

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ KLİNİĞİ

175412

**DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASI MODELİNDE
GENEL KASPAZ İNHİBİTÖRÜ Q-VD-OPH
VE NMDA RESEPTÖR ANTAGONİSTİ MEMANTİN'İN AYRI
VE BİRLİKTE KULLANIMININ İKİNCİL YARALANMA SÜRECİNE
ETKİLERİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Halil CAN

(Prof. Dr. Faruk ÜNAL)

İSTANBUL

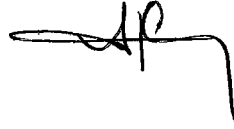
2007

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ KLİNİĞİ

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASI MODELİNDE
GENEL KASPAZ İNHİBİTÖRÜ Q-VD-OPH
VE NMDA RESEPTÖR ANTAGONİSTİ MEMANTİN'İN AYRI
VE BİRLİKTE KULLANIMININ İKİNCİL YARALANMA SÜRECİNE
ETKİLERİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Halil CAN



(Prof. Dr. Faruk ÜNAL)

İSTANBUL

2007

I

ÖNSÖZ

Nöroşirurji uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini aktararak bu disiplini öğrenmemi sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. M. İnan TURANTAN, Prof. Dr. Ali T. CANBOLAT, Prof. Dr. Orhan BARLAS, Prof. Dr. A. Nail İZGİ, Prof. Dr. Ö. Faruk ÜNAL, Prof. Dr. Kemal T. HEPGÜL, Prof. Dr. Talat KIRIŞ, Prof. Dr. Murat İMER, Uzm. Dr. Altay SENCER ve Uzm. Dr. Aykut KARASU'ya teşekkürü borç bilirim.

Tez konumun seçilmesi, tezimin planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Ö. Faruk ÜNAL ve Uzm. Dr. Altay SENCER'e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Halil CAN

II

İÇİNDEKİLER

Önsöz	I
Tablolar ve şekiller	IV
Kısaltmalar	VI
Bölüm I	
Özet	VII
Summary	VIII
Bölüm II	
Giriş	1
Araştırma Konusu	1
Genel bilgiler	2
Omurilik yaralanmalarının tarihçesi ve epidemiyolojisi	2
Omurilik yaralanmalarının fizyopatolojisi	2
Birincil Hasar	2
İkincil Hasar	3
Hücre içi kalsiyum iyonu artışı	4
Glutamat eksitotoksitesisi	6
Apoptozis	8
Apoptotik hücrede görülen değişiklikler	9
Apoptozis mekanizmaları	11
Apoptoz ve nekroz	12
Apoptozisin travmatik omurilik yaralanmasındaki rolü	13
Travmatik omurilik yaralanması uygulanan hayvan modellerinde	14
apoptozis	
Kaspazlar	14
Kaspaz aktivasyonunun kontrolü	16

III

Bölüm III

Materyal ve metod	18
Materyal	18
Deney grupları	18
Omurilik travmasının oluşturulması	19
Q-VD-OPH ve memantin	19
Metod	20
Anestezi	20
Cerrahi işlem	20
Histolojik inceleme	23
Klinik nörolojik muayene	24
Eğik düzlem ile değerlendirme	24

Bölüm IV

Bulgular	25
Eğik düzlem bulguları	25
Motor muayene bulguları	26
Histolojik inceleme bulguları	27

Bölüm V

Tartışma	34
----------	----

Bölüm VI

Sonuç	43
-------	----

Bölüm VII

Yararlanılan kaynaklar	44
Özgeçmiş	56

IV

Tablolar

Tablo II.1	3
Tablo IV.1	25
Tablo IV.2	26
Tablo IV.3	26
Tablo IV.4	27
Tablo IV.5	28
Tablo IV.6	29
Tablo IV.7	30

Şekiller

Şekil II.1	10
Şekil II.2	13
Şekil II.3	16

Resimler

Resim III.1	21
Resim III.2	21
Resim III.3	22
Resim III.4	22
Resim IV.1	31
Resim IV.2	31
Resim IV.3	32
Resim IV.4	32
Resim IV.5	33
Resim IV.6	33

Kullanılan Kısaltmalar

Q-VD-OPH:	Quinoline-val-asp (ome)-CH ₂ -O-phenoxy
Caspase:	Cystein dependent aspartate spesific proteases
Ca:	Kalsiyum
K:	Potasyum
Na:	Sodyum
Ca-ATPaz:	Kalsiyum-adenosin trifosfataz
ATP:	Adenosin trifosfat
GTP:	Guanosine trifosfat
NMDA:	N-Metil D-aspartat
AMPA:	Alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
Ka:	Kainat
TUNEL:	Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) mediated dUTP biotine nick and labeling
DMSO:	Dimetil sülfoksit
ER:	Endoplazmik retikulum
Bcl-2:	B-cell CLL/lymphoma 2
Apaf-1:	Apoptozis proteaz aktive edici faktör-1
FasL:	Fas-Ligand
PNL:	Polimorfo Nüklear Lökosit

ÖZET

Deneysel Omurilik Yaralanması Modelinde Genel Kaspaz İnhibitörü Q-VD-OPH VE NMDA Reseptör Antagonisti Memantin'in Ayrı ve Birlikte Kullanımının İkincil Yaralanma Sürecine Etkileri

Travmatik omurilik yaralanmalarında birincil hasar sonrası ortaya çıkan birçok fizyopatolojik mekanizma ikincil hasarlanma denilen sürecin oluşmasına neden olur. İkincil hasarlanma, omurilik yaralanmasını takiben nörolojik kötüleşmeye büyük katkıda bulunmaktadır. Birincil hasara karşı, koruyucu hekimlik ve yaralanmayı önleme programları dışında müdahale şansı yoktur. Yapılan klinik ve deneysel çalışmaların hedefi, travmanın yol açtığı ikincil hasarın önlenmesi ve bu yolla ortaya çıkacak nörolojik problemin en aza indirilmesidir.

Biz de bu çalışmamızda sıçanlarda klip kompresyon tekniği ile oluşturulmuş omurilik tıvamı sonrasında; bir N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptör antagonisti olan memantin ve genel kaspaz inhibitörü olan Q-VD-OPH'in ayrı ayrı ve birlikte kullanımının ikincil hasar gelişimi üzerine olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

Klip kompresyon yöntemi ile oluşturulmuş omurilik travması sonrası deneklere gruplarına göre, ayrı ayrı ve kombine olarak, ilaç tedavisi uygulandı. Denekler beş gün boyunca klinik olarak gözlemlendi ve nörolojik fonksiyonları kaydedildi. Histopatolojik değerlendirme için beşinci gün sonunda denekler sakrifiye edilerek alınan omurilik örnekleri hematoksilen eosin ve Tunnel boyama yöntemi ile boyanarak mikroskopik olarak incelendi.

Sonuç olarak Q-VD-OPH ve memantin-Q-VD-OPH'in birlikte uygulandığı grupta, diğer gruplarla kıyaslandığında eğik düzlem bulgularının anlamlı derecede iyi sonuçlara sahip olduğu, 5. gün motor muayene bulgularının memantin grubunda düzelme göstermediği, memantin-Q-VD-OPH grubunun istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahip olduğu, Q-VD-OPH grubunda ise istatistiksel olmasada diğer gruplarla kıyaslandığında daha iyi sonuçlara ulaşıldığı gözlemlendi. Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde, memantin'in nekroz, lenfosit ve PNL oranlarını önemli ölçüde azalttığı, fakat apoptozis üzerine etkili olmadığı, Q-VD-OPH'in da apoptozisi engelleme de etkili olduğu ancak, nekroz, lenfosit ve PNL oranlarını azaltmadığını tespit ettik. Nekroz ve apoptozisin birlikte engellenmesi açısından memantin-Q-VD-OPH grubunun diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahip olduğunu gözlemledik.

