinde doruk değerine ulaşmaktadır<sup>9</sup>. Bu cevap endotel hasarı, inflamatuvar mediatörlerin salınımı, vasküler permeabilite artışı, ödem gelişimi, periferik inflamatuvar hücrelerinin göçü ve mikroglia aktivasyonu olarak izlenmektedir. Lezyon bölgesine inflamatuvar hücre infiltrasyonu iki evre halinde olmakta; ilk evrede polimorfonükleer lökosit (PMNL) infiltrasyonu varken, ikinci evrede monosit ve makrofaj infiltrasyonu olmaktadır. PMNL'ler hasar bölgesine ilk birkaç saat içerisinde gelmekte ve birinci günde pik değerine ulaşmakta, üçüncü günde ise kaybolmaktadır. Lezyon sırasında oluşan hemoraji miktarı ile bölgeye göç eden PMNL'lerin sayısının korelasyon göstermesi, kan içerisinde yer alan kemoatraktan maddelerin bu infiltrasyonun miktarını belirlemede rol oynadığını göstermektedir. Yaralanma bölgesine monosit, makrofaj, mikroglia gibi periferik hücrelerin göçü ikinci fazı oluşturmakta ve asıl fonksiyonlarının hücre debrisisi fagositozu olduğu düşünülmektedir<sup>50,81</sup>. Prostaglandinler, lökotrienler, serotonin, bradikinin ve platelet aktive edici faktör (PAF) gibi, omurilikte hasar bölgesinde biriken inflamatuvar mediatörler, inflamatuvar hücreler için kemoatraktan rol oynamakta ve doku hasarının hızla ilerlemesine sebep olmaktadır<sup>94</sup>. Nötrofiller, nötrofil proteazlarını ve serbest oksijen radikallerini serbestleştirmekte; inflamasyon mediatörleri, endotelial lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Aktive olmuş nötrofil ve endotel hücreleri arasında sıkı bağlantı olduğundan dolaşımdaki antiproteaz ve antioksidanlar ortama ulaşamamaktadırlar, sonuçta aktive olmuş nötrofillerin başlattığı endotel hasarı ilerlemektedir<sup>85</sup>.

Metilprednizolon, PAF antagonistleri, siklooksijenaz ve lipooksijenazlar etkilerini inflamatuvar cevabı kısmen ya da tamamen inhibe ederek göstermektedirler. Klorakin ve kolşisin, omurilikte iskemi sonrası inflamatuvar değişiklikleri ve doku hasarını azaltır<sup>40</sup>.

### ***Vasküler Mekanizmalar: Sistemik ve Lokal Etkiler***

Akut omurilik yaralanması sonrasında yaralanmanın şiddeti ve seviyesi ile orantılı olarak birçok kardiyovasküler ve hemodinamik etki olmaktadır. Travmayı takiben sistolik arteriel basınçta ani ve geçici bir artış olmakta, ardından ortalama arteriel basınç ve kardiyak outputta kalıcı bir düşüş yaşanmaktadır. Hipertansif fazda plazma epinefrin ve norepinefrin düzeyleri artar<sup>50,87</sup>.

Omurilik yaralanması sonrası hem lezyon merkezinde, hem de kraniokaudal komşu bölgelerde arteriol, venül ve kapillerlerde kanlanma durmaktadır. Gri cevher ve lezyon merkezindeki hemorajiye komşu beyaz cevherde iskemi belirgindir. Gri cevheri katederek beyaz cevhere ulaşan arteriollerdeki vazospazm ve tromboz nedeni ile ikincil hasar artar<sup>87</sup>. Beyaz cevherin perfüzyonu travmadan sonraki 5. dakikada hızla azalmakta, 15. dakikadan sonra normale dönmeye başlamaktadır. Gri cevherde ise travmadan sonraki ilk 5 dakikada birçok hemorajik alan belirmekte, perfüzyon azlığı travmadan saatler sonra bile devam etmektedir. Lezyon bölgesinde, özellikle gri cevherde, omurilik kan akımının ileri derecede azalması iskemi ile sonuçlanır<sup>85</sup>. Bu nedenle erken tedavi halinde iskeminin önlenebileceği düşünülmektedir<sup>50</sup>. Normal omurilikte, ortalama arteriel kan basıncındaki değişikliklere rağmen omurilik kan akımını sabit tutan bir otoregülasyon mekanizması mevcutken, omurilik yaralanması ile bu mekanizma bozulmakta, ilaveten sistemik hipotansiyon nedeni ile omurilik kan akımı da azalmaktadır. Sistolik kan basıncını arttırmanın omurilik kan akımını arttırmadığı, ama hasara komşu bölgelerde hiperemiye neden olduğu gösterilmiştir<sup>87</sup>. Ayrıca yaralanmış omurilik aksonlarının da normal aksonlara göre iskemiye daha az toleranslı olduğu<sup>54</sup>, posttravmatik iskeminin akson fonksiyonu bozulması ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir<sup>35</sup>.

### ***Endotel Hasarı***

Progresif nekroz ve motor disfonksiyona yol açan ikincil hasarın mekanizmaları tam olarak bilinmese de deneysel bulgular vasküler hasarın çok

önemli bir rol oynadığını düşündürür. Geçirgenlik artımı ve ödeme yol açan endotel fonksiyon bozukluğunu Demopoulos ve arkadaşları omurilik hasarı sonrası 1 -2 saat içerisinde göstermişlerdir<sup>29</sup>. Omurilik kan akımının azalmasına eşlik eden endotel hasarının ilerleyici karakteri ikincil hasar sürecini devam ettirmektedir. Endotel hasarı trombosit yapışması, damar içi trombosit kümelenmesi, mikrovasküler tikaçlar, vazojenik ödem ve emboli ile birlikte seyrederek<sup>85</sup>. Endotel hasarını azaltan tedavi çalışmaları vasküler hasarda endotel bozukluğunun önemli rol oynadığını göstermiştir. Endotel hasarı lökosit aktivasyonuna da neden olmaktadır.

### 2.1.3. Omurilik Zedelenmesinde Histopatolojik Değişiklikler

Omurilikte hemoraji, ödem, aksonal ve nöronal nekroz, infarktüs ve kist oluşumunu takiben, demiyelinizasyon gibi erken posttravmatik patolojik değişiklikler oluşur. Köpeklerde akut hasardan 15 dakika sonra beyaz cevherde ödem, gri cevherde peteşial kanama; 2. saatte gri cevherdeki hemorajik alanlarda artma, 4. saatten sonra akson şişmesi ve 6. günde tüm bu patolojik değişikliklerde daha da ilerleme gösterilmiştir<sup>4,5</sup>. Bu olaydaki nekroz, sonraları “otodestruksiyon” olarak tanımlanmıştır<sup>65</sup>. Elektron mikroskopi ile hasardan sonraki ilk 5 dakikada gri cevherin musküler venüllerinde eritrosit şişmesi, 15. ve 30. dakikalarda postkapiller ve musküler venüllerin etrafındaki alana eritrosit sızması ile karakterli küçük hemorajiler, 4. saatte akson dejenerasyonu, iskemik endotel hasarı ve santral miyelinin parçalanmaya başladığı gösterilmiştir<sup>30</sup>. Yaralanmadan sonraki birkaç gün içerisinde progressif aksonal değişiklikler ve nekrotik zon oluşur<sup>42</sup>. Travma etkisiyle beyaz cevherde miyelin veziküler tarzda parçalanır ve aksoplazma granüler tarzda çözülür<sup>9</sup>.

Hasar alanında gelişen ödem kordun diğer komşu segmentlerine yayılmaktadır. Major travma sonrası 24-48 saatte hemorajik alanlar ve özellikle santral zon nekroza uğrar. Birkaç gün sonra hemorajik alanda kavite gelişir ve komşu bölgeler de yama şeklinde nekrotik alanlar görülmeye başlar. Hasarlı alan ve komşu alanlarda koagülasyon nekrozu ve kaviteyle giden bu değişiklikler, patolojik olarak infarkt görüntüsü çizdiğinden “posttravmatik infarktüs” olarak da isimlendirilir<sup>80</sup>.

Son yıllarda önemli bir gelişme olarak oligodendrositlerde travmatik olaydan sonra hücre kaybına eşlik eden apoptozis varlığının gösterilmesi üzerine insan

omurilik hasarında da gecikmiş apoptosis olabileceği fikri desteklenmiştir<sup>17</sup>. Kompresyon hasarında, rat omuriliğinde, kontüzyon hasarında maymun omuriliğinde `biotin nick end labelling (TUNEL)-pozitifliği ile karakterli apoptotik oligodendrositler gösterilmiştir<sup>15,17,52</sup>. Ratlarda, omurilik travmasından sonra antiapoptotik bir ajan olan sikloheksimid ile iyi sonuçlar alındığı bildirilmiştir<sup>58</sup>.

Zedelenme çevresindeki korunmuş omurilik dokusu miktarının, omurilik hasarından sonra davranışsal iyileşme ile çok yakın ilişkili olduğu anlaşılmaktadır. Hayvan modellerinde omurilik hasarından sonra %4-6 kadar az bir oranda bile kortikal motor nöronun korunması halinde, hasarlı kord segmentiyle kaudal omurilik arasında tekrar bağlantı kazanılması, motor fonksiyonun normal seviyelere dönebilmesi mümkün olmaktadır<sup>94</sup>. Bu traktlarda bulunan vital nöronlar, iyileşmede motor fonksiyonun geri dönmesinde tetik etki gösterir. Basso ve arkadaşları, lezyon yerinde %5-10 kadar lifin korunması halinde ratlarda omurilik hasarından sonra temel hareketlerin yapılmasını sağladığını göstermiştir<sup>10</sup>. Travmatik omurilik yaralanmasının fazları ve önemli patolojik aşamaları Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

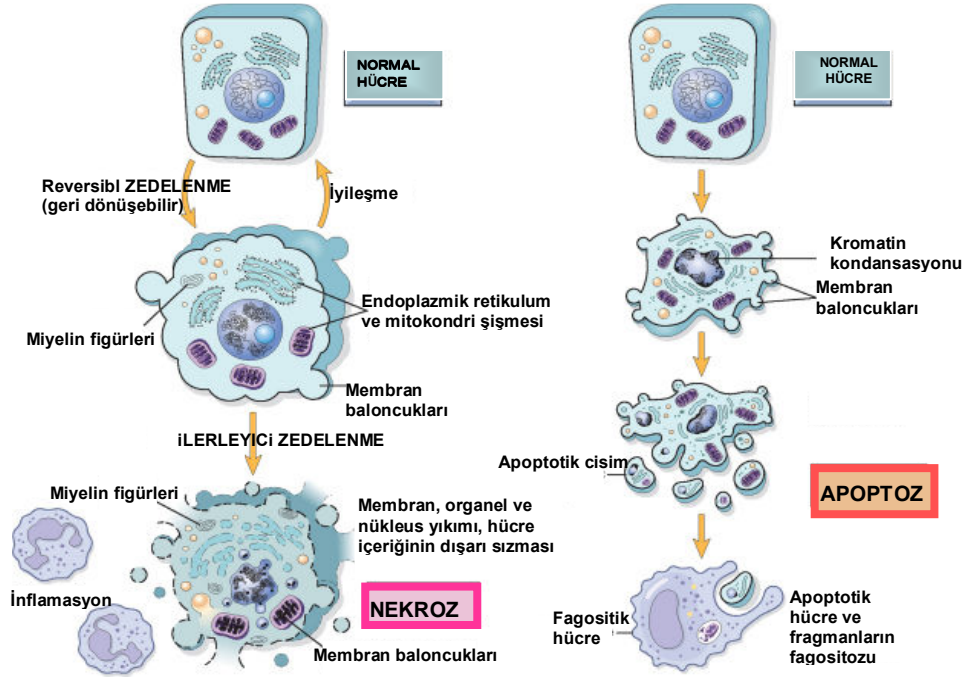
**Tablo 2.1.** Akut omurilik yaralanması evreleri ve önemli patolojik olaylar<sup>76</sup>

<b>Omurilik Yaralanması Sonrası Geçen Zaman</b>				
$\leq 2$ saat	$\leq 48$ saat	$\leq 14$ gün	$\leq 6$ ay	$\geq 6$ ay
Primer mekanik hasar	Vazojenik ve sitotoksik ödem	Makrofaj infiltrasyonu	Glial skar formasyonunun devamı	Uzamış Wallerian dejenerasyon
Aksonların travmatik ayrılması	Reaktif oksijen ürünlerinin yapımı: lipid peroksidasyonu	Astroglial skar oluşumu başlangıcı (reaktif astrositoz)	Kist formasyonu	Korunmuş demiyelinize aksonların persistansı
Gri cevherde hemoraji	Glutamat bağımlı eksitotoksiste	Kan Beyin Bariyeri onarımı ve ödem rezolüsyonu	Lezyon stabilizasyonu	Korunmuş omurilik dokusunda potansiyel yapısal ve fonksiyonel plastisite
Hemorajik nekroz	Hemoraji ve nekroz devamı			
Mikroglia aktivasyonu	Nötrofil invazyonu			
IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 ve diğer faktörlerin salınımı	Kan Beyin Bariyeri permeabilite piki			
	Erken demiyelinizasyon (oligodendrosit ölümü)			
	Nöron ölümü			
	Aksonlarda şişme			
	Sistemik olaylar (şok, spinal şok, hipotansiyon, hipoksi)			

#### 2.1.4. Nekroz ve Apoptoz, Benzerlik ve Farkları

Hücrelerin kendi nükleer DNA ve proteinlerini yıkması ile sonuçlanacak organize bir intihar programı olan apoptoz, hücrenin “apoptotik cisimler” olarak adlandırılan membranla çevrili sitoplazma ve nükleus parçacıkları içeren fragmanlara ayrıldığı, bu parçacıkların inflamasyon cevabı olmaksızın fagositler tarafından yutulduğu, hücrenin enerji sarfederek ve özel bir çaba harcıyarak hedeflediği bir ölüm şeklidir. Apoptoz, gen ve protein ekspresyonu gerektirir, DNA'nın düzenli kırılması ile karakterlidir ve membranlar intakttır. Nekrotik ölüm ise tam aksine, hücre şişmesi, membran parçalanması ile karakterlidir, DNA düzenli değil, rastgele kırılır. Apoptoz ve nekroz temel mekanizmalar açısından da farklıdır: apoptozda hücre, tamir mekanizmalarını çalıştırarak kendini yenileme çabaları sonuç

vermediğinde ölüm kararı verir - bir anlamda intihar eder, nekroza yol açan zedelenmede ise tamir mekanizmaları da hasarlı olduğundan, hücre ölümü kaçınılmazdır<sup>79</sup> (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Apoptoz ve nekroz, benzerlik ve farkları<sup>79</sup>

Ancak bu iki ölüm tipinde bazı ortak mekanizmalar olabileceği, etken aynı olsa bile şiddet farkının hücrenin nekroz ya da apoptoza gitmesine yol açabileceği unutulmamalıdır.