VII

SUMMARY

The Effects of Memantin, an N-methyl D-aspartate (NMDA) Receptor Antagonist and Q-VD-OPH, a General Caspase Inhibitor, Separately and in Combination, on Secondary Injury in Experimental Spinal Cord Injury -Model

A number of physiopathological mechanisms which appear following primary injury at the time of spinal cord trauma lead to secondary injury. Secondary injury largely contributes to loss of neurological function following spinal cord trauma. There is no means of prevention from primary injury except preventive measures which make injury less likely. The major goal of most clinical and experimental studies is to prevent secondary injury and related neurological problems.

The aim of this study is to investigate the effects of memantin, an N-methyl D-aspartate (NMDA) receptor antagonist and Q-VD-OPH, a general caspase inhibitor, separately and in combination, on secondary injury following spinal cord trauma induced by clip compression technique in rats.

Subjects have been given medical treatment (separate and in combination according to their groups) following spinal trauma induced by clip compression technique. They have been followed up for five days and their neurological condition noted. Subjects have been sacrificed at the end of the fifth day for histopathological inspection. Acquired spinal tissue samples have been fixated using haematoxyline eosin, dyed using Tunnel technique and microscopically evaluated.

In the combination group where Q-VD-OPH and memantine-Q-VD-OPH were used, the test results for neurological status were significantly better when compared with the other groups. 5th day neurological state was shown to be no better in the memantine group, whereas it was statistically better in the Q-VD-OPH and memantine-Q-VD-OPH group and showed some tendency for better results in the Q-VD-OPH group, although in the last group the results were not statistically significant. Histopathologically, memantine was shown to decrease necrosis and the number of lymphocytes and PNLs but that it had no effect on apoptosis. Q-VD-OPH did decrease apoptosis however, it had no impact on necrosis or the number of leucocytes and PNLs. The combination had a statistically better effect on the prevention of necrosis and apoptosis when compared with the other groups.

BÖLÜM-II

GİRİŞ

I. ARAŞTIRMA KONUSU

Omurilik yaralanmaları, beraberinde getirdiği fiziksel, psikososyal ve ekonomik sorunlar ile hem bireysel hem de toplumsal boyutları olan önemli bir problemdir.

Omurilik yaralanmalarında travmanın olduğu anda ortaya çıkan mekanik hasara birincil hasar adı verilir (13,14,15). Birincil hasar boyutu; fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon veya rotasyonla ilgili kompresyon kuvvetlerinin şiddetine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına bağlıdır (13,14). İkincil hasar ise, birincil hasarı takip eden dakikalar içinde başlayıp günlerce sürebilen bir dizi kompleks olaylar zincirini kapsamaktadır. (13,14,15,16).

Travmatik omurilik yaralanmalarında yaralanmanın merkezinde hücre ölümünün en büyük kısmının nekroz sonucu oluştuğu, fakat apoptozisinde devam eden hücre ölümüne katkı da bulunduğu yapılan hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Hipoksinin, hücre içi kalsiyum artışının, serbest radikal oluşumunun ve glutamat eksitotoksitesinin, nekrozun yanısıra apoptozisi de tetiklediği belirtilmiştir (55,15,16).

Santral sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteri olan glutamatın reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun nöronal hasara yol açtığı çalışmalarda gösterilmiştir (37,38,40,51,47,93). Glutamat, farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik yapıya sahip iki grup reseptör aracılığıyla etki eder: metabotropik ve iyonotropik reseptörler (37,40,45,49,52). İyonotropik reseptörler arasında en iyi bilineni N-Metil D-Aspartat (NMDA) reseptörüdür (37,39,40). Glutamatın eksitotoksik etkilerinin büyük bir kısmı, hücre içine aşırı kalsiyum girişine bağlıdır ve bu süreç hücre ölümünün son basamağını oluşturur (36,45,46).

Apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay, kaspazların aktivasyonudur. Kaspazlar, (Caspase-cysteine dependent aspartate specific proteases) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar. Kaspazlar apoptozisin temel efektörleridir (64,76,77,78,81).

Rivlin ve Tator tarafından tarif edilmiş klip kompresyon tekniği, kliniğimizde daha önce yapılan tezlerde ve çalışmalarda oldukça sık kullanılmıştır. Biz de çalışmamızda bu fikir doğrultusunda hareket ederek, literatürde ilk kez bir NMDA reseptör antagonisti olan memantin ve apoptozisin temel efektörü olan kaspazların genel bir inhibitörü Q-VD-OPH'ın ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarının ikincil hasar gelişimi üzerine olan etkilerini incelemeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

A. Omurilik Yaralanmalarının Epidemiyolojisi ve Tarihçesi

Omurilik yaralanmasına uğrayanların çoğunluğunu, genç ve sağlıklı kişiler oluşturmaktadır. Erkekler kadınlardan 4 kat daha risk altındadır. Omurilik travmasına yol açan sebepler; motorlu araç kazaları (% 47), sporla ilişkili yaralanmalar (% 24), düşmeler (% 12), kurşun ve bıçakla yaralanmalardır (% 7) (12,13,14). Birleşik devletlerde 400 bin omurilik travmalı hasta mevcuttur ve her yıl 10 bin hasta bu sayıya eklenmektedir (15,16).

Ülkemizde yıllık görülme sıklığı 12.7/1 milyondur. Erkek / kadın oranı 2.5 / 1'dir ve en sık 15-35 yaş arası görülmektedir (7,9,10).

Omurga ve omurilik yaralanmaları ile ilgili ilk belge Edwin Smith Cerrahi Papirüsüdür (11,12,13). M.Ö. 2500'lü yıllarda yazılmış olan, 1862 yılında Edwin Smith tarafından incelenen ve tercüme edilen eserde, omurga kırıklarının tanısı, tedavisi ve açık yaralarını kapsayan ayrıntılı bilgiler bulunmaktadır (11,104). Hipokrat (M.Ö. 460-377) omurganın fraktür dislokasyonu ile omurilik yaralanması ilişkisi üzerinde durmuştur. **Scummun** adı verilen traksiyon cihazını geliştirerek spinal deformiteleri azaltan yöntemler geliştirmiştir (11,88,90). Galen, çalışmalarında deneysel olarak omurilik zedelenmesinin, lezyon altında his kaybı ve paraliziye sebep olduğunu tespit etmiştir (11). 1911'de nörolog Alfred Reginold Allen omurilik yaralanmasında ikincil hasar fikrini ileri sürmüştür (11,12). Allen kademeli ağırlıklar kullanarak deneysel omurilik yaralanması için bir araştırma modeli geliştirmiştir. Ağırlık düşürme yöntemi ile yapılan omurilik yaralanmasından sonra, myelotomi yaparak oluşan posttravmatik hematomyeliyi boşaltmış, sonrasında nörolojik fonksiyonlarda iyileşme olduğunu gözlemlemiştir (11,14).

B. Omurilik Yaralanmalarının Fیزیopatolojisi

1. Birincil Hasar :

Omurilik yaralanması omuriliğe yapılan pek çok travmayı takip edebilir. Birincil hasar; fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon veya rotasyonla ilgili kompresyon kuvvetlerinin şiddetine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına bağlıdır (13,14) Nöral elementlere uygulanan her hangi bir kuvvetin oluşturacağı ilerleyici hasarlanma aynı zamanda bu seviyedeki omurga kanalının enine ve boyuna da bağlıdır (13,14).