Apoptoz, membran bütünlüğünün bozulmaması yanısıra enzimatik parçalanma özelliği, hücre içeriğinin açığa çıkmaması ve iltihabi reaksiyon oluşturmaması ile nekrozdaki ayrılır. Apoptozun nekrozdaki bir diğer farkı normal fizyolojik durumlarda da görülebmesidir ancak burada konu ile ilgili olarak patolojik durumlardaki apoptozdan biraz daha ayrıntılı söz edilecektir. Radyasyon, sitotoksik ilaçlar, hipoksi hatta fiziksel zedelenme kısacası her tür DNA zedeleyici etken, şiddetine bağlı olarak hücrede nekroz ya da apoptoz oluşturur. Hücrenin apoptoza gidişi, DNA tamir mekanizmalarının zedelenmenin tamir edilip edilemeyeceğini belirlemesiyle başlar. Hücrede büzülme, çekirdek kromatininin periferde nükleer kondansasyonunu, membranla çevrili organelleri parçalanmamış

sitoplazmik ve nükleer birimlerden oluşan “apoptotik cisimler” in oluşarak ayrılması ve bu parçacıkları çevredeki fagositik hücrelerin hemen fagosite ederek ortadan kaldırması söz konusudur. Hücrenin nekroz ya da apoptoza uğraması, zedeleyici ajanın niteliği değil, şiddeti ile belirlenmektedir. Şiddetli etkenler hücreyi derhal yıkar ve parçalarken, daha hafif zedelenmelerde önce tamir edilme çabası ve ancak tamirin umutsuz olduğu durumlarda apoptoz söz konusudur<sup>79</sup>.

Biyokimyasal olarak aktif bölgesinde sistein bulunduran (C) ve proteini aspartik asit bölgesinden (ASP) parçaladıkları için “CASPASE/kaspaz” adı verilen bu enzim ailesinin ondan fazla üyesi vardır, kaspaz varlığı değil kaspaz aktivasyonunun apoptozu belirlediği unutulmamalıdır. Aktivasyon ile hücre DNA’sı  $Ca^{++}$  ve  $Mg^{++}$  bağımlı endonükleaz enzimler tarafından nükleozomal birimler arasından düzenli bir şekilde parçalanarak 180 – 200 baz çifti uzunluğunda, elektroforezle apoptoz için tipik görünümlü DNA zincirlerini ortaya çıkarır, gerek bu özellik gerekse aktive kaspaz çalışmaları apoptozun varlığını göstermek için oldukça sık kullanılan yöntemlerdir.

Son zamanlarda, çift sarmal DNA tamiri sırasında ortaya çıkan tek sarmal (ssDNA) varlığının apoptozu kolayca tesbit edeceği öne sürülmüştür<sup>36</sup>. Bu yöntem TUNEL tekniği de dahil olmak üzere beş ayrı çeşitte apoptoz inceleme yöntemi ile karşılaştırıldığında, apoptozu nekrozdaki olarak ayırdedebilmesi nedeni ile erken ve geç apoptozun tanınmasında en güvenilir yöntem olduğu ortaya çıkmıştır<sup>96</sup>. Beyin zedelenmesi ile giden medikolegal otopsi vakalarında dahi hipokampus nöron apoptozunun tanınmasında güvenle kullanılabileceği bildirilmiştir<sup>63</sup>.

### 2.1.5. Apoptozun Omurilik Hasarında Önemi

Travmatik omurilik yaralanmasından sonraki hücre ölümünün bir kısmından apoptozis sorumludur<sup>26,83</sup>. Apoptozun başlatılması için üç prototip sinyal yolu tanımlanmıştır:

1. yol: Ölüm reseptörleri pro-kaspaz 8’i ve muhtemelen diğer başlatıcı kaspazları aktif hale getirir.
2. yol, mitokondride yerleşen apoptoz proteaz aktive edici faktör 1 (APAF-1) ve kaspaz-9’u içerir. Sitokrom-c tarafından aktive edilen APAF-1 kofaktör nükleotid trifosfatlarla prokaspaz-9’a bağlanır ve onu aktive eder.

Dolayısı ile kaspaz-8 ve kaspaz-9, ölüm reseptörleri mitokondri için önemlidir.

3. yol olan endoplazmik retikulum apoptotik yolu ise yakın zamanda tanımlanmıştır<sup>50</sup>.

Travmatik omurilik hasarından sonra kaspaz-8 ve kaspaz-9 gibi başlatıcı kaspazların lezyon merkezinde 30 dakika içerisinde aktif hale geldikleri ve yaralanmanın ileri evrelerinde beyaz cevherde de arttıkları; yaralanmadan bir saat sonra kaspaz-3 aktivasyonunun 3 katına çıktığı<sup>83</sup>; apoptozun doruk değerine üçüncü günde ulaştığı<sup>22</sup>, ayrıca oligodendrositlerin de etkilendiği ve yaralanmanın yayılmasında oligodendrosit apoptozunun etkin olabileceği gösterilmiştir<sup>26</sup>.

## **GEREÇ ve YÖNTEM**

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonundan 05 D11 105 001 numaralı projeye alınan destek ve Etik Kurul onayı ile Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Denek olarak, 35 adet, 200-300gr ağırlığında, erişkin, erkek Wistar tipi rat kullanıldı.

### **3.1. Çalışma Protokolü**

Bu çalışmanın hipotezi, deneysel omurilik kontüzyon travması modelinde, apoptoz ve nekroz ile giden hücre ölümü tiplerinin histopatolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak saptanabileceği ve lezyonun merkezi, rostral ve kaudalinin kronolojik incelenmesi ile zedelenme şekli, şiddeti ve dağılımının haritalanabileceğidir. Bu amaçla denekler travma ve kontrol grupları olmak üzere başlangıçta iki ana gruba ayrılmış, takiben travma grubundaki denekler, zaman içerisindeki değişiklikleri gözlemleyebilmek amacı ile travmadan sonraki 1., 6., 24., 48., 72. ve 168. saatlerde sakrifiye edilmek üzere 6 alt gruba bölünmüştür. Kontrol ve travma grupları istatistiksel anlamı koruyabilecek en küçük sayı olacak şekilde 5'erli gruplara ayrılmıştır.

#### **3.1.1. Deney Grupları**

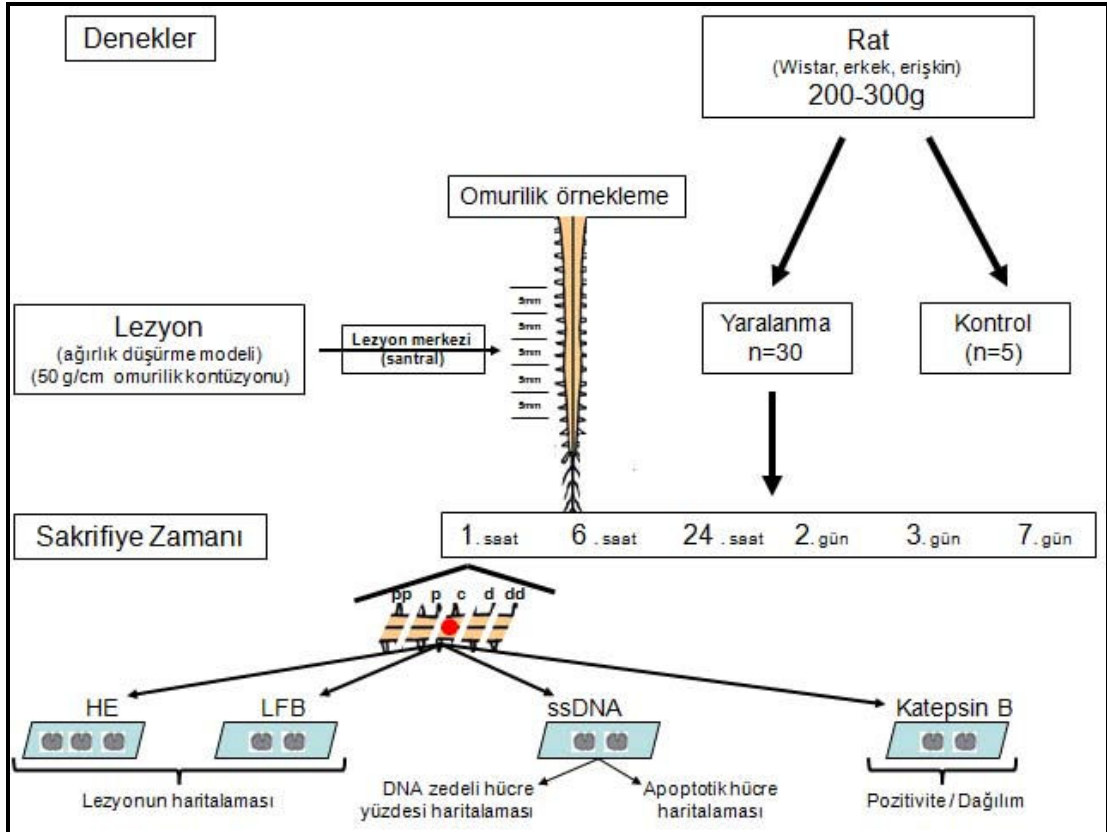
##### **Kontrol Grupları**

Kontrol grubundaki 200-300 gr ağırlığındaki 5 genç erişkin erkek Wistar ratın travma oluşturulmaksızın çıkarılan omurilik segmentleri, aynen travma grubunda olduğu gibi lezyon merkezi ile kranial ve kaudal yönde 0.5 cm aralıklar ile alınan toplam 5 alt segment (birincisi travma merkezi olmak üzere 0.5 cm aralıkla kranial yönde 2 alt segment ve kaudal yönde 2 alt segment olacak şekilde toplam 2.5 cm'lik alanı kapsayan 5 alt segment) apoptozis – nekroz için histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi.

##### **Travma Grupları**

Tüm deney gruplarında (n=5/grup) deneysel omurilik travması oluşturulduktan sonra, 1., 6., 24., 48., 72. ve 168. saatlerde çıkarılan omurilik segmentleri sırasıyla lezyon merkezi, lezyon merkezi çevresi (kranial ve kaudal

yönde) 0.5 cm aralıklar ile alınan toplam 5 alt segment (birinci travma merkezi olmak üzere 0.5 cm aralıkla kranial yönde 2 alt segment ve kaudal yönde 2 alt segment olacak şekilde toplam 2.5 cm'lik alanı kapsayan 5 alt segment) apoptoz - nekroz için histolojik, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi (Şekil 3.1, 3.2).



**Şekil 3.1.** Deney planı diyagramı. Patolojik inceleme her zaman dilimi ve her alt segment için yapılmıştır. Diyagramda sadece 1. saat ve merkez alt segmenti için örnekleme gösterilmektedir.

### 3.1.2. Cerrahi İşlemler

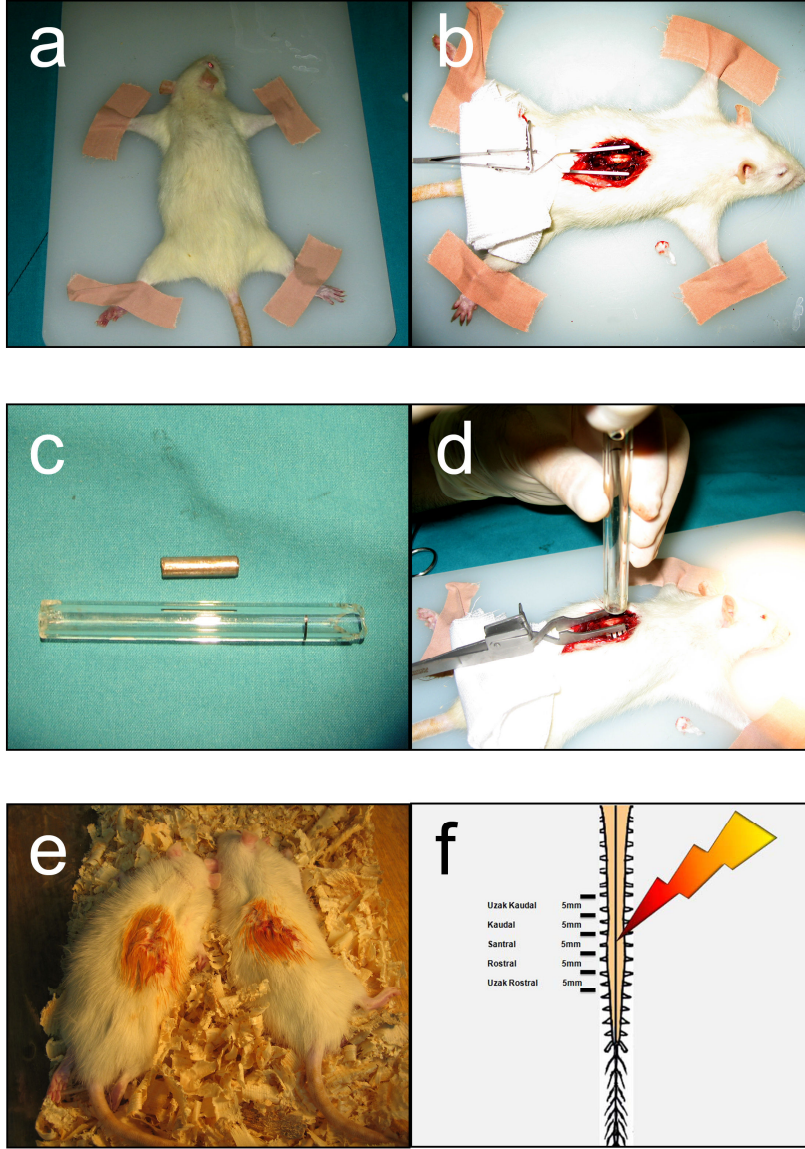
#### Anestezi

Denekler deneyden bir gece önce aç bırakıldı ve cerrahi öncesi tüm denekler tartıldı. Cerrahi işlemler genel anestezi altında gerçekleştirildi. Bu amaçla ketamin hidroklorür (Ketalar %5'lik solüsyon, Parke – Davis lisansı ile Eczacıbaşı İlaç

Sanayi, Levent, İstanbul, 50mg/kg) ve xylazine (Rompun, %2'lik solusyon, Bayer İstanbul, 8mg/kg) intramuskuler olarak enjekte edildi, takiben hayvanlar kendi solunumlarına bırakıldı. Deney boyunca ve işlemden sonra uyanıncaya kadar vücut ısıları korundu.

### **Spinal Travma**

Denekler prone pozisyonda işlem masasına tespit edildi (Şekil 3.2.a). Gerekli alan temizliği ve polyvinylpyrrolidon iyod (Polyod, %10'luk solusyon, Drogosan ilaç sanayi, Ankara) ile cerrahi bölge temizliğini takiben, T9-11 düzeyinde, orta hatta, 3 cm uzunluğunda longitudinal cilt kesisi yapıldı. Paravertebral adaleler sıyrıldıktan sonra torakal 9, 10 ve 11. vertebralara total laminektomi yapıldı (Şekil 3.2.b). Omurilik durasının sağlam olduğu görüldükten sonra ağırlık düşürme modeline göre 50 gr/cm şiddetinde standart omurilik travması oluşturuldu<sup>4,92</sup> (Şekil 3.2.c ve 3.2.d). Travma sonrası hemostazı takiben deneklerin adale ve cilt tabakaları anatomik planda kapatıldı ve 20x35x40 cm ebatlarında kafeslere toplam 3'er denek olacak şekilde yerleştirildi (Şekil 3.2.e). Deney süresi boyunca üriner enfeksiyon profilaksisi amacıyla gentamisin (Garamycine, Schering-Plough Corporation lisansı ile Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, 0.2 mg/100gr/gün) verildi ve 12 saat arayla mesaneleri Crede manevrasıyla boşaltıldı. Bekleme süresi boyunca tüm denekler standart laboratuvar yemi ve çeşme suyu ile beslendi, buldukları ortamda oda sıcaklığı 23 – 25°C'de tutuldu, 14 saat karanlık ve 10 saat aydınlıkta kalmaları sağlandı.



**Şekil 3.2.** Rattı kontüzyon tipi akut omurilik yaralanması oluşturulması. Pron pozisyonundaki deneğe (a), uygun saha temizliğini takiben lezyon yapılacak bölgeden orta hat insizyonu yapılmakta ve paravertebral adaleler diseksiyonla açılmaktadır. T8-10 laminektomi yapılmasının ardından, duranın sağlam olduğunu izlenmesini takiben (b), daha önceden tanımlandığı gibi 50g/cm travma uygulanmaktadır (c ve d). Katlar anatomik bütünlüğe uygun olarak kapatıldıktan sonra (e) denekler uygun koşullarda kafeslere alınmakta ve travma sonrası değerlendirme için uygun zamanda veya zaman diliminde sakrifiye edilmektedir. Sakrifiye edilen deneklerin omuriliklerinde, lezyonun merkezinden, rostraline ve kaudaline doğru 0.5 cm'lik alt segmentler histolojik – immünohistokimyasal değerlendirmeler için bloklanmaktadır. Kontrol grubuna travma (c ve d) dışında aynı işlemler uygulanmıştır.

### 3.1.3. Histopatolojik İnceleme

#### Morfolojik Analizler, Lezyonun Rostro-Kaudal Uzanımı

Kontrol ve deney gruplarında çıkarılan omurilikler ayrı ayrı %10 formaldehid solüsyonunda tesbit edildikten sonra zedelenme merkezini içeren 0.5 cm alt segment ile (C), rostralindeki (P) ve en rostraldeki (PP) 0.5 cm'lik alt segment, zedelenme merkezinin kaudalindeki (D) ve en kaudaldeki (DD) 0.5 cm alt segment olmak üzere toplam 2.5 cm uzunluğundaki omurilik segmenti histopatolojik inceleme için takibe alınarak parafin ile bloklandı. Her bloktan morfolojik incelemenin yapılacağı Hematoksilen Eozin (HE) için üçer, miyelin incelemesinin yapılacağı Luxol Fast Blue (LFB) için ikişer; ve immünohistokimyasal incelemelerin her biri için ikişer adet olmak üzere toplam dokuz adet 8 µm kalınlıkta paralel kesitler hazırlandı (Şekil 3.1). Ayrıca seçilmiş bloklardan nöronların görüntülenebilmesi için GFAP, endotelial hücre görüntülenmesi için D2-40, CD31 ve CD34, fagositik hücrelerin görüntülenebilmesi için CD68 antikorları kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapılmak üzere ilave seri kesitler alındı.

Zedelenmenin her zaman diliminde aynı seviyeye denk gelen kesitleri sıra ile fotoğraflararak bilgisayar aracılığıyla haritalandı. Primer zedelenme bölgesinde lezyonun morfometrik alan miktarı belirlemesi, bu fotoğraflar üzerinde ışık mikroskobu ile incelemeye dayanan haritalama verilerinin bilgisayara aktararak, ölçümü ve hesaplanması aracılığıyla elde edildi.

#### İmmünohistokimyasal Yöntemler

İmmünohistokimyasal boyamalar Ventana Nexes immünohistokimyasal otomatik boyama aleti kullanılarak yapıldı (Ventana medical systems, Arizona, USA). Primer antikor olarak apoptoz sayımı ve DNA zedeli nükleus sayımı için “poliklonal anti-single stranded DNA (ssDNA) antikor (IBL, Japan; lot no: OE-912)” 1:400 dilüsyonda, katepsin B için “monoklonal Katepsin B antikor (Clone CB131, Novocastra, Leica microsystems, UK)” 1:20 dilüsyonda kullanıldı. İkincil antikor ve vizualizasyon sistemi olarak “iVIEW DAB Parafin kiti (Ventana, USA)” kullanıldı.

## **İmmünohistokimyasal Değerlendirme**

### ***ssDNA ile DNA Hasarlı Hücre Yüzdesinin Ölçümü***

Kontrol ve zedelenme sonrası her bir zaman dilimi için beşer ratta ikişer adet kesite uygulanan ssDNA immünohistokimyası preparatlarında her preparatta gri ve beyaz cevheri içerecek şekilde rastgele 5 bölgede, 40 HPF (x40 objektifle elde edilen büyük büyütme alanı) pozitif (kahverengi) boyanan nükleuslar ve boyanmayan (mavi zıt boya) nükleusların sayılıp oranlanmasıyla elde edildi.

### ***ssDNA ile Apoptotik Hücre Sayımı***

Kontrol ve zedelenme sonrası her zaman dilimi için beşer ratta ikişer adet kesite uygulanan ssDNA immünohistokimya preparatlarında toplam kesit yüzeyinde saptanan apoptotik hücre ve cisimler sayıldı, bu cisimlerin niteliği morfolojik olarak da HE preparatları ve ışık mikroskopisiyle de doğrulandı. Bu değerler sekonder hasarı belirlemek için mikroskopik haritalama ile bilgisayara aktarıldı.

### ***Katepsin B Değerlendirmesi***

Gerek kontrol rat normal omuriliği, gerekse travma sonrası değişik düzeylerdeki omurilik dokusunda kahverengi boyanma ile belirlenen immünreaktivite ile karakterize hücrelerin lokalizasyonu yanısıra boyanma tarzı incelenerek Katepsin B pozitivitesi gösteren hücrelerin niteliği araştırılmış, pozitif hücrelerin yoğunluk gösterdiği bölgeler ve kontrol omurilik kesitlerinden farkları incelenmiştir.

### **3.1.4. İstatistiksel Değerlendirme**

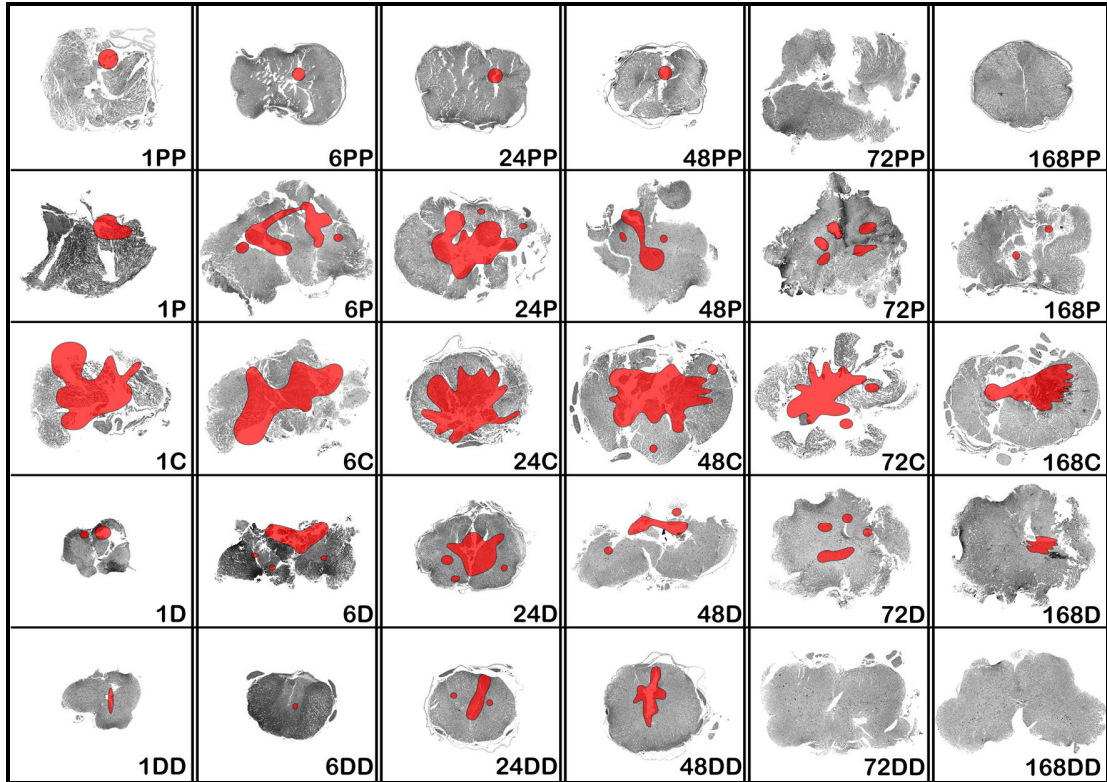
Değişken türleri, denek sayıları ve verilerin dağılımları göz önüne alınarak incelemelerde non-parametrik yöntemler kullanılmıştır. DNA apoptotik hücre sayımları ve DNA zedelenmiş hücre yüzdeleri her saat için lezyon bölgesine göre Kruskal-Wallis testi ve her lezyon bölgesi için saatlere göre Jonckheere-Terpstra testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $p=0.05$  olarak alınmıştır.

## BULGULAR

### 4.1. HE ve LFB Histokimyası

#### 4.1.1. Histopatolojik inceleme, hasar bölgesi / nekroz dağılımı ve ödemin tesbiti, zamana göre (kronolojik) değerlendirme ve haritalama

Hematoksilen Eozin kesitlerde lezyon merkezinde hasardan itibaren birinci saatten başlayarak 48. saate kadar plato oluşturan ve 72. saatten sonra rezorbe olarak 168. saatte (7. gün) belirgin azalma gösteren omurilik hemorajisi, ödemi, doku entegrasyonu kaybı ve kist oluşumu gözlemlendi. Akut hasarın 1. saatinden itibaren lezyonun rostral ve kaudaline doğru alınan kesitlerde kanama ve ödem şiddetinin travma merkezine göre daha az olduğu görüldü. Erken dönemde görülmeye başlayan beyaz cevherdeki belirgin ödem ve gri cevherdeki peteşial kanamaların travmayı takip eden 6–72 saat arasında artarak devam ettiği, 7. günden itibaren rezorbsiyon ile giden astrogliozis ve mikrogliozisin gelişmeye başladığı dikkati çekmiştir. Primer yaralanma bölgesinde gelişen ödemin kordun komşu segmentlerine tedricen yayıldığı, 24-48. saatte hemorajiyle işgal edilmiş hasarlı alanın, özellikle santral zonda nekroza uğradığı gözlemlendi. Bu bulguların haritalaması Şekil 4.1'de verilmiştir. Veziküler akson parçalanması, aksoplazmanın granüler tarzda çözülmesi izlenmiş olmakla birlikte deney süresi içerisinde LFB histokimyası ile 168. saate kadar olan zaman diliminde ve rostralden kaudale uzanımda dikkat çekici bir bulgu saptanmamıştır.



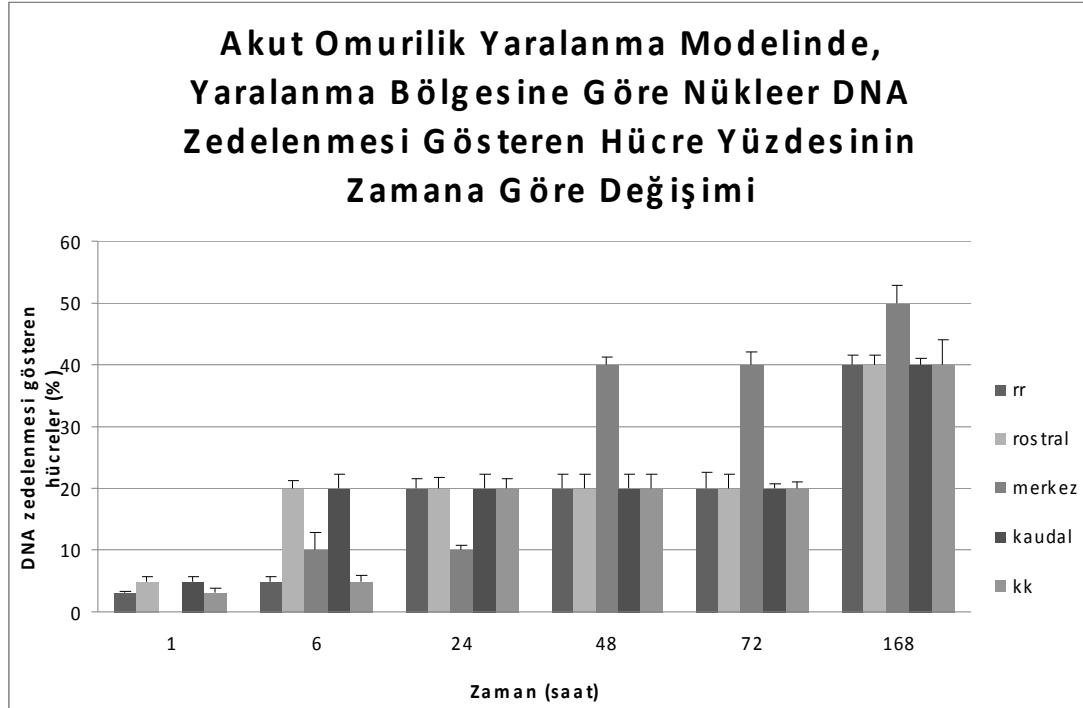
**Şekil 4.1.** Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostrale ve kaudale doğru primer hasar dağılımı haritası. Hasar bölgesi kırmızı ile işaretlenmiştir.