Şiddetli yaralanmalar ilk aşamada, özellikle gri cevherde ortaya çıkan, yaygın peteşiyal hemorajilere neden olur. Kanama genellikle kapiller, venül ve arteriollerden olur; anterior spinal arter gibi büyük arterlerde olduğuna rastlanmamıştır. Geniş, yer kaplayan ve

omuriliği gerebilen santral hematomiyeli çok nadirdir. Bu hemorajilerin çoğunun venöz kaynaklı olduğu, deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (14,23). Kontüzyon veya laserasyon ile beraber subaraknoid hemoraji çok yaygındır; ancak subdural veya ekstradural hematom çok nadirdir. Subdural veya ekstradural hematom, spinal fraktürü olan ankilozan spondilitli hastalar gibi az bir kısım vakada gelişebilir (22).

2. İkincil Hasar:

İkincil hasarda rol oynayan birçok fizyopatolojik mekanizma tanımlanmıştır. Bu mekanizmaların hepsinin altında yatan asıl patoloji; bozulmuş perfüzyon ve hücresele düzeyde enerji yetersizliğidir (13,14). Omurilik fonksiyonunu potansiyel olarak bozan bölgesel kuvvetlere ek olarak, doku oksijenizasyon ve perfüzyonunu belirleyen sistemik, pulmoner ve kardiyak faktörler hasarın yaygınlığını belirler (13,14,15,21). Bozulmuş perfüzyon bir hiperemi veya "luxury perfusion" denilen bir süreç tarafından takip edilebilir. Bunun sebebi de, laktat gibi asit metabolitlerin damar dışında birikmesi nedeniyle perivasküler pH düşüklüğüdür. Bu doku reperfüzyonu hücresele hasarı artırabilir. (Doku içine daha fazla kan gelmesiyle serbest radikaller ve diğer toksik ürünlerin hücre içine girişi artabilir) (13).

Başlangıçta omurilikte, post kapiller venüllerin veya sulkal arteriollerin mekanik etki veya intravasküler koagülasyona bağlı olarak yırtılması sonucunda peteşiyal kanamalar gelişir. İntravasküler koagülasyonun sebebi de venöz staz ve distansiyona bağlı olarak fibrin trombüslerinin birikmesidir (13,23). Travmanın olduğu bölgede proteinöz sıvının damar yatağı dışına çıkması, o yaralanma bölgesinde ve çevresinde ödeme sebep olur. Elastik olmayan pial membranın olması sebebiyle meydana gelen ödem interstisyel basıncın artmasına, bu da bölgesel olarak omurilikteki kan akımının azalmasına sebep olur (13). Hasarlanmış hücrelerden endotelin gibi vazoaaktif maddelerin salınması ve nörojenik mekanizmalar omurilik perfüzyonunun azalmasına sebep olurlar (13,14). Mikroanjiyografik tetkiklerle intramedüller kılcal damarlar ve sulkal arteriollerde bölgesel daralma, tam kesi, anevrizmal genişleme ve tıkanıklık gibi değişik durumlar gösterilmiştir (13,23).

Tablo II.1: İkincil hasarda rol oynayan fizyopatolojik mekanizmalar (14).

1. Sistemik Etkiler (Nörojenik şoka bağlı etkiler):
 - a. Nabız: Önce taşikardi, daha sonra da uzamış bradikardi olur
 - b. Kan basıncı: Önce hipertansiyon, daha sonra da uzamış hipotansiyon olur
 - c. Periferel vasküler direnç: Azalır

- d. Kardiak output: Azalır
 - e. Katekolamin düzeyi: Önce artar, daha sonra düşer
2. Omurilik mikrodolaşımının lokal vasküler hasarı
 - a. Kapiller ve venüllerin mekanik parçalanması,
 - b. Hemoraji: Özellikle gri cevherde
 - c. Mikrodolaşımın kaybı: Mekanik etki, tromboz ve vazospazm sonucu
 - d. Omurilik kan akımının azalması
 - e. Otoregülasyonun kaybı
 3. Biyokimyasal değişiklikler
 - a. Eksitotoksisite: Özellikle glutamata bağlı
 - b. Nörotransmitter birikimi: Noradrenalin, dopamin gibi
 - c. Araşidonik asit serbestlenmesi
 - d. Serbest radikal üretimi
 - e. Eikosanoidlerin üretimi
 - f. Lipid peroksidasyonu
 - g. Endojen opioidler
 - h. Sitokinler
 4. Elektrolit bozuklukları
 - a. İntrasellüler kalsiyum iyonu artışı
 - b. Ekstrasellüler potasyum iyonu artışı
 - c. İntrasellüler sodyum iyonu artışı
 5. Ödem
 6. Enerji metabolizmasının bozulması

Yukarıdaki tabloda geçen ikincil hasarın fizyopatolojik mekanizmalarından sadece çalışmamız açısından önemli olduğunu düşündüğümüz hücre içi kalsiyum iyonu artışı ve glutamat eksitotoksisitesinden bahsedeceğiz.

a. Hücre İçi Kalsiyum İyonu Artışı

Bütün hücrelerde kalsiyum iyonları; hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre iskeletinin bütünlüğünün korunması, membran eksitabilitesi, ekzositoz ve sinaptik aktivite gibi sayısız yaşamsal süreçlerin devam ettirilebilmesi için kullanılmaktadır. Normal nöronal fonksiyonların yerine getirilmesinde kalsiyum iyonunun bu önemli rolünden ötürü, nöronlar kalsiyum iyonlarının hücre içindeki lokalizasyonlarını ve serbest sitoplazmik

konsantrasyonlarını sıkı bir biçimde kontrol altında tutmak için mekanizmalar geliştirmiştir (29). Bu mekanizmalar 5 ana kategoriye ayrılan olaylar arasındaki karmaşık bir ilişkiye dayanır: hücre içine kalsiyum girişi, kalsiyum tamponu, hücre içi kalsiyum depoları, hücre dışına kalsiyum çıkışı ve hücre içi kalsiyum difüzyonu. Bu mekanizmaların tümü hücre içi kalsiyum seviyelerinin düşük olmasını sağlamaktadır (hücre dışı kalsiyum seviyesinden 100.000 kat daha az) (27,29).

Fizyolojik olarak kalsiyumun hücre içine girişi temel olarak iyon kanalları vasıtasıyla olur. Kalsiyumun hücre dışına çıkışı iyon pompaları tarafından kontrol edilmektedir, bunun yanında kalsiyum tamponlanması birkaç kalsiyum bağlayıcı protein ve aynı zamanda kalsiyum deposu olarak da görev yapan, sitoplazmik organeller (mitokondri ve endoplazmik retikulum) tarafından yürütülmektedir (29).