## 4.2. ssDNA İmmünohistokimyası ile Yapılan İncelemeler

### 4.2.1. DNA Hasarı, Rostro-Kaudal Dağılım ve Saatlere Göre (Kronolojik) Değerlendirme

ssDNA immünohistokimyası ile pozitif boyanan nükleusların sayılarak toplam nükleus sayısına oranlanması ile elde edilen zedelenen hücre yüzdesinin, inceleme periyodu içerisinde lezyonun merkezi, rostral ve kaudalindeki dağılımı Şekil 4.2’de sunulmuştur. Primer lezyon merkezini içeren kesitlerde zedelenmenin birinci saatinde lezyon merkezinde DNA hasarlı hücre görülmezken, rostral ve kaudale doğru eşit olarak giden ve en rostral ile en kaudale doğru azalan nükleer DNA zedelenmesi 6 ve 24. saatlerde yavaş yavaş artmakta, 48 ve 72 saatte plato oluşturup, 168. saatte tepe değere ulaşmaktadır. Buna karşılık primer lezyon alanına komşu rostral ve kaudal kesitler ile daha uzak rostral ve daha uzak kaudal kesitlerde de eşit şiddette bir DNA hasar eğrisi platosu gözlenmiş, 168. saatte ise periferde de

lezyon merkezi ile benzer değerlere yaklaşan ikinci bir artışın varlığı dikkati çekmiştir.

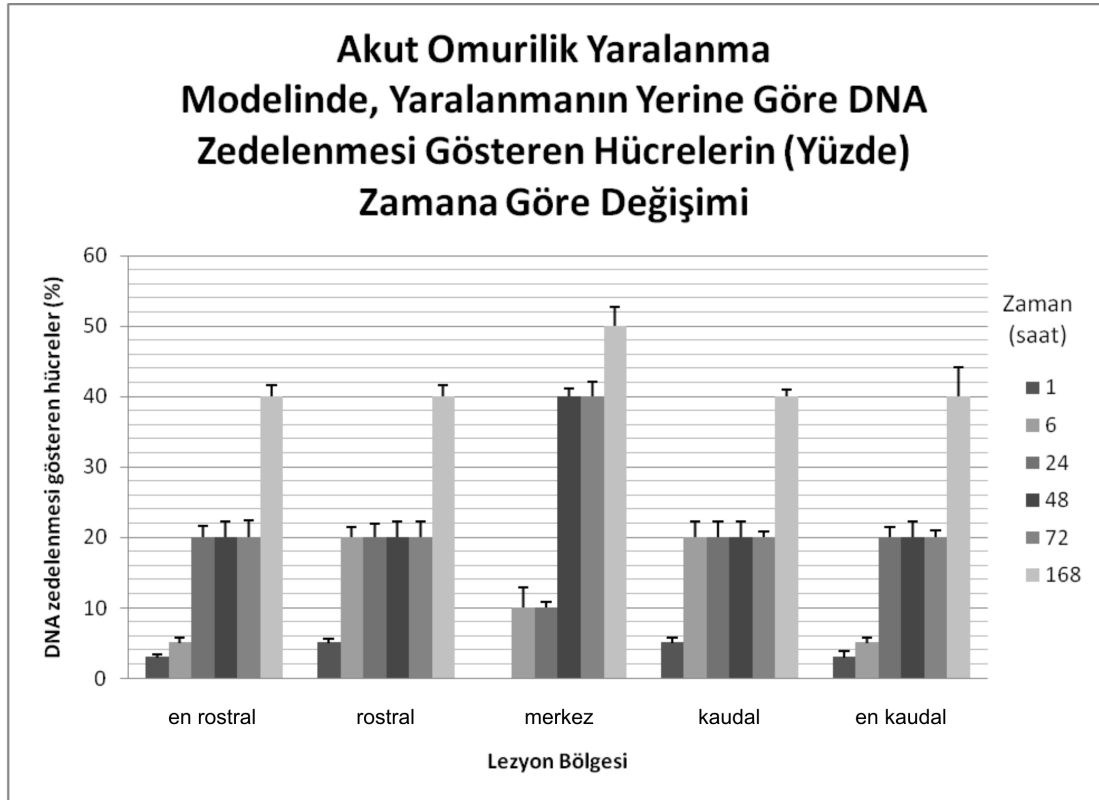


**Şekil 4.2.** Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanma bölgesine göre nükleer DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesinin zamana göre değişimi.

İstatistiksel açıdan değerlendirme yapıldığında, 24. saatteki zedelenmiş hücre yüzdeleri ile lezyon yerleri arasında anlamlı fark yoktur ( $p=0.6443$ ). Birinci saatte istatistiksel anlamlılık sınırına yakın farklar gözlenmekle birlikte denek sayıları tam bir istatistiksel anlamlılıktan bahsetmek için yeterli değildir ( $p=0.04$ ). Diğer tüm zamanlar için gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (6. saatte  $p=0.0155$ , 168. saatte  $p=0.0176$ ). En çarpıcı farklar 48. ve 72. saatte gösterilmiştir (sırası ile  $p=0.0015$  ve  $p=0.007$ , Kruskal-Wallis testi).

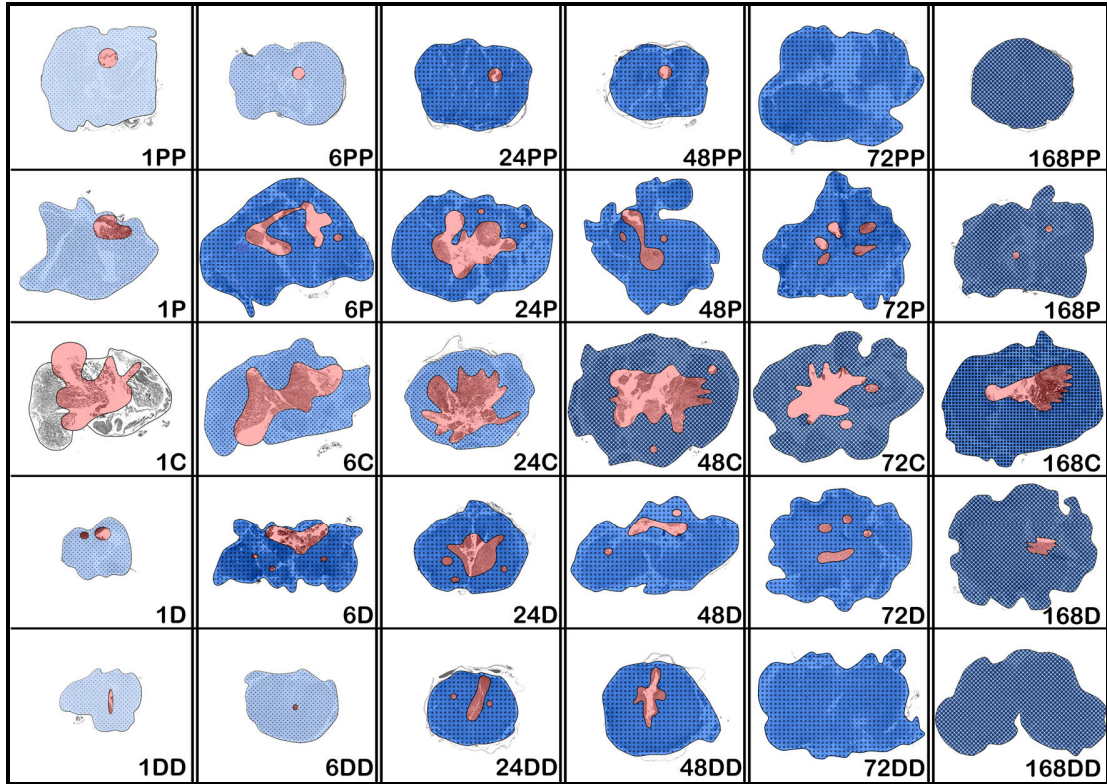
Bu değerleri, aynı zaman diliminde lezyon bölgesine göre grafiğe aktardığımızda, lezyon merkezinde DNA hasar eğrisinin biri 6 ve 24. saatler, diğeri ise 48 ve 72. saatlere karşılık gelen iki ayrı yükseliş platosu gösterdikten sonra 168. saatte tepe değere ulaşmasına karşılık; rostral ve kaudalde 6. saatten 72. saate kadar plato çizip 168. saatte pik yapan, en rostral ve en kaudalde ise 1. ve 6. saatteki düşük DNA hasarı değerlerini takiben 24 ve 72. saatteki lezyona daha yakın bölgelerdekine

eşit bir oranda, 168. saatte de yine rostral ve kaudaldeki eşit oranda zedelenmenin olduğu gözlemlendi. En rostral, rostral, santral, kaudal, en kaudal için, ayrı ayrı her grup için, zamanla DNA zedelenmesi gösteren hücre artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm gruplar için p değeri 0.001'in altındadır (Jonckheere-Terpstra testi) (Şekil 4.3).



**Şekil 4.3.** Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanmanın yerine göre DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesinin zamana göre değişimi

Nükleer DNA zedelenmesi glial hücrelerin yanı sıra endotel hücrelerinde ve daha az sayıda olmakla üzere nöronlarda da gözlemlenmiştir. DNA zedelenmesi ve zedelenme oranları uygun şekilde boyanarak / taranarak kanama ve birincil zedelenme haritası ile birleştirildiğinde elde edilen veriler, Şekil 4.4'de sunulmuştur.

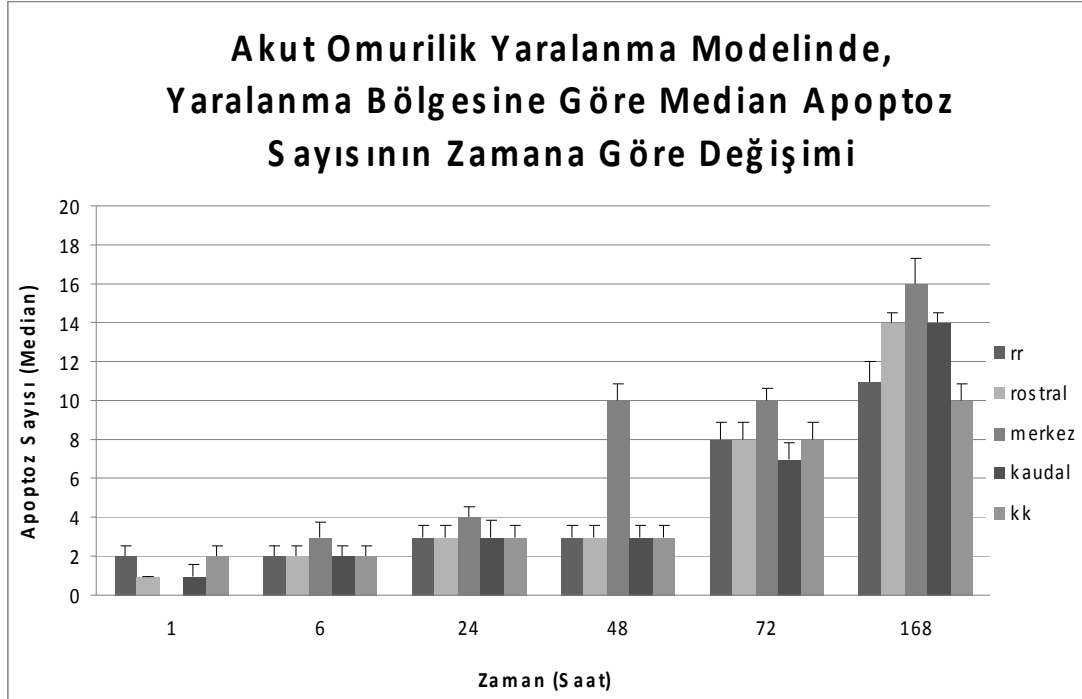


**Şekil 4.4.** Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostrale ve kaudale doğru DNA hasarlı hücre yüzdesi dağılımının haritası (anti ssDNA antikoru, IHC). Mavi renk tonu ve tarama dansitesi, DNA hasarlı hücre miktarı ile orantılıdır.

#### 4.2.2. Apoptoz, Rostro-Kaudal Dağılım ve Saatlere Göre Değerlendirme

ssDNA immünohistokimyası ile pozitif boyanan apoptotik cisimlerin sayılması ile elde edilen median değer, inceleme periyodu içerisinde lezyonun merkezi, rostral ve kaudalindeki dağılımı Şekil 4.5’de sunulmuştur. Zedelenmenin birinci saatinde lezyon merkezinde apoptotik hücre saptanmamıştır. Aynı zaman diliminde rostral ve kaudalde eşit giden ve en rostral ile en kaudalde daha fazla olduğu görülen apoptotik hücreler izlenmektedir. Merkezdeki apoptotik hücre sayısı 6. ve 24. saatlerde giderek artmış, 48. saatte bir pik oluşturarak, 72. saate kadar bu değer ile bir plato yapmış ve 168. saatte en yüksek değere ulaşmıştır. Buna karşılık lezyonun rostral ve kaudali ile daha uzak rostral ve uzak kaudalinde de apoptotik cisim miktarı eşit olmakla birlikte, bu değerler 48. saate kadar yavaş bir artış sergilerken, 72.

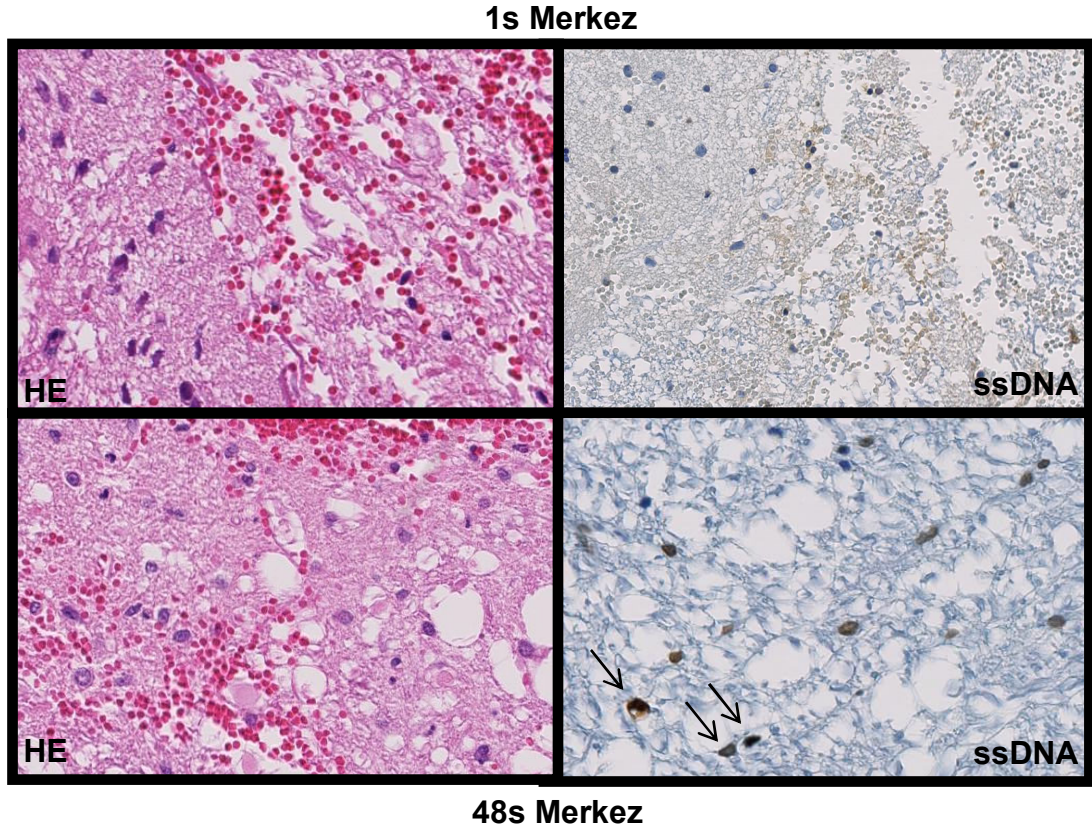
saatten itibaren 168. saate doğru hızla artan ve periferde de lezyon merkezindeki değerlere yaklaşan apoptotik hücre sayısı dikkati çekmiştir (Şekil 4.5).