Bütün hücreler kalsiyumu hücre dışına atmak için enerji kullanmak zorundadır. Hücre içi-hücre dışı kalsiyum iyon konsantrasyon farkının büyük ölçülerde olması ve pozitif yüklü kalsiyum iyonlarının negatif yüklü iç plazma membranına doğru hareket etmesini sağlayan elektriksel itiş kuvveti, etkili kalsiyum atım mekanizmalarına ihtiyaç duyulmasına neden olur. Nöronlarda bununla ilgili iki mekanizma bulunmaktadır; adenosin trifosfat (ATP) kullanan kalsiyum pompaları (Ca-ATPaz'lar) ve bir Na/Ca taşıma mekanizması (30,33). Plazma membranında bulunan Ca-ATPaz'lar kalmodulin, bir dizi yağ asidi ve protein kinazlar ile (protein kinaz A ve C) kontrol edilmektedir. Hücre dışına atılacak her kalsiyum iyonu için bir ATP harcanır. Ca-ATPaz'lar ayrıca granülsüz endoplazmik retikulum membranlarında da yer alır ve hücre içi kalsiyum atılımında görev alan bir mekanizma olarak hareket eder. Bunlar kalmodulinden bağımsızdır ve harcanan her ATP molekülü için iki kalsiyum iyonunun atılımını gerçekleştirir (29). Na/Ca transport mekanizması kalsiyumun artışı ile tetiklenir ve hücre içine giren her iki-üç Na iyonu için bir Ca iyonu hücre dışına çıkarılır. Bu mekanizma membran aracılı sodyum derecesine, bu nedenle de Na, K-ATPaz'a bağlıdır (28,29).

Bütün hücreler kalsiyum atım mekanizmalarının ATP varlığına olan bağımlılığı, iskemi veya travma gibi durumlarda kalsiyum artışının nedenini açıklamaktadır. Hücreler enerji depolarında meydana gelen hızlı bir azalma, kalsiyum atılımında bozukluklara yol açar. Bu nedenle, kalsiyumun hücre içine girişi, sitoplazmik kalsiyum tamponlama mekanizmaları ile karşılanamaz, böylece serbest hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda kontrolsüz bir artış meydana gelir ve bu durum en nihayetinde hücre ölümüne yol açacak olan kalsiyuma bağlı sayısız ikincil yolakların aktiflenmesine neden olur (29).

Kalsiyum nörotoksitesine yol açan mekanizmalar iki aşamada sınıflandırılabilir. İlk aşama hücre içi kalsiyum fazlalığını tetikleyen ve devamını sağlayan patolojik

mekanizmaları, ikinci aşama ise hücre içi kalsiyum artışı ile oluştuğu düşünülen ikincil olayları kapsamaktadır (27,29).

Yetersiz ATP sentezi, kalsiyum dengesinin kaybına ek olarak anaerobik glikolizi uyarak hücrel asidoza, enerjiye dayalı iyon transport mekanizmalarının kaybı sonucu iyon dengesinde bozulmaya, hücrel yapının sentezinin azalmasına bağlı olarak da hücre iskeletinin bütünlüğünün bozulmasına yol açar (29).

Hücre içinde aşırı kalsiyum birikimi sonucunda; serbest yağ asitlerinin salınımı, fosfolipaz A2 etkinleştirilmesi, kalsiyum bağımlı Adenozin 5'trifosforaz etkinleşmesine bağlı enerji yedeklerinin tükenmesi, toksik eikozonoid sentezi, serbest radikal oluşumu, reseptör proteinlerin değişikliği, hücre iskeletinin mikrotubuler ve nöroflament kısımlarının değişikliği, mitokondrial oksidatif fosforilasyonun bozulması, aksonal dejenerasyon, proteaz, fosforaz, endonüklaz gibi litik enzimlerin etkinleşmesi gibi olaylar meydana gelir (29,31).

Mitokondri hücrenin enerji jeneratörü olarak görev yapar . Fizyolojik ve patolojik durumlarda mitokondri kalsiyum iyonlarını tamponlama görevini yapmaktadır (32,34). Çalışmalar, toksinler, iskemi ve mekanik travma nedenli hücre hasarında, mitokondrial disfonksiyonun genel yol olduğunu ispatlamıştır (35). Anoksi transmitokondrial membran potansiyelinin bozulmasına ve bunu takiben ATP üretiminin bozulmasına yol açar. Mitokondrinin kalsiyum tamponlama etkisi de transmembran potansiyelinin düşmesine ve sonuç olarak mitokondri içerisinde kalsiyum birikimine ve ATP üretiminin daha fazla gerilemesine neden olur. Bu mekanizmaya mitokondriden hidrojen iyonlarının salınımı eşlik eder. Aşırı kalsiyum yükü, geri dönüşümsüz mitokondrial hasara ve beraberinde hücrenin ölümüne yol açmaktadır (29).

b. Glutamat Eksitotoksitesi

Glutamat, santral sinir sisteminin en önemli eksitator nörotransmitteridir (24,37,38,40,45,46,49). Glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonunun nöronal hasara yol açtığı Olney ve ark. tarafından tanımlanmış ve eksitotoksitite olarak isimlendirilmiştir (24,29,51).

Aşırı glutamat birikiminin nedeni; Hücre membranı polarizasyonuna bağlı olarak sinaptik veziküllerden glutamat salınımının uyarılması ve ATP yetmezliğine bağlı olarak, glutamat geri alım mekanizmalarının çalışmamasıdır (24,40).

Glutamat, farklı farmakolojik ve elektrofizyolojik yapıya sahip reseptörler aracılığıyla etki eder. İki grup glutamat reseptörü vardır (24,26,37,39,40,42,52):

1. Metabotropik reseptörler: Transmembran proteinlerine bağlıdır. Uyarıldıklarında GTP üretimine yol açarlar. GTP, fosfoinozitudili hidrolize ederek, inozitol-1,4,5-trifosfatı (ITP3) oluşturur. ITP3 de, hücre içi depolardan kalsiyum serbestlenmesine yol açar (24,26,37,42).

2. İyonotropik reseptörler: Ligand kapılı iyon kanallarıdır. Bu reseptörler, kendilerini selektif olarak etkinleştiren bileşiklere göre 3 alt tipe ayrılırlar: NMDA reseptörleri, AMPA reseptörleri ve kainat reseptörleri. AMPA ve kainat reseptörleri arasında ayırım bazı durumlarda net olmadığı için bu iki reseptör tipine AMPA/KA veya non-NMDA adı verilmektedir (17,24,26,37,40,45,49).

a. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Reseptörleri: Hem glutamat ve hem de glisin için bağlanma yerine sahip, karmaşık yapıda reseptörlerdir. Etkinleşmeleri için hem glutamatın hem de glisinin reseptöre bağlanmış olması gerekir. Ayrıca spermin, spermidin gibi poliaminler için de bağlanma bölgesine sahiptirler. Poliaminler, bu reseptörlerin etkinleşmesini arttırırlar (46,50,52). Magnezyum iyonu tarafından voltaja bağımlı olarak engellenirler. Dinlenme potansiyelindeki bir nöronda magnezyum iyonu, NMDA reseptöründen kalsiyum iyonu geçişini bloke eder; ancak, depolarizasyonla beraber magnezyum iyonunun ortamdaki uzaklaşması bu blokajın ortadan kalkmasına yol açar (45,46). NMDA reseptörleri temel olarak hücre içine kalsiyum iyonu girişine aracılık ederler (26,37,38,43,44,51,52).

b. Alfa-Amino-3-Hydroxyl-5-Methyl-4-Isoxazolepropionate reseptörleri (AMPA): *Quisqualat* reseptörleri olarak da bilinirler. GluR1-4 (GluRA-D) diye adlandırılan 4 subunitin ikişerli kombinasyonundan oluşurlar (47,49,53). Esas olarak sodyum iyonu geçişine aracılık ederler. Ancak, GluR2 alt ünitesi içermeyenler kalsiyum iyonuna da son derece geçirgendir. Etkinleşmesi sonucunda Na⁺ hücre içersine girer, K⁺ ise hücre dışına çıkar. AMPA reseptör etkinleşmesi ile erken dönemde, hücre içinde Na⁺ birikerek sitotoksik ödem ve asidoz oluşmasına yol açar (47,48,49).