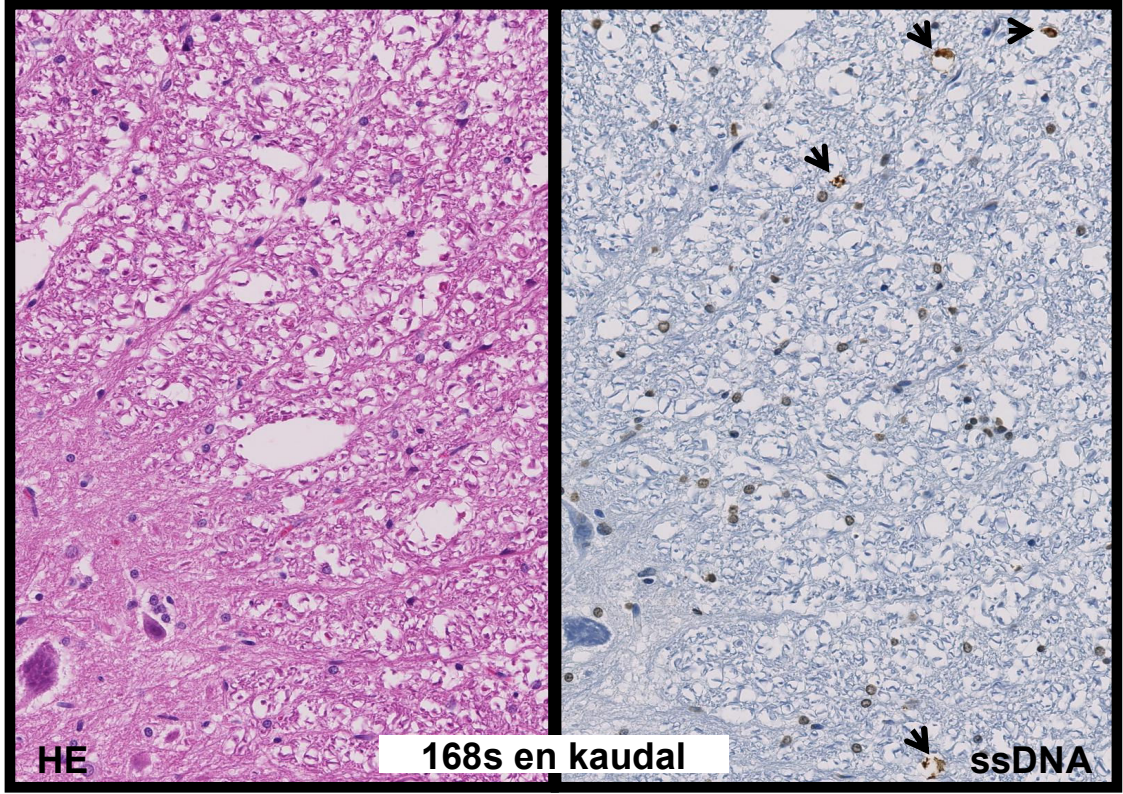
**Şekil 4.5.** Akut omurilik yaralanma modelinde, yaralanma bölgesine göre omurilik yüzeyi başına median apoptotik hücre sayısının zamana göre değişimi

İstatistiksel açıdan değerlendirme yapıldığında, 72. saatteki apoptotik hücre sayıları ile omurilik alt segmentleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır ( $p=0.64$ ). Birinci saatte istatistiksel anlamlılık sınırına yakın farklar göstermekle birlikte denek sayıları tam bir istatistiksel anlamlılıktan bahsetmek için yeterli değildir ( $p=0.04$ ). Diğer tüm zamanlar için gruplar arası farklar istatistiksel olarak anlamlıdır. En çarpıcı farklar 48. ve 168. saatte gösterilmiştir (sırası ile  $p=0.0039$  ve  $0.0004$ ).

Lezyon merkezinde 48. saatteki apoptotik cisimlerdeki artış (Şekil 4.6) ve 168. saatte perifer apoptotik hücrelerdeki artış (Şekil 4.7) dikkat çekici noktalar olduğundan mikrofotograflarla sunulmuştur.

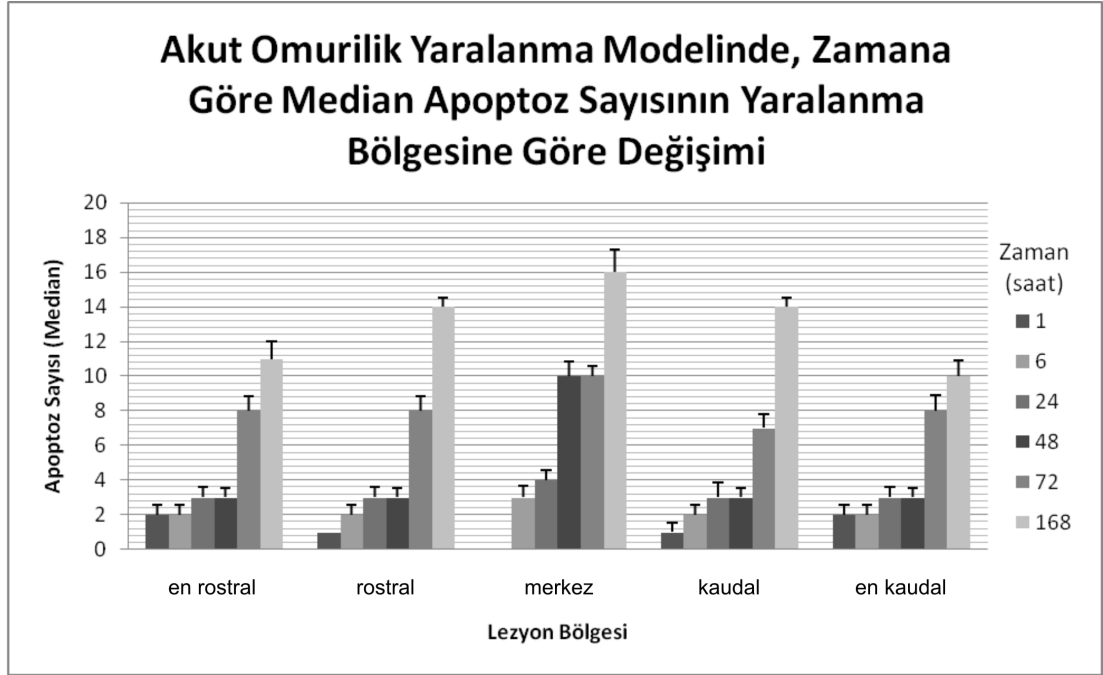


**Şekil 4.6.** Lezyon epimerkezinde, 1. (üstte) ve 48. (altta) saatteki lezyon histopatolojisi. Belirgin kanama, 48. saatte kistler ve artan gliozis izlenmektedir (HEx25). Sağda aynı kesitlerin ssDNA immünohistokimyası sonuçları: 1. saatte apoptoz ve DNA zedeli hücre yokken, 48. saatte hem apoptotik hücreler çok sayıda (ok) hem de kahverengi ile ayırt edilen DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesi artmış olarak izlenmektedir (IHCx25).



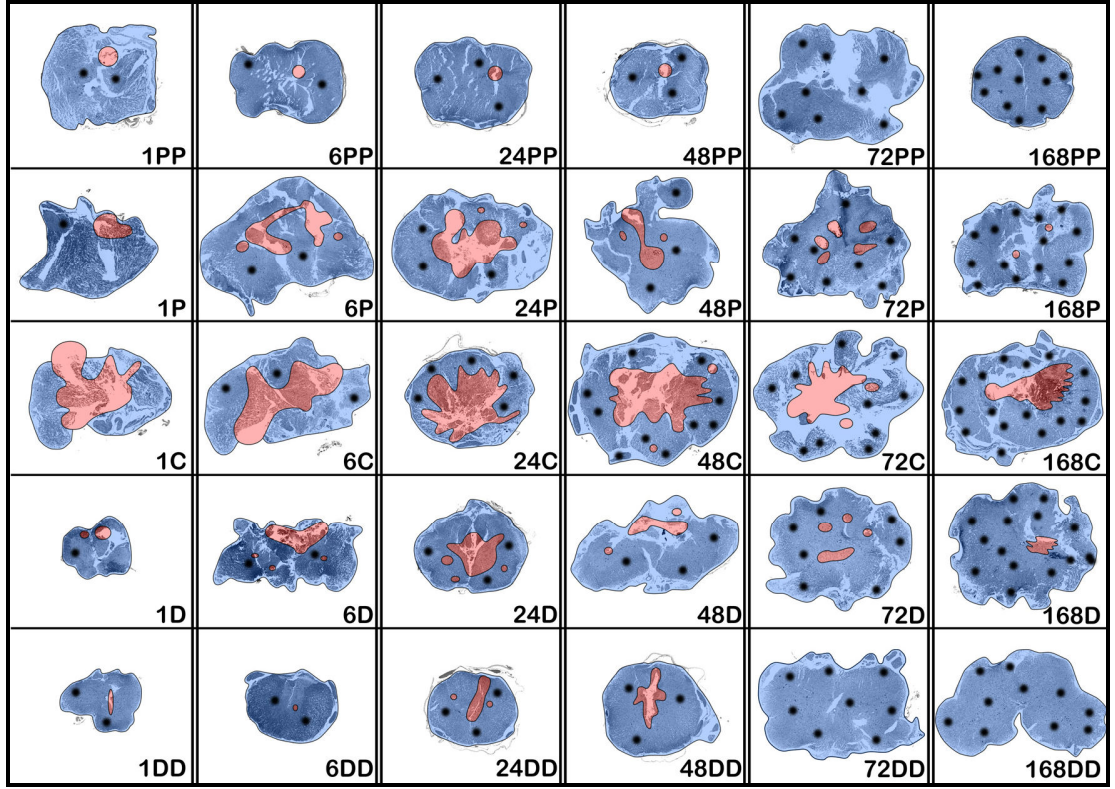
**Şekil 4.7.** Omurilik yaralanmasından bir hafta sonra en kaudalde yapılan histopatolojik inceleme. Kanamanın rezorbe olduğu, kistler ve miyelin parçalanması izlenmektedir (HEx25). Sağda aynı kesitlerin ssDNA immünohistokimyası ile artmış apoptotik cisimler ve bol miktarda DNA zedeli hücre içerdiği izlenmektedir (IHCx25).

Bu değerleri, aynı zaman diliminde lezyon bölgesine göre incelediğimizde, lezyon merkezinde median apoptotik hücre sayısının DNA hasarı eğrisinde olduğu gibi biri 6 ve 24. saatler, diğeri ise 48 ve 72. saatlere karşılık gelen iki kırılma noktası gösterdikten sonra, 168. saatte tepe değere ulaştığı; rostral ve kaudalde ise 48. saate kadar nisbeten yavaş giden bir artışı 72. ve 168. saatte hızlı bir artışın takip ettiği, en rostral ve en kaudalde de 72. saate kadar rostral ve kaudaldekine hemen hemen eşit, ancak 72. saatte hızla artan ve rostral-kaudal değerlerine ulaşan, ancak 168. saatte de yine rostral ve kaudaldekenden daha az sayıda apoptotik cisim varlığı gözlenmiştir. En rostral, rostral, santral, kaudal, en kaudal için, ayrı ayrı her grup için kronolojik apoptotik hücre sayısı artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Tüm gruplar için p değeri 0.001'in altındadır (Jonckheere-Terpstra testi) (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8.** Akut omurilik yaralanma modelinde, zamana göre median apoptotik cisim sayısının yaralanma bölgesine göre değişimi

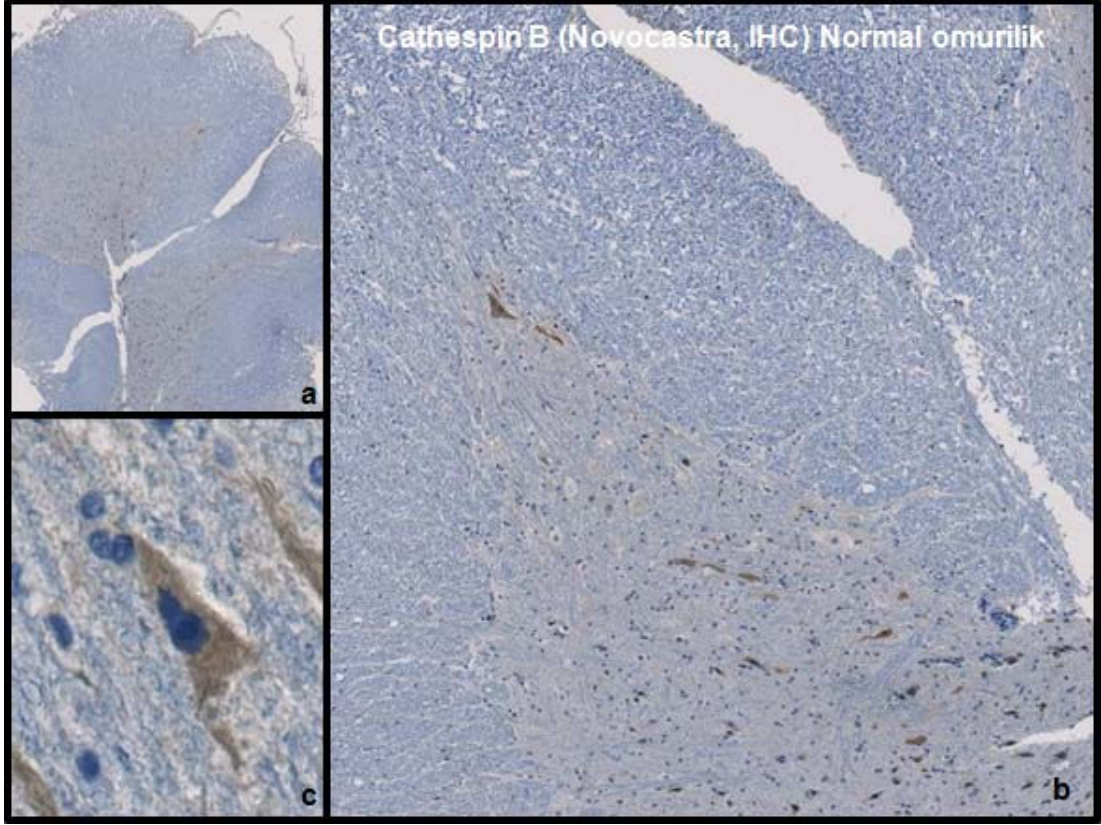
Omurilik kesiti yüzeyinde gri ve beyaz cevherde rastgele dağılım gösteren ancak daha çok beyaz cevheri ilgilendirdiği dikkat çeken apoptotik cisim sayısı, miktarla orantılı olarak izlenebilecek şekilde işaretlenip kanama ve birincil zedelenme haritası ile birleştirildiğinde elde edilen veriler Şekil 4.9'da sunulmuştur.