AMPA reseptörleri eksitotoksitedeki etkilerini, depolarizasyon oluşturup voltaja bağımlı kalsiyum kanallarını açarak, sodyum-kalsiyum pompasının işleyişini tersine çevirerek gösterirler (47,48).

c. Kainat reseptörleri: Çok iyi incelenememişlerdir, KA1-2 alt üniteleri vardır (49).

NMDA tipi reseptörler hem tek değerli katyonların hem de kalsiyum iyonunun hücre membranından geçişini sağlar (37,38,26,43,44,51,52). İskemik süreçlerde, glutamat tarafından postsinaptik membran uyarıldığında, önce Na⁺ ardından da Ca⁺⁺ hücre içersine girer (24,37,40,45). Hücre içine giren Ca⁺⁺, hücre içindeki bir takım moleküllerle

tamponlanır ya da organellerin içinde depolanır. En önemli tampon yapıları kalmodulin ve kalsibindin isimli proteinlerdir. Hücre içinde Ca^{++} ve H^+ , aynı tampon bölgelerine bağlanmaktadır. Bu nedenle asidoz durumunda hücre içi serbest Ca^{++} miktarı artmaktadır (29).

Bir iskemik sürece bağlı olarak, glutamatın aşırı salgılanması ya da geri alınımının aksaması sonucu, hücre içinde Ca^{++} 'un aşırı birikmesi, sonuçta, lipid peroksidasyonu ve serbest radikallerin aşırı birikimine neden olur. Bu etki komşu nöronal ve glial hücrelere zarar vererek zincirleme reaksiyonlar halinde devam eder (19,24,25,40).

Omurilik travmasından sonra gelişen ekstraselüler glutamat artışı, intraselüler kalsiyum konsantrasyonunun artmasına yol açarak, hücre ölümünde önemli bir rol oynar (25,26,37,38).

C. APOPTOZİS

Apoptozis terimi, ilk defa İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır. Bu fizyolojik olay dokularda tek tek hücre kaybına yol açtığından, latince ayrı düşmek anlamına gelen apoptozis denilmiştir (apo:ayrı, ptosis:düşmek). Apoptozisin gelişim biyolojisinde, normal doku döngüsü ve immun sistem hücrelerinin sitotoksik fonksiyonları gibi bazı önemli fizyolojik süreçlerdeki rolü ortaya çıktıkça önemi de hızla artmıştır (54,57).

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Daha önceden programlanmış bir şekilde gerçekleşen bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü olarak da adlandırılır. Ayrıca, bir şekilde DNA'sı hasarlanmış (virüs etkisi veya çevresel nedenlerle) hücreler organizmanın zarar görmemesi için kendilerini öldürürler ve bunu organizmanın yararı için yaparlar. Doku homeostazı için (örneğin yara iyileşmesi veya barsak hücrelerinin "turnover"ında olduğu gibi) hücreler ortamdaki ölümlerle kaybolur. İşte, tüm bu kavramlar (programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı) apoptozis ile eş anlamlı olarak kullanılabilen ve literatürde yer alan ifadelerdir (17,54).

Nekroz esnasında hücre şişer, mitokondri genişler, organeller çözünür, plazma membranı yırtılır. Sitoplazma materyali hücre dışına geçerek inflamasyona neden olur. Apoptozis sırasında ise plazma membranı yırtılmaz (17,56,59,68,97). Hücre içi ATP seviyesi

hücresinin apoptozis veya nekroz ile öleceğine yön verir. Bu da mitokondrinin önemini apoptozisin erken fazında göstermektedir.

Apoptozis birçok yönleriyle nekrozdaki farklıdır ve kromatin kümeleşmesi, intranükleosomal DNA parçalanması, çekirdek ve hücre büzülmesi gibi birtakım hücre içi olayları içerir. Hücrelerin sitozolik parçalarının dışarı salgılanması ve herhangi bir lokal inflamatuvar yanıt olmaksızın fagosit içine alınmasıyla sonuçlanır (55,56,57,67,68,70). Apoptozis sürecine giren hücreler büzülür, komşu hücrelerle temas kaybı olur, membranda cepcikler oluşur ve profagositik yüzey sinyalleri taşırlar. Süreç daha sonra kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması ile devam eder. Apoptozisin tanımlanmasında pek çok moleküler biyolojik test geliştirilmiştir. DNA yarıklanmasını gösteren *terminal deoksinükleotidil transferaz(TdT) mediated nick-end labeling (TUNEL)* tekniği oldukça popüler bir testtir (56,58,85). İntranükleosomal DNA parçalanması apoptozisin ana işaretidir, elektroforezde karakteristik olan merdivenleşme belirtisiyle tanınabilir (56).

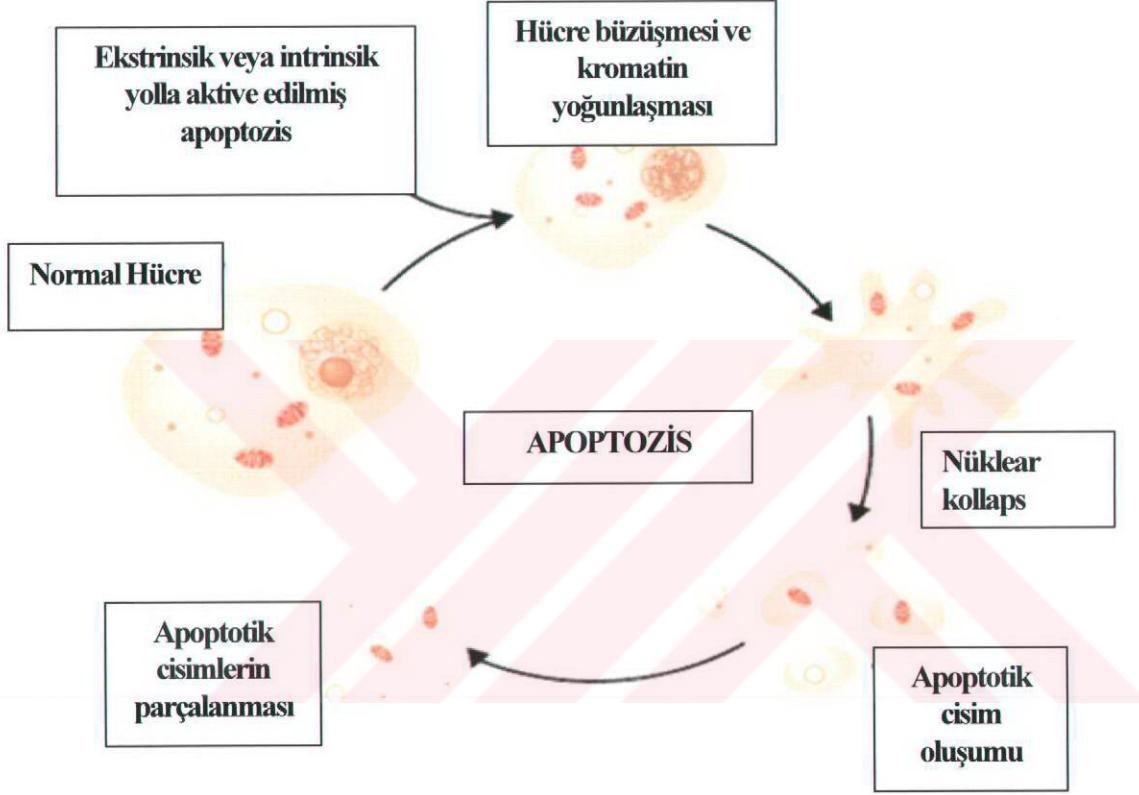
Apoptozis omurilik yaralanmalarında önemli rol oynar ve glutamat eksitotoksitesisi, serbest radikal hasarı, sitokinler ve inflamatuvar yaralanma tarafından tetiklenir (56,59,61,65,94). Başlangıç yaralanmasından sonra omuriliğe uygulanan travma ani fiziksel yaralanmaya neden olur. Günler ve aylarca süren doku yaralanması bu olayı izler. Sonuç olarak hücre nekroz veya apoptozise giderek son bulur (17,56).

1. Apoptotik Hücrelerde Görülen Morfolojik Değişiklikler

Apoptozis, dokuda belli bir bölgedeki tüm hücreleri etkilemek yerine dağınık olarak tek tek hücrelerde ortaya çıkar ve tipik olarak inflamatuvar değişiklikler yoktur (17,55,57,59). Belirlenen ilk fiziksel değişiklik kromatinin çekirdek zarının altında yoğunlaşarak değişik boyutta yarım ay ya da oval şekillerde iyi sınırlı yoğun kitleler haline gelmesidir. Bu çekirdek değişiklikleriyle aynı anda apoptotik hücre komşu hücrelerden ayrılır ya da bağlantı noktaları ortadan kalkar (54,57). Mikrovilluslar gibi özel yüzey yapıları kaybolur ve düzgün sınırlı hale gelir. Hücre hacmi azalır, hücre yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller yoğunlaşır, düz endoplazmik retikulum genişler. Yoğunlaşmış sitoplazmada vakuoller oluşur. Genişleyen sisternalar hücre zarı ile birleşerek hücre yüzeyine doğru tomurcuklanmalar oluştururlar. (57,69).

Bu dönemin hemen ardından gelen devrede hücre yüzeyinde tomurcuklanma ve çekirdek sınırında düzensizlik vardır. Bunların ayrılması ile çekirdek ve sitoplazma değişik boyutlarda "apoptotik cisimcikler" oluşturur. Bu cisimler epitelyal yüzeyden dökülebilir ya da çoğunlukla komşu normal parankimal hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edilirler (54,57). Son aşama kalıntı çekirdek ve sitoplazmik yapıların genellikle fagosite eden hücrenin

fagozomu içinde lizozomal enzimlerle parçalandığı "in vitro otoliz" dönemidir. Hücre parçalanması sırasında hücre içi elemanlar hücreler arası aralığa dağılmadığı, proteolitik enzimler ya da toksik oksijen salınımı olmadığı için yangısal yanıt oluşmaz ve komşu hücrelerin hasarlanması önlenir (54,55,57,59).



Şekil II.1: Apoptozisin morfolojik evreleri

2. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin ortaya çıkmasında üç başlangıç sinyali yolu;

a. Mitokondri/Sitokrom-C Aracılı Apoptozis Oluşturulması: Mitokondri normal şartlar altında ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 etkinleşmesi için önemli rol teşkil eder (15,60,76,94). Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır (60,76,94). Ko-faktör nükleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile etkinleştirilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktif kaspaz-9 da kaspaz-3'ü etkinleştirerek diğer kaspaz basamaklarının tetiklenmesini sağlar (7,16,75,128). Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır. Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar (66,76).

b. Dış Sinyallerle Apoptozisin Tetiklenmesi: Birbirini tamamlayan ölüm etkinleştiricilerin (Fas-L ve TNF), hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i etkinleştiren sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (61,69,79,82). Omurilik yaralanması sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik değişim ölüm reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılıdır (55,82). Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bunların apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz basamaklarını etkinleştirdiği bilinmektedir (79,82).

c. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması: Son zamanlarda kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (61,62,63). Bu yol mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. ER, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanması içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir (62).

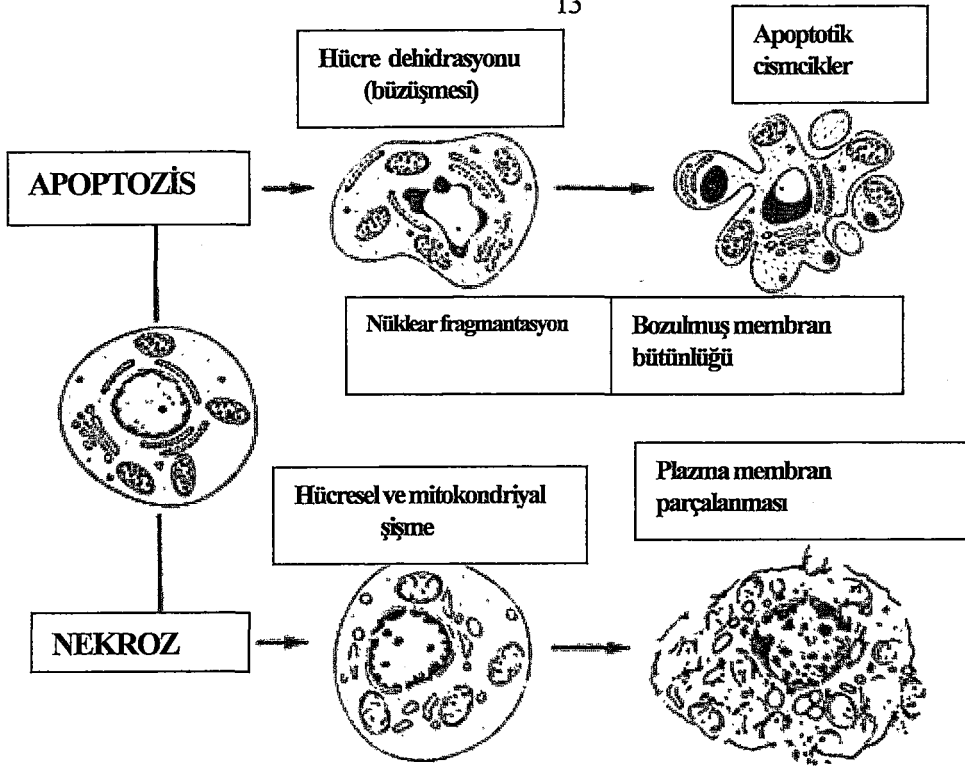
Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Son çalışmalarda Ca^{++} seviyelerinin ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile prokaspaz-12'nin etkinleştiği gösterilmiştir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de prokaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur (63). Etkinleşmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz basamaklarını etkinleştirir (62,63).

3. Apoptozis ve Nekroz:

Nekroz fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir (17,54,57,59). Nekrozda hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken, apoptotik hücre tam tersine küçülür (16,17,57). Nekrozda kromatin şekli hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (kromatin agregasyonu) ve yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu) (16,17). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir (16,17,57,71). Oysa apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepcikler (membran blebleri) oluşur (16,17,54,79).

Nekrotik hücre erimeye uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotik cisimcik) parçalanır (71,75). Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır değişen miktarlarda nükleus, veya diğer hücre içi yapıları içerirler (16,54). Nekrozda plazma membranının bütünlüğünün bozulması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama salınması sonucu yangısal reaksiyon uyarılır (16,17,71). Oysa apoptoziste apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden yangı oluşmaz (16,17,54,79).

Nekrozda iyon homeostazı kaybolur, apoptoziste ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (16,57). Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir süreçtir, apoptozis ise enerji gerektiren aktif bir olaydır (16,17,54,57). Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (54,57). Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz, yanında bulunan epitelyum hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda yangısal cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (16,17,57).