**Şekil 4.9.** Spinal kord segmentlerinde incelenen zaman dilimlerinde merkezden rostral ve kaudale doğru median apoptotik cisim dağılımının haritası. Siyah noktacık sayısı median apoptotik cisim sayısı ile orantılıdır.

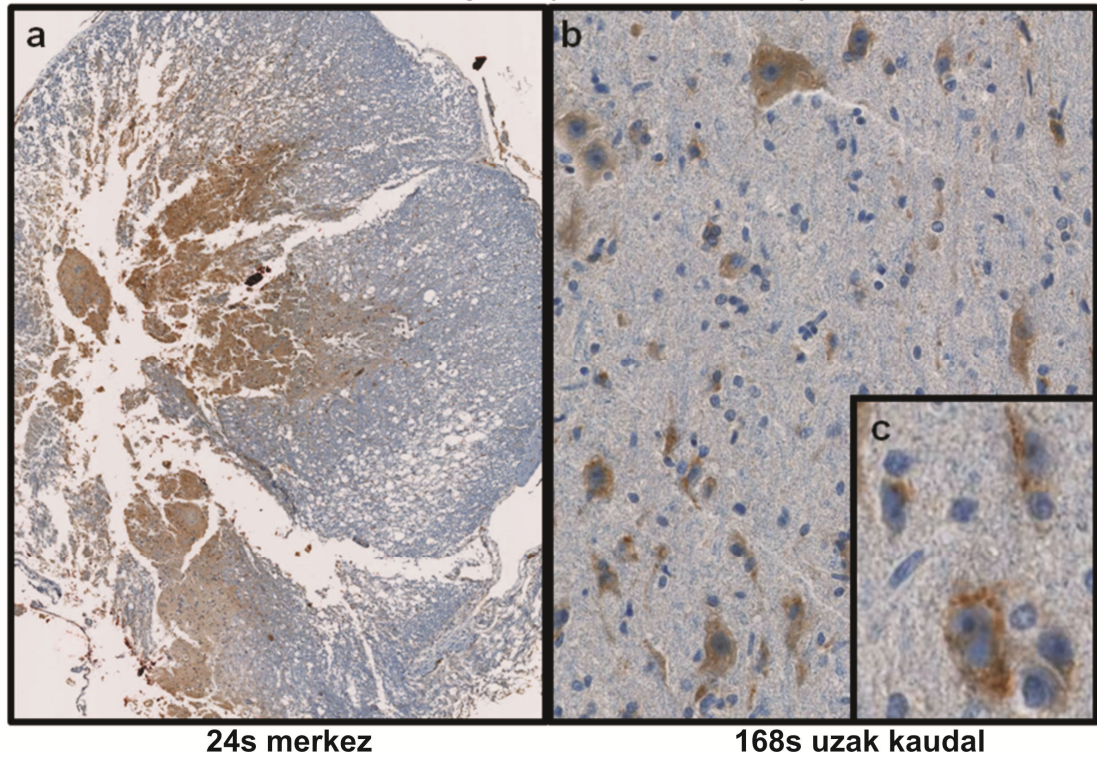
### 4.3. Katepsin B İmmünohistokimyası Değerlendirme

Katepsin B pozitifliğinin kontrol grubu ratlarda spinal kord kesitlerinde nöron gövdesine lokalize olduğu, oligodendrosit ya da astrositlerde bulunmadığı dikkat çekti. Nöronlardaki boyanma ince granüler nitelikte olup, lizozomal dağılıma uyduğu izlenimi verdi (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** Katepsin B ile normal omurilik incelemesi (IHC, a: x2.5, b: x20, c: x100 büyütme)

Travma sonrası lezyon merkezinde hem gri cevher hem de beyaz cevheri kapsayacak şekilde görülen hücre içi lokalizasyonun 24. saatte kaybolduğu dikkati çektii. Yirmidördüncü saatte ekstrasellüler diffüz granüler olarak öncelikle gri cevher, daha az olarak da beyaz cevherde şekilsiz ve sınırları belirgin olmayan bu birikim, 72. saate ortamdan yok olup, 168. saate tekrar hücre içinde saptandı. Fakat bu kez sadece nöronların değil, nöron dışı hücrelerin de sitoplazmasında mevcut idi (Şekil 4.11).

**Katepsin B (Novocastra, IHC)**

**Şekil 4.11.** Travma sonrası omurilikte Katepsin B incelemesi (IHC, a: x5, b: 40, c: x100 büyütme)

## TARTIŞMA

İnsidansı milyonda 15–40 olgu/yıl arasında değişen omurilik yaralanmaları, özellikle motorlu taşıt kazalarından sonra görülmekle beraber düşmeler, spor yaralanmaları, şiddet olayları veya işyeri kazaları ile de birliktelik gösterebilen; yapısal ve fonksiyonel bozukluklarla neticelenen; ciddi engellilik hali, duyu bozuklukları, mesane, barsak ve cinsel fonksiyon bozuklukları, diğer nörolojik defisitler ve hatta ölümü bile beraberinde getirebilen, fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik boyutları olan bir hastalık süreci olup, en çok 16–30 yaş grubundaki genç erişkin erkekleri etkilemektedir. Yıllar içerisinde, travma sonrası rehabilitasyondaki gelişmeler sayesinde, hastalık süreci ve komplikasyonları daha iyi tanınabilmiş, beklenen yaşam süresi uzamış; bu sebeple her ne kadar son 10–20 yıldır hastalık insidansı stabil seyretse de, popülasyondaki prevalansı artmış olarak izlenmektedir<sup>2,82,89</sup>.

Bugün için omurilik yaralanması sonrası kabul edilmiş etkin ve geçerli bir tedavi yöntemi yoktur, çünkü posttravmatik patofizyolojik bulgular henüz inceleme aşamasındadır<sup>89</sup>.

Omurilik yaralanması patofizyolojisi omuriliğin mekanik zedelenmesi ile başlar, ama özünde apoptotik hücre ölümünün uyarılması ile giden ve self-destrüktif bir olay olan ikincil zedelenme ile devam eder<sup>76,78</sup>. Birincil yaralanmanın derecesi yaralanmaya neden olan enerjinin şiddetine, etki süresine ve omurilik tarafından emilen enerji miktarına göre değişim gösterirken, omuriliğin uzun süre bası altında kalması, nörolojik hasarın daha fazla olması ve buna bağlı olarak prognozun daha kötü olmasına sebep olmaktadır<sup>2,34</sup>. İkincil zedelenmede rol oynayan pek çok mekanizma arasında iskemi, reperfüzyon, serbest oksijen radikalleri, eksitatör amino asitler, vasküler mediatörler ve hücre içi  $Ca^{++}$  artışı sonucu kalpain, kaspaz ve katepsin gibi pro-apoptotik proteazların aktivasyonu ile uyarılan apoptotik mekanizma oldukça önem taşır. İkincil zedelenmenin travmadan birkaç saat sonra başlayıp, birkaç gün hatta haftalar boyu devam etmesi nedeniyle bu olayla birlikte giden apoptotik hücre ölümünün, farmakolojik tedavi için de potansiyel bir hedef olduğuna inanılmaktadır.

Omurilik yaralanmasında çeşitli hücre ölüm yolları aktive olabileceğinden farmakolojik tedavi, kombine ajanlar ya da çoklu etkisi olan tek ajan gerektirebilir. Literatürde siklosporin-A<sup>16</sup>, EPC-K1<sup>37</sup>, vitamin E, selenyum<sup>6</sup>, melatonin, meksiletin, eritropoetin, tiyopental ve propofol<sup>50</sup> gibi serbest radikal tutucu ve lipid peroksidasyonunu önleyici çeşitli ajanlar; GM1 gangliosid<sup>38</sup>, thalidomide gibi anti-inflamatuvarlar<sup>72</sup>, immünsüpresif veya immünmodülatörler<sup>12,41</sup>, ya da endotel hasarını önleyen ilaçlar<sup>69</sup> gibi pek çok farmakolojik madde denenmiştir. Bununla birlikte kabul gören, uygulaması olan ve yaklaşık beş yıl önce akut omurilik zedelenmesinin standart tedavisi gözü ile bakılan tek tedavi, non-spesifik serbest radikal tutucu etkili; etki ve sonuçları tartışmalı olup ciddi komplikasyonları olan metilprednizolon tedavisidir<sup>13,49,66</sup>. Kısacası akut omurilik hasarında ikincil hasarı önleyecek, morfolojik ve fonksiyonel sonuçları düzeltebilecek yeni, emniyetli ve etkin tedavi stratejilerine olan ihtiyaç halen şiddetle devam etmektedir.

Nöroproteksiyonda etkin tedavi ajanlarının geliştirilmesinin altında yatan en önemli engeller arasında prelinik çalışmaların yetersiz olması, oluşacak patolojinin öngörülemez olması, patolojik olay dizisindeki değişik komponentlerin interaksiyonu ve fonksiyonel sonuçlarla olan ilişkilerindeki cehaletimiz yanısıra, oluşan zedelenmenin fizyopatolojik detayının tam olarak anlaşılmasındaki bilgi ve teknik yetersizlikler de bulunmaktadır.

Bu sorunların çözümü için, güncel tedavinin hayvan modellerine dayalı olması nedeni ile çeşitli deneysel modeller geliştirilmekte, zedelenmenin standardizasyonu ve tekrarlanabilir oluşuna çaba sarfedilmekte ve bu modeller hem potansiyel tedavi ajanlarının etkilerinin incelenmesi hem de –özellikle– günlerce sürebilen ikincil zedelenmenin detayının anlaşılabilmesi için yapılan, birincil doku zedelenmesinin başlattığı biyokimyasal ve hücre sel yıkımın detayını anlama ve engelleme çalışmalarında kullanılmaktadır<sup>11,19,55,61</sup>. Günümüzde mevcut deneysel omurilik yaralanma modelleri arasında bulunan kontüzyon tipi yaralanma modeli; insan omurilik zedelenmesine en çok benzeyen, daha önce rat çalışmalarında kullanılmış bir model olup; test edilen tedavilerin değeri bu modellerde değerlendirilmiştir<sup>19,68</sup>.

İkincil hasarın temel taşlarından biri olması nedeni ile apoptoz incelemesi önem arzetyemekte olup, omurilik hasarını inceleyen pek çok çalışmada değişik

apoptoz tanı yöntemleri kullanılmıştır<sup>1,7,21,23,91,95</sup>. Daha önceleri, DNA düzenli kırılmasını gösteren hücre ekstresinin ip merdiven görünümü alması ya da elektron mikroskopik kanıt gerektirirken, günümüzde en çok uygulama gören ve son beş yıl içerisinde bu konudaki yayınlarda en çok kullanılan apoptoz tayin yöntemlerinin TUNEL (deoxynucleotidyl transferase dUTP nuclear end labeling) yöntemi ya da çeşitli aktive kaspazların veya apoptotik peptidaz aktive edici faktörün (APAF) biyokimyasal ya da immünohistolojik varlığının gösterilmesi olduğu görülmektedir<sup>1,7,21,23,95</sup>. Bu çalışmalarda en güvenilir yöntemlerden olmakla birlikte TUNEL yönteminde nekrotik hatta normal hücrelerin de boyandığı bildirilmektedir<sup>7,18</sup>. Aktif enzim arama temeline dayanan immünohistokimya çalışmaları ise taze doku varlığını gerektirmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız tek sarmal DNA varlığını tanıyan ve gerek DNA'sı zedelenmiş ancak henüz apoptoza uğramayan hücreleri, gerekse apoptozu en erken dönemde tanıyan ve ayırdeden, nekroz ve normal hücrelerde nonspesifik boyanma göstermeyen ssDNA antikorunu, eksojen ve apoptozla ilişkili DNA hasarını göstermektedir<sup>14,36</sup>. Bu antikorun teorik olarak 5' - 3' ekzonükleaz enzimi ile tamir edilen çift sarmal DNA hasarını belirlediği ve tamir edilemeyecek kadar çok miktarda tek sarmal DNA ortaya çıkarması durumunda ise apoptoza uğrayan hücrelerdeki mevcut parçalanmış tek sarmal DNA'yı tanıdığı düşünülmektedir<sup>14</sup>.

Bu antikor apoptoz araştırmalarında çeşitli malignitelerdeki apoptozu belirlemede birçok çalışmada kullanılmış olmakla birlikte, nörolojik bilimlerde henüz emekleme aşamasındadır. Özellikle adli tıpta uygulama alanında ufku olduğu bildirilmiştir<sup>63</sup>. Literatürde omurilik yaralanmasında ssDNA kullanarak apoptoz incelenen ve rapor edilen tek bir çalışma mevcut olup, metil prednizolon etkisini inceleyen bir çalışmadır. Bu çalışma aynı zamanda elektron mikroskopi ve DNA fragmentasyonu incelemeleri ile de birlikte yürütüldüğünden, ssDNA antikorunun henüz DNA fragmentasyonu olmadan apoptozu belirleyebildiğini, diğer yöntemlerde olduğu gibi nekroz veya non-apoptotik hücrelerde yanlış-pozitifliğin olmadığını da göstermiştir<sup>91</sup>.

Çalışmamız, omurilik zedelenmesi sonrası ssDNA antikorunu kullanarak apoptozu araştıran öncü çalışmalardan biridir.

Şekil 4.1’de haritalaması sunulan ve HE boyaması ile elde edilen kesitlerin kanama ve primer hasarı gösteren ilk iki gün bulguları, daha sonraki saatlerde de şimdiye kadar yayınlanmış olan histopatolojik bulgularla uyum göstermektedir<sup>11,39,43,59</sup>.