Şekil II.2: Apoptoz ve Nekroz arasındaki farklar

4. Apoptozisin Travmatik Omurilik Yaralanmalarındaki Rolü:

Travmatik omurilik yaralanmalarında hem yaralanma zamanında hem de yaralanmadan birkaç gün veya hafta sonrasında hücre kaybı iyi bir şekilde gösterilmiştir. Yaralanmanın merkezinde hücre ölümünün en büyük kısmı nekroz sonucu oluşur. Apoptozisin akut omurilik yaralanmasından sonra devam eden hücre ölümüne katkı yaptığı ile ilgili kanıtlar yapılan sıçanlarda yapılan hayvan deneylerinden çıkmaktadır. Bu öncü bilgiler primatlarda dahil olmak üzere diğer hayvan modellerinde yapılan çalışmalarla da desteklenmektedir (20,55,17,72,74). Bir çok hayvan çalışmasında apoptozisin görülebilir bulguları ilk 24 saat içinde ortaya çıkmaktadır. İnsanlarda omurilik yaralanmaları ile ilgili histopatolojik bir çalışma apoptozisin travmadan sonra 3. saatte başlayıp devam ettiğini göstermiştir. Bu çalışmada apoptozisin *walleryan dejenerasyonunun* spesifik bulgularıyla paralel olduğu ve hücre içi kaspaz 3 aktivasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Apoptozis daha çok çıkan ak madde traktlarında tanımlanmış ve yazarlarda bu bulguyu, *walleryan dejenerasyon* da patolojik olarak çıkan yolların inen yollardan daha önce etkilenmesiyle ilişkilendirmişlerdir (55).

Apoptozisin uzaması nörolojik yaralanmanın derecesiyle ilişkilidir ve kısmi nörolojik defisiti olanlar için bu süre belirgin olarak daha da uzamıştır. Apoptozis ve nörolojik defisitler arasındaki bu uyum daha önceki hayvan deneyleriyle uyumludur (72,73).

Travmatik Omurilik Yaralanması Uygulanan Hayvan Modellerinde Apoptozis

Hayvan modellerinin gerçekleştirilmesi için uygulanan klip kompresyon ve ağırlık düşürme yöntemleri insanlardaki omurilik yaralanmalarına benzer lezyonlar ortaya çıkarır. Her iki yöntemde, nöronların ve glianın apoptozisi ve nekrozuyla birlikte. Li ve arkadaşları apoptotik hücrelerin öncelikli olarak uzunlamasına seyreden traktlarda yerleştiğini göstermişler ve bunları oligodendrosit olarak tanımlamışlardır (17,55). Yong ve arkadaşları, ciddi kontüzyon zedelenmesinden sonra sıçan omuriliğinin dört hücre grubunda (nöronlar, astrositler, oligodendroglia ve mikroglialar) gecikmiş, travma tarafından eyleme geçirilmiş apoptozisin varlığını göstermişlerdir (68,74).

Lui ve arkadaşları kontüzyon zedelenmesinden sonra 5 dakikadan 30 güne kadar olan zamana bağlı değişiklikleri dikkatli bir çalışma ile göstermişlerdir. Travmanın 5. dakikası içinde merkezi lezyonlu bir alanın mevcut olduğunu, fakat apoptotik hücrelerin görülmediğini; 4. saatte lezyon bölgesindeki nöronlarda apoptozisin tespit edildiğini (immünohistokimyasal olarak) ve bu nöronal apoptozisin 8. saatte zirve yaptığını ortaya çıkarmışlardır. Apoptozis ayrıca 4. saatte glial hücrelerde de görülmüş ve 24. saatte zirve yaptığı tespit edilmiş (55). İlerleyen günlerde daha fazla nöronal ve glial ölümden dolayı başlangıç lezyonun ilerleyici genişlemesi ve etrafı çevrili boşluklar saptanmıştır. Apoptotik hücrelerin oligodendrositler olarak bilinen ikinci bir türü bozulmuş olan aksonlar ile birlikte beyaz madde boyunca tespit edilmiş. Nöronlar ve gliadaki apoptozisin bu dağılımı; lezyon genişlemesinin devamından ve lezyon merkezinden uzaktaki bölgelerde ayrılmış aksonların uzun dönem demyelinizasyonundan sorumlu olabilir (17,73).

D. KASPAZLAR

Apoptozisin gerçek anlamda tam olarak mekanizması anlaşılmasına rağmen apoptozis ile bağlantı kurulan en önemli olay kaspazların etkinleşmesidir.. Kaspazlar (caspase/cysteine-dependent aspartate-spesific proteases), sistein proteaz sınıfının en önemli üyesidirler. Aktif bölgelerinde bir sistein kalıntısı bulundurlar ve aspartat kalıntılarıyla da ilişkidirler (8,76,64,77,78,97). Kaspazların rolleri ilk olarak caenorhabditis elegans adı verilen nematodlarda tanımlanmıştır (76,78,87). Bu nematoddaki programlanmış hücre ölümü büyük ölçüde iki pro-apoptotik gen (ced-3 ve ced-4) ve bir apoptotik gen (ced-9) tarafından kontrol edilir. Memelilerde apoptozu kontrol eden moleküler mekanizmalar çok daha karmaşık olmasına rağmen, ced-3 (kaspazlar), ced-4 (apoptoz proteaz aktifleyeci faktör-1 / Apaf-1) ve ced-9 (bcl-2) homologları tanımlanmıştır (76,77,79,99).

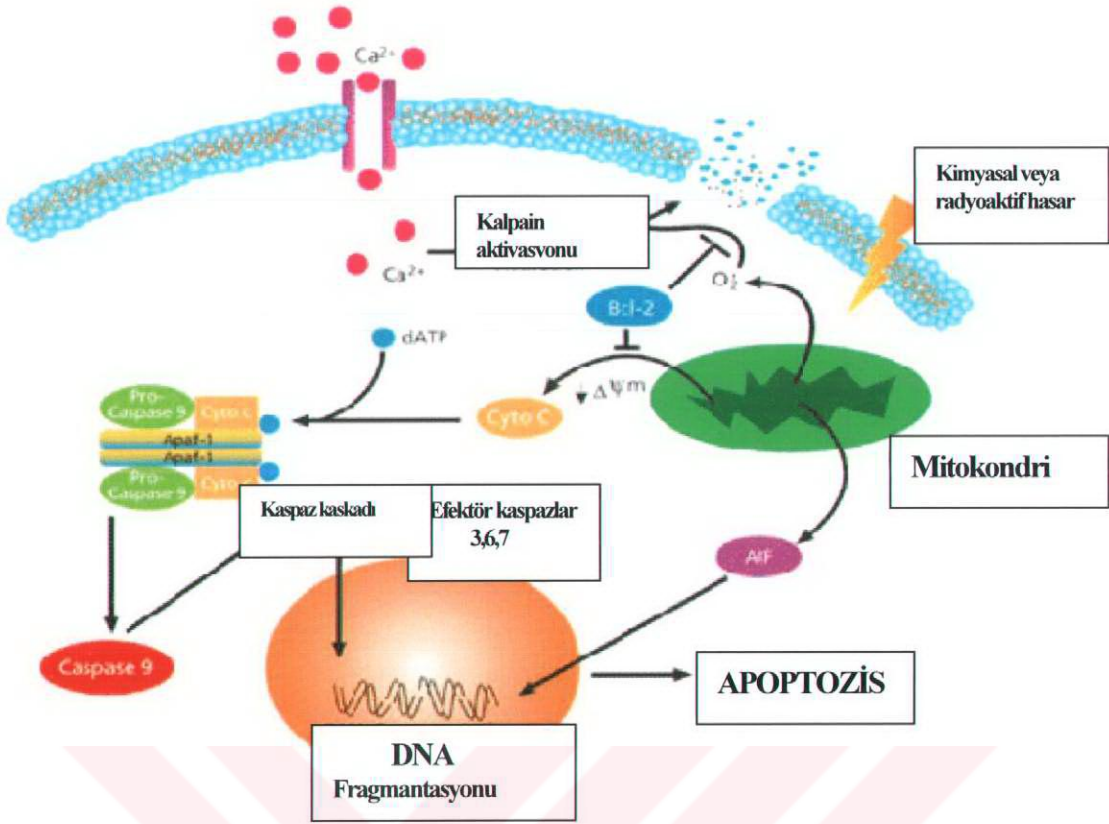
Bu enzimler sitoplazmada ön formları olarak bulunurlar. Kaspaz öncülerinin bu alanlarda işlenmesi etkinleşmelerine yol açar. Etkinleşmeden sonra, kaspazlar kendi öncülerine ya da diğer öncü kaspazlara (prokaspaz) yapışarak kaspaz aktivasyon basamakları oluşturabilirler (76,78,87,97). Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tespit edilmiştir (77,97).