DNA hasarı sonuçları incelendiğinde (Şekil 4.2 ve 4.3), zedelenmenin birinci saatinde lezyon merkezinde nekrozun bulunduğu, DNA hasarlı hücrenin hiç olmadığı, rostral ve kaudale doğru eşit olarak giden ve en rostral ile en kaudale doğru azalan nükleer DNA zedelenmesi varlığı görülmüştür. Bu bulgu, primer hasar etkisini, ve merkezden uzaklaştıkça azalan şiddeti yansıtmakta, merkezdeki şiddetli travmanın tüm hücreleri nekroza uğrattırken, travma şiddeti perifere doğru azaldıkça DNA hasarlı hücre yüzdesinin de azaldığını göstermektedir. Lezyon merkezinde 6. ve 24. saatlerde yavaş yavaş artan, 6. saatte birinci saatteki DNA zedelenmesi ile benzer dağılımda ancak sayıca daha fazla DNA’sı zedelenmiş hücrelere, 24. saatten itibaren merkezden uzaklaştıkça eşit dağılımlı ve benzer şiddette bir zedelenme eşlik etmektedir. Subakut faza uyan 48. saat ve sonrasında, merkezdeki DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesi aniden, çok hızla artarak, periferden daha yüksek değerlere ulaşmakta, benzer şekilde rostral ve kaudalde de ikincil hasarı yansıtmak nitelikteki artış 168. saatte daha da belirginlik göstermektedir. En rostral, rostral, santral, kaudal, en kaudal için, her alt segment zamanla artan bir DNA zedelenmesi göstermekle birlikte (tüm gruplar için  $p < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra testi), DNA hasarlı hücrelerin yüzdesinin 48. ve 72. saatlerde çarpıcı artış gösterdiği dikkati çekmektedir (sırası ile  $p = 0.0015$  ve  $p = 0.007$ , Kruskal-Wallis testi).

ssDNA immünohistokimyası değerlendirmelerinde, apoptotik cisimlerin median sayısının da önemli bilgiler yansıtmakta olduğu izlenmiştir: Apoptotik hücreler, en rostral, rostral, santral, kaudal, en kaudal bölgede, ayrı ayrı her alt segment için zamanla artmaktadır ( $p < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra testi). Birinci saatte lezyon merkezinde nekroz ve kanama saptandığı halde, apoptotik cisim yokluğu DNA zedelenmesi ile benzerlik gösterirken, merkezden itibaren rostral ve kaudale doğru apoptotik hücre miktarı DNA zedelenmesi grafiği ile ters orantı göstermekte, yani primer hasar şiddeti ile paralel olarak DNA hasarı azalırken (Şekil 4.3), apoptoz ile ölüm artmaktadır. Bu bulgu, hasarın niteliğinin aynı olmasına rağmen travmanın şiddetinin hücre ölümünün şekline karar verdirici olduğunu düşündürmektedir.

Apoptotik hücre sayımı sonuçları, DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdelerinde de olduğu gibi omurilik hasarı fizyopatolojisinin bugün bilinen özelliklerini birebir yansıtmaktadır. Tüm alt segmentlerde, zamanla giderek artan ve istatistiksel olarak anlamlı bir median apoptotik hücre sayısı izlenmiştir ( $p < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra testi). Lezyon merkezinde apoptoz sayısının ilk yükseldiği dönem olan 48. saatte, istatistiksel olarak da belirgin farklı tepe değeri ( $p = 0.003$ , Kruskal-Wallis testi), sekonder hasar ve subakut zedelenme döneminin başlangıcına karşılık gelmektedir. Lezyonun rostral ve kaudali ile daha uzak rostral ve daha uzak kaudalinde de apoptotik cisimler eşit miktarlarda ve paralel artışlar göstermektedir. Merkezde 48. saatte gördüğümüz ve ikincil hasara karşılık gelen apoptoz artışını, ikincil hasara yol açan etkenlerin merkezden periferde doğru uzanma zamanını da belirleyecek şekilde; 72. saatte periferde de apoptoz artışı eşlik etmekte ve spinal kord segmentinin incelediğimiz kısmının tamamını ilgilendiren boyutta apoptotik hücrelerin varlığı görülmektedir. Diğer bir deyimle alt segmentler arası apoptoz sayısı farkı anlamlı değildir ( $p = 0.64$ , Kruskal-Wallis testi). Yüzaltmışsekizinci saatte lezyon merkezinde daha belirgin olacak şekilde, gerek merkez gerekse periferde apoptotik hücre sayısındaki artış sürmekte ve izlediğimiz zaman çerçevesi içindeki en yüksek değerlere ulaşmaktadır.

Bu çalışmanın başlıca bulguları 48. saatten başlayarak birinci haftaya kadar özellikle lezyon merkezinde daha şiddetli olan, hem DNA zedelenmesi gösteren hücre yüzdesi hem de apoptoz ile ölen hücre sayısında artış ile giden lezyonların, omurilik zedelenmesinin fazlarına birebir uyum göstermesidir. Benzer bulgular Rowland ve arkadaşları tarafından da gösterilmiştir<sup>76</sup>. Ancak diğer çalışmalardan farklı olarak bizim çalışmamızda immünohistokimya ile inceleme yapılması nedeni ile gerek apoptotik cisim ve hücrelerin, gerekse DNA hasarlı hücrelerin lokalizasyon ve morfolojik özelliklerinin korunması, dolayısı ile hem niteliklerinin anlaşılabilmesi, hem de kantitatif çalışmaya olanak sağlaması, biyokimyasal ekstraktlarda yapılan çalışmalara oranla büyük avantajlar sağlamış; örneğin DNA hasarlı hücrelerin hassas bir dağılım haritası çıkartılabilmektedir. Bu çalışmada dikkati çeken bir başka bulgu ise DNA zedelenmesinin çoğunlukla glia ve endotel hücrelerini ilgilendirip, nöronlarda oldukça az görülmesiydi. Benzer şekilde apoptotik cisimler de hemen daima beyaz cevherde gözleniyordu. Gerek nöronlar gerekse glial hücreler hasara duyarlı hücreler

olmakla birlikte, nöron ölümünün hemen daima nekroz ile olduğu, glial hücrelerin ise primer hasar sonrasında daha ziyade apoptotik ölümle kaybedilmelerinin bu duruma sebep olabileceği düşünüldü. Literatürde de bu bulgu ve düşünceyi destekler şekilde, oligodendrositlerdeki Fas reseptörlerinin, aktive mikroglia Fas ligandını uyarması ve böylece p75 nörotropin reseptörü üzerinden apoptoza giden sinyal yolunu uyardığı gösterilmiştir<sup>76</sup>.

ssDNA antikoru kullanılarak yapılan apoptoz incelemesinin bir diğer üstün yanı da henüz ölmemiş, ancak DNA'sı zedelenmiş hücreleri saptayabilmesidir. Çalışmamızda DNA hasar grafikleri (Şekil 4.3-4.5) ve haritalamasının da, omurilik zedelenmesindeki lezyonların şiddet ve dağılımını; median apoptotik hücre sayısı kadar iyi yansıttığı (Şekil 4.6-4.10) görülmektedir. Açıklanan bu son özellikleri nedeniyle çeşitli deneysel çalışmalar ve omurilik yaralanması sonrasındaki tedavi ve ilaç cevabı ölçümlerinde ya da kök hücre tedavisi ile yapılacak deneysel çalışmalarda çalışmamızda kullandığımız bu yöntemin kullanımının, apoptozu gösteren diğer metodlara oranla daha üstün olacağı düşünülmüştür.

Hücre kültürlerinde oksidatif stres ile oluşturulan apoptozun, ssDNA antikoru, TUNEL metodu, annexin-V bağlanması, poly-ADP-riboz-polimeraz (PARP) ve Apo 2.7 ekspresyonu olmak üzere beş ayrı yöntemle ölçülerek karşılaştırıldığı ve nekrozla apoptoz ayırımında hangi yöntemin üstün olduğunu araştıran bir çalışmada, ssDNA antikoru metodunun erken apoptozu göstermesi yanısıra nekroz ve apoptoz ayırtma açısından da en özgül ve duyarlı yöntem olduğu bildirilmiştir<sup>96</sup>.

Bu çalışmada ayrıca Katepsin B'nin varlığı ve dağılımı da incelenmiştir. Omurilik hasarında ikincil cevaptaki enzimatik süreç ve aktivasyonunda, hasar sonrası artan  $Ca^{++}$  düzeyine etki eden proteazlardan olan kalpain, kaspazlar ve Katepsin B, MSS hücre ölüm modellerinde nörodejenerasyon ve hücre ölümü ile ilişkilidir<sup>56,78</sup>. Katepsin B'nin, serebral iskemi modellerinde önemli bir rolü olduğu anlaşılmıştır<sup>90</sup>. Kontüzyon tipi omurilik yaralanmasında Katepsin B'nin hücre lokalizasyonu ve enzimatik aktivitesi ilk olarak 2005 yılında incelenmiştir, bu çalışma literatürde Katepsin B'nin mekanik omurilik hasarında doku yıkımındaki önemini gösteren tek çalışmadır<sup>32</sup>. Aslında normal omurilikteki lokalizasyon ve dağılımı dahi çok iyi bilinmemektedir<sup>32</sup>. Çalışmamızda parafin kesitlere yapılan

immünohistokimyasal incelemelerde kontrol grubu ratlarda Katepsin B pozitifliğinin, nöron gövdesine lokalize olduğu, oligodendrosit, mikroglia ya da astrositlerde, ve endotel hücrelerinde bulunmadığı dikkati çekmiştir. Travma sonrası 24. saatte nekroza uğrayan nöronların kaybı ile birlikte Katepsin B pozitifliği'nin hücre içi lokalizasyonun ortadan kalktığı, buna karşılık travma bölgesinde, merkezde hem gri hem de beyaz cevheri içine alacak şekilde diffüz tarzda boyanma verdiği, ve 24. saatten sonra ise fagositik hücreler tarafından temizlenerek 168. saatte tekrar hücre içinde saptandığı, ancak bu kez lokalize olduğu hücrelerin sadece nöronlar olmayıp, çevre mikroglial hücrelerde de olduğu izlenmiştir. Katepsin B'nin 24. saatte hücre dışına çıkması, ikincil zedelenmenin başlamasında önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir. Ayrıca, travma grubunda nöronlardaki Katepsin B boyanma niteliğinin, kontrol rat nöron gövdelerinkinden farklı yapıda olması da omurilik yaralanma sürecindeki zaman içerisinde değişim gösteren rolünün önemli bir yansımasıdır. Bulgularımız ve bugüne kadar yapılan az sayıdaki deneysel çalışmalarda her ne kadar omurilik yaralanmasında Katepsin B ekspresyonu ile ilgili anlamlı bulgular saptanmış ise de, bu yolağın tam olarak anlaşılabilmesi için ileri ve detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sunulan bu çalışma hem ssDNA hem de Katepsin B bulgularını birarada toparlayan ilk çalışma niteliğindedir.

Omurilik yaralanması yapısal ve moleküler patolojisinin iyi bilinmesi, başarılı nöral hücre onarımı ve tedavi ile ilgili problemleri aşma bakımından hem gerekli hem de şarttır. Bu nedenle süreçte rol oynayan kompleks biyolojik olayların ve hasar, hücre ölümü, rejenerasyon ve tamir gibi karmaşık mekanizmaların iyi anlaşılabilmesi gerekmektedir. Apoptoz konusundaki çalışmalar omurilik zedelenmesinin kaçınılmaz parçası ve olmazsa olmaz bir sonucu ise de, şu anda apoptoz ve nörolojik sekeller arasındaki ilişkinin tam olarak bilinmiyor olması, bu konuda fonksiyonel çalışmaların da yapılması gereğini göstermektedir.

## SONUÇ

Akut travmatik omurilik yaralanmalarında bugün için kabul edilmiş etkin ve geçerli bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi için posttravmatik patofizyolojinin tam olarak bilinmesi gereklidir. Omurilik yaralanması mekanik zedelenme ile başlar ama özünde apoptotik hücre ölümünün uyarılması ile giden, self-destrüktif bir olay olan ikincil zedelenme ile devam eder. İkincil hasarın temel taşlarından biri olması nedeni ile apoptozun incelenmesi travma patofizyolojisinin öğrenilebilmesi için önemli basamaklardan biridir. Bu nedenle omurilik hasarını inceleyen pek çok çalışmada değişik apoptoz tanı yöntemleri kullanılmıştır. Çalışmamızda, elde edilen önemli sonuçlar:

- 1) Deneysel omurilik kontüzyon travmasında apoptoz ve DNA hasarı kronolojik olarak incelenmiş ve literatürde ilk defa ssDNA antikoru kullanılarak travma bölgesi ile komşuluğundaki dağılımları haritalanmıştır. Verilerin incelenmesi ile literatürle uyumlu olarak zaman içerisinde apoptoz ve DNA hasarının artarak devam ettiği gösterilmiştir.
- 2) Nekroz ve proteolitik enzim hasarını gösteren Katepsin B'nin akut omurilik yaralanmasındaki hücre yıkımında travmanın 24. saatinden itibaren rolü olabileceğini düşündüren bulgularımız, bu molekülün etkilerinin daha detaylı olarak anlaşılabilmesi için ileri ve detaylı araştırmaların yapılmasına değer olduğunu düşündürmüştür.
- 3) Bu çalışmada elde edilen belki de en önemli sonuç; literatürde ilk kez deneysel omurilik kontüzyon travmasında tek sarmal DNA varlığını saptayarak gerek DNA'sı zedelenmiş ancak henüz apoptoza uğramayan hücreleri, gerekse apoptozu en erken dönemde tanıyan ve ayırdeden, nekroz ve normal hücrelerde nonspesifik boyanma göstermeyen ssDNA antikorunun; in-situ kantitatif çalışmalara olanak verdiği gösterilmiştir. Literatürde bu antikorla yapılan daha önceki çalışmalar kalitatif olup bizim çalışmamızda olduğu gibi detaylı bir haritalama yapılmamıştır.

## KAYNAKLAR

1. Adjan VV, Hauser KF, Bakalkin G, Yakovleva T, Gharibyan A, Scheff SW, et al: Caspase-3 activity is reduced after spinal cord injury in mice lacking dynorphin: differential effects on glia and neurons. **Neuroscience** **148**:724-736, 2007
2. Akbay A, Palaoğlu S: Acil Spinal Girişimler, in Ozgen T, Ziyal I (eds): **Acil Nöroşirürji**. Ankara: Hacettepe Universitesi Yayinlari, 2009, pp 124-151
3. Alessandri B, Bullock R: Glutamate and its receptors in the pathophysiology of brain and spinal cord injuries. **Prog Brain Res** **116**:303-330, 1998
4. Allen AR: Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An Experimental study. **J Nerv Ment Dis** **31**:141-147, 1914
5. Allen AR: Surgery of experimental lesions of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. A preliminary report. **J Am Med Assoc** **57**:878-880, 1911
6. Anderson DK, Saunders RD, Demediuk P, Dugan LL, Braugher JM, Hall ED, et al: Lipid hydrolysis and peroxidation in injured spinal cord: partial protection with methylprednisolone or vitamin E and selenium. **Cent Nerv Syst Trauma** **2**:257-267, 1985
7. Arishima Y, Setoguchi T, Yamaura I, Yone K, Komiya S: Preventive effect of erythropoietin on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rats. **Spine (Phila Pa 1976)** **31**:2432-2438, 2006
8. Bakshi R, Faden AI: Competitive and non-competitive NMDA antagonists limit dynorphin A-induced rat hindlimb paralysis. **Brain Res** **507**:1-5, 1990
9. Balentine JD: Pathology of experimental spinal cord trauma. II. Ultrastructure of axons and myelin. **Lab Invest** **39**:254-266, 1978
10. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. **Exp Neurol** **139**:244-256, 1996
11. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC: Cell death in models of spinal cord injury. **Prog Brain Res** **137**:37-47, 2002

12. Bilginer B, Onal MB, Narin F, Ustun H, Kilinc K, Akalan N: Antiapoptotic and neuroprotective effects of mycophenolate mofetil after acute spinal cord injury in young rats. **Childs Nerv Syst** **25**:1555-1561, 2009
13. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, et al: A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. **N Engl J Med** **322**:1405-1411, 1990
14. Bree RT, Neary C, Samali A, Lowndes NF: The switch from survival responses to apoptosis after chromosomal breaks. **DNA Repair (Amst)** **3**:989-995, 2004
15. Bresnahan JC, Schuman SL, Beattie MS: Evidence for apoptosis of oligodendroglia in long tracts undergoing wallerian degeneration after spinal cord injury (SCI) in monkeys. **Soc Neurosci Abstr** **22**:1185, 1996
16. Buki A, Okonkwo DO, Povlishock JT: Postinjury cyclosporin A administration limits axonal damage and disconnection in traumatic brain injury. **J Neurotrauma** **16**:511-521, 1999
17. Bunge RP, Puckett WR, Becerra JL, Marcillo A, Quencer RM: Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. **Adv Neurol** **59**:75-89, 1993
18. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konak S, Ulukus C, et al: Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. **Proc Natl Acad Sci USA** **99**:2258-2263, 2002
19. Chen A, Springer JE: Neuroproteomic methods in spinal cord injury. **Methods Mol Biol** **566**:57-67, 2009
20. Choi DW: Excitotoxic cell death. **J Neurobiol** **23**:1261-1276, 1992
21. Citron BA, Arnold PM, Haynes NG, Ameenuddin S, Farooque M, Santacruz K, et al: Neuroprotective effects of caspase-3 inhibition on functional recovery and tissue sparing after acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)** **33**:2269-2277, 2008
22. Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, Qin F, Malladi S, Ameenuddin S, et al: Rapid upregulation of caspase-3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein,

- and cellular localization correlates with apoptotic cell death. **Exp Neurol** **166**:213-226, 2000
23. Colak A, Kaya M, Karaoglan A, Sagmanligil A, Akdemir O, Sahan E, et al: Calpain inhibitor AK 295 inhibits calpain-induced apoptosis and improves neurologic function after traumatic spinal cord injury in rats. **Neurocirugia (Astur)** **20**:245-254, 2009
  24. Cortez SC, McIntosh TK, Noble LJ: Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. **Brain Res** **482**:271-282, 1989
  25. Croft PG: Electroencephalography and space-occupying lesions in small animals. **J Small Anim Pract** **13**:175-184, 1972
  26. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS: Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. **Nat Med** **3**:73-76, 1997
  27. Dawson TM, Steiner JP, Dawson VL, Dinerman JL, Uhl GR, Snyder SH: Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A** **90**:9808-9812, 1993
  28. Demopoulos HB, Flamm ES, Seligman ML, Pietronigro DD, Tomasula J, DeCrescito V: Further studies on free-radical pathology in the major central nervous system disorders: effect of very high doses of methylprednisolone on the functional outcome, morphology, and chemistry of experimental spinal cord impact injury. **Can J Physiol Pharmacol** **60**:1415-1424, 1982
  29. Demopoulos HB, Yoder M, Gutman EG, Seligman ML, Flamm ES, Ransohoff J: The fine structure of endothelial surfaces in the microcirculation of experimentally injured feline spinal cords. **Scanning Electron Microscopy** **2**:667-682, 1978
  30. Dohrmann GJ, Wagner FC, Jr., Wick KM, Bucy PC: Fine structural alterations in transitory traumatic paraplegia. **Proc Veterans Adm Spinal Cord Inj Conf** **18**:6-8, 1971

31. Du C, Hu R, Csernansky CA, Hsu CY, Choi DW: Very delayed infarction after mild focal cerebral ischemia: a role for apoptosis? **J Cereb Blood Flow Metab** **16**:195-201, 1996
32. Ellis RC, O'Steen WA, Hayes RL, Nick HS, Wang KK, Anderson DK: Cellular localization and enzymatic activity of cathepsin B after spinal cord injury in the rat. **Exp Neurol** **193**:19-28, 2005
33. Faden AI, Simon RP: A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. **Ann Neurol** **23**:623-626, 1988
34. Fehlings MG, Sekhon LH, Tator C: The role and timing of decompression in acute spinal cord injury: what do we know? What should we do? **Spine (Phila Pa 1976)** **26**:S101-110, 2001
35. 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** **71**:403-416, 1989
36. Frankfurt O, Krishan A: Application of anti-ssDNA monoclonal antibody to study exogenous and apoptosis-associated DNA damage. **Cytometry A** **73A**:1114-1115, 2008
37. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K: Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)** **25**:24-29, 2000
38. Geisler FH, Dorsey FC, Coleman WP: Recovery of motor function after spinal-cord injury--a randomized, placebo-controlled trial with GM-1 ganglioside. **N Engl J Med** **324**:1829-1838, 1991
39. Gensel JC, Tovar CA, Hamers FP, Deibert RJ, Beattie MS, Bresnahan JC: Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. **J Neurotrauma** **23**:36-54, 2006
40. Giulian D, Robertson C: Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. **Ann Neurol** **27**:33-42, 1990
41. Gok B, Sciubba DM, Okutan O, Beskonakli E, Palaoglu S, Erdamar H, et al: Immunomodulation of acute experimental spinal cord injury with human immunoglobulin G. **J Clin Neurosci** **16**:549-553, 2009

42. Griffiths IR, McCulloch MC: Nerve fibres in spinal cord impact injuries. Part 1. Changes in the myelin sheath during the initial 5 weeks. **J Neurol Sci** **58**:335-349, 1983
43. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR: Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. **Exp Neurol** **168**:273-282, 2001
44. Guha A, Tator CH, Piper I: Increase in rat spinal cord blood flow with the calcium channel blocker, nimodipine. **J Neurosurg** **63**:250-259, 1985
45. Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW: Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neuroscience** **68**:615-619, 1995
46. Hall ED, Braugher JM: Glucocorticoid mechanisms in acute spinal cord injury: a review and therapeutic rationale. **Surg Neurol** **18**:320-327, 1982
47. Hansebout RR, Kuchner EF, Romero-Sierra C: Effects of local hypothermia and of steroids upon recovery from experimental spinal cord compression injury. **Surg Neurol** **4**:531-536, 1975
48. Holtz A, Nystrom B, Gerdin B, Olsson Y: Neuropathological changes and neurological function after spinal cord compression in the rat. **J Neurotrauma** **7**:155-167, 1990
49. Hurlbert RJ, Hamilton MG: Methylprednisolone for acute spinal cord injury: 5-year practice reversal. **Can J Neurol Sci** **35**:41-45, 2008
50. Kaptanoğlu E: Omurilik yaralanması, in Aksoy K., Palaoğlu S., Pamir N., R. T (eds): **Temel Nöroşirurji**. Ankara: Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları, 2005, Vol 2, pp 1144-1155
51. Kaptanoglu E, Sen S, Beskonakli E, Surucu HS, Tuncel M, Kilinc K, et al: Antioxidant actions and early ultrastructural findings of thiopental and propofol in experimental spinal cord injury. **J Neurosurg Anesthesiol** **14**:114-122, 2002
52. Katoh K, Ikata T, Katoh S, Hamada Y, Nakauchi K, Sano T, et al: Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. **Neurosci Lett** **216**:9-12, 1996
53. Khan M, Griebel R: Acute spinal cord injury in the rat: comparison of three experimental techniques. **Can J Neurol Sci** **10**:161-165, 1983

54. Kobrine AI: Blood flow in experimental cord trauma. **J Neurosurg** **50**:270-271, 1979
55. Kouyoumdjian P, Lonjon N, Prieto M, Haton H, Privat A, Asencio G, et al: A remotely controlled model of spinal cord compression injury in mice: toward real-time analysis. **J Neurosurg Spine** **11**:461-470, 2009
56. Li Z, Hogan EL, Banik NL: Role of calpain in spinal cord injury: increased calpain immunoreactivity in rat spinal cord after impact trauma. **Neurochem Res** **21**:441-448, 1996
57. Liu J, Farmer JD, Jr, Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. **Cell** **66**:807-815, 1991
58. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al: Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. **J Neurosci** **17**:5395-5406, 1997
59. Lonjon N, Kouyoumdjian P, Prieto M, Bauchet L, Haton H, Gaviria M, et al: Early functional outcomes and histological analysis after spinal cord compression injury in rats. **J Neurosurg Spine** **12**:106-113
60. Lucas JH, Wang GF, Gross GW: NMDA antagonists prevent hypothermic injury and death of mammalian spinal neurons. **J Neurotrauma** **7**:229-236, 1990
61. Marques SA, Garcez VF, Del Bel EA, Martinez AM: A simple, inexpensive and easily reproducible model of spinal cord injury in mice: morphological and functional assessment. **J Neurosci Methods** **177**:183-193, 2009
62. Martin SH, Bloedel JR: Evaluation of experimental spinal cord injury using cortical evoked potentials. **J Neurosurg** **39**:75-81, 1973
63. Michiue T QL, Ishikawa T, Zhu BL, Maeda H: Quantitative analysis of single-stranded DNA immunoreactivity as a marker of neuronal apoptosis in hippocampus with regard to the causes of death in medicolegal autopsy. **Leg Med (Tokyo)**:S168-170, 2009
64. Nashmi R, Fehlings MG: Mechanisms of axonal dysfunction after spinal cord injury: with an emphasis on the role of voltage-gated potassium channels. **Brain Res Brain Res Rev** **38**:165-191, 2001

65. Nemecek S: Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. **Adv Neurol** **20**:395-405, 1978
66. Nesathurai S: Steroids and spinal cord injury: revisiting the NASCIS 2 and NASCIS 3 trials. **J Trauma** **45**:1088-1093, 1998
67. Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibana K, et al: Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. **J Neurosci** **15**:1001-1011, 1995
68. Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW: Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. **ILAR J** **48**:385-395, 2007
69. Pannu R, Christie DK, Barbosa E, Singh I, Singh AK: Post-trauma Lipitor treatment prevents endothelial dysfunction, facilitates neuroprotection, and promotes locomotor recovery following spinal cord injury. **J Neurochem** **101**:182-200, 2007
70. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH: Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. **Spine (Phila Pa 1976)** **32**:2853-2859, 2007
71. Regan RF: The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: comparison with cortical neurons. **Neurosci Lett** **213**:9-12, 1996
72. Reyes-Alva HJ, Franco-Bourland RE, Martinez-Cruz A, Grijalva I, Fuchs B, Madrazo I, et al: Thalidomide fails to be therapeutic following contusive spinal cord injury in rats. **Acta Neurobiol Exp (Wars)** **69**:494-503, 2009
73. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK: Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. **Am J Pathol** **147**:1575-1583, 1995
74. Rivlin AS, Tator CH: Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. **Surg Neurol** **10**:38-43, 1978
75. Ross IB, Tator CH: Further studies of nimodipine in experimental spinal cord injury in the rat. **J Neurotrauma** **8**:229-238, 1991
76. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG: Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. **Neurosurg Focus** **25**:E2, 2008

77. Salzman SK, Puniak MA, Liu ZJ, Maitland-Heriot RP, Freeman GM, Agresta CA: The serotonin antagonist mianserin improves functional recovery following experimental spinal trauma. **Ann Neurol** **30**:533-541, 1991
78. Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Knaryan VH, Matzelle DD, Yallapragada AV, et al: Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. **J Pineal Res** **44**:348-357, 2008
79. Samuelson J, von Lichtenberg F: Cellular injury and cellular death, in Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster J (eds): **Pathologic Basis of Disease**. Philadelphia, PA: Saunders, 2009
80. Sandler AN, Tator CH: Review of the effect of spinal cord trauma on the vessels and blood flow in the spinal cord. **J Neurosurg** **45**:638-646, 1976
81. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. **Physiol Rev** **76**:319-370, 1996
82. Sekhon LH, Fehlings MG: Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. **Spine (Phila Pa 1976)** **26**:S2-12, 2001
83. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE: Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. **Nat Med** **5**:943-946, 1999
84. Stys PK, Waxman SG, Ransom BR: Ionic mechanisms of anoxic injury in mammalian CNS white matter: role of Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. **J Neurosci** **12**:430-439, 1992
85. Taoka Y, Okajima K: Spinal cord injury in the rat. **Prog Neurobiol** **56**:341-358, 1998
86. Tarlov IM, Klinger H, Vitale S: Spinal cord compression studies. I. Experimental techniques to produce acute and gradual compression. **AMA Arch Neurol Psychiatry** **70**:813-819, 1953
87. Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. **Neurochirurgie** **37**:291-302, 1991
88. Tator CH: Spine-spinal cord relationships in spinal cord trauma. **Clin Neurosurg** **30**:479-494, 1983
89. Torun F, Attar A: Omurilik yaralanması ve değerlendirilmesi, in Aksoy K (ed): **Temel Nöroşirürji**. Ankara: Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, 2005, Vol 2, pp 1156 – 1163

90. Unal-Cevik I, Kilinc M, Can A, Gursoy-Ozdemir Y, Dalkara T: Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. **Stroke** **35**:2189-2194, 2004
91. Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C, Bonilla C: Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. **Histol Histopathol** **21**:1091-1102, 2006
92. Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F: Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. **Exp Neurol** **88**:108-122, 1985
93. Wrathall JR, Teng YD, Choiniere D, Mundt DJ: Evidence that local non-NMDA receptors contribute to functional deficits in contusive spinal cord injury. **Brain Res** **586**:140-143, 1992
94. Young W: Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. **J Emerg Med** **11 Suppl 1**:13-22, 1993
95. Yu WR, Liu T, Fehlings TK, Fehlings MG: Involvement of mitochondrial signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord injury. **Eur J Neurosci** **29**:114-131, 2009
96. Zhao J, Schmid-Kotsas A, Gross HJ, Gruenert A, Bachem MG: Sensitivity and specificity of different staining methods to monitor apoptosis induced by oxidative stress in adherent cells. **Chin Med J (Engl)** **116**:1923-1929, 2003