Etkinleşme mekanizmalarına bağlı olarak, kaspazlar **başlatıcılar** ve **efektörler** olarak ikiye ayrılmışlardır. Kaspaz 2, 8, 9, 10 gibi başlatıcı (inisiyatör) kaspazlar dağılma sürecini başlatırlar ve yükseltilmiş bir kaspaz basamaklanmasına yol açan efektör kaspaz-3, 6 ve 7'yi etkinleştirirler. Efektör kaspazların tersine, başlatıcı kaspazlar uzun bir N-terminal öncü bölgesi içerir, otoaktivasyondan geçmezler ve birbirlerini bağlamazlar (87).

Pro inflamatuvar enzim fonksiyonlarından ötürü üçüncü bir memeli kaspaz grubu (Kaspaz -1, -4, -5, -11, -12 ve -13'ü içeren) tanımlandı. Apoptotik süreçlerin gerçekleştirilmesinde payı olan efektör kaspazlara karşılık, pro inflamatuvar kaspazlar diğer kaspazlar için zayıf substratlarıdır ve etkinleşme yolları tam olarak anlaşılammıştır (87,97,99).

Birçok nöronun ölümündeki esas belirleyici basamak kaspaz-3 adlı proteazın etkinleşmesidir. Kaspaz-9 kendiliğinden etkinleşmeye uğrayarak prokaspaz-3'ü etkinleştirir. Kaspaz-9 CARD bölgesi vasıtasıyla; Apaf-1, sitokrom-c ve dATP ile kompleks kurduktan sonra kendiliğinden etkinleşmeye uğrar (60,76,98,99).

Omurilik yaralanmalarında, kaspaz bağımlı apoptozis oldukça iyi açıklanmıştır. Son çalışmalarda kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-3'ün, omurilik yaralanmalarında meydana gelen apoptozisde önemli rolleri olduğu belirtilmiş ve kaspaz-3'ün efektör kaspaz olduğu gösterilmiştir (81,99). Apoptotik süreçte kaspaz-3'ün önemli rol üstlendiği ve kaspaz-9'un da kaspaz-3'e benzer özellikler gösterdiği son çalışmalarla desteklenmiştir (80,83,84). Nakagawa ve arkadaşları kaspaz basamaklarının, kaspaz-12 tarafından da başlatılabileceğini göstermişlerdir (62,63,79,86).



Şekil II.3: Apoptosis gelişiminde kaspazların rolü

Kaspaz Etkinleşmesinin Kontrolü

Bir nematod geni olan *ced-9*'un ürünü olan proteinin etkinliği sayesinde, normal olarak yaşayan bir hücre programlı hücre ölümünden korunur. Bu protein omurgalılarda Bcl-2 gen ailesine benzerlik gösterir. Bir süredir Bcl-2 ailesindeki proteinlerin, kaspaz etkinleşmesinde ve düzenlenmesinde temel rol üstlendiği gösterilmiştir (76,79,95). Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle, ya sitokrom-c sitoplazmaya salıverilir (apoptosisin başlaması) veya sitokrom-c'nin sitoplazmaya salıverilmesi baskılanır (apoptosisin inhibisyonu) (76,96). Bcl-2 ve bcl-xl'nin aşırı etkinleşmesi nöronal ölüm sürecinin engellenmesine yol açar. Bcl-xl sinir sisteminde geniş ve yaygın olarak dağılmıştır. Bcl-2'si çıkarılmış farelerde, fasyal motor nöronların ve duysal nöronların bir kısmının kaybı görülür (79). Bcl-2 proteinleri genelde dış mitokondrial, dış nükleer ve endoplazmik retikulum membranlarında bulunurlar (66,76,79,95). Bax, Bcl-2 ailesinin proapoptotik üyesini oluşturur. Buna göre Bax yaşayan hücrelerin sitoplazması içinde genel olarak çözülür ve sadece apoptosis geçiren hücrelerde mitokondriye doğru hedeflenir (76,79). Bcl-2 ailesi fonksiyonu ve kaspaz etkinleşmesi arasında temel bir bağ sitokrom-c'dir. Bu da kaspaz 9'un Apaf-1 (Apoptoz proteaz

aktive edici faktör-1) tarafından etkinleştirilmesinde çok önemli bir kofaktördür. Sağlıklı hücrelerde, sitokrom-c mitokondrideki membranlar arası boşlukta yerleşiktir. Bu da birçok hücre ölümü uyarısına cevap olarak sitozol içine salgılanır; bu salgılanma Bcl-xl veya Bcl-2'nin aşırı dışavurumuyla engellenebilir, bu durumda apoptozis de engellenmiş olur (66,76,79).

Apaf-1 mitokondrial dış membranda Bcl-xl ile etkinleşmemiş bir kompleks halinde bulunur. Hücre ölümü sinyalleri Bax kontrollü Apaf-1 salınımına neden olur. Sonra sitokrom-c ve dATP tarafından etkinleştirilen Apaf-1, kaspaz 9 ile etkileşip onu etkinleştirebilir (60,76,79,94).

Apaf-1, CED-4'ün omurgalılardaki benzeridir. Apaf-1 kendi üzerinde bulunan CARD bölgesi ile kaspaz 9'un uzun önbölgesiyle etkileşime girer ve prokaspaz 9'a bağlanır. Bu bağlanma sadece dATP ve sitokrom-c varlığında gerçekleşir. Apaf-1'in CARD bölgesi sitozolde sitokrom-c eksikliğinde bulunmaz. Bu kompleksin ölmekte olan bir hücrede oluşumu Bax sayesinde olur. Yaşayan hücrelerde Bax moleküllerinin büyük bir çoğunluğu sitoplazma içindedir ve kanal etkinleşmesi Bcl-2 veya Bcl-xl gibi üyeler tarafından engellenmiştir. (76,79).

BÖLÜM-III

MATERYAL VE METOD

A. Materyal

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi (DETAM)'nde üretilmiş Sprague-Dawley türünden sağlıklı 45 adet erkek sıçan kullanıldı. Hayvanların yaşı 10–12 ay, ağırlıkları ise 250–300 gr arasında değişmekteydi. Hayvanlar deney öncesinde 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık şeklindeki normal düzeneklerinde bakıldılar, standart sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendiler.

1. Deney Grupları

Deney hayvanları randomize olarak dokuzar denekten oluşan 5 gruba ayrıldı. Grupların özellikleri aşağıda belirtildi:

Grup-1: Dorsal 7,8,9 laminektomiye takiben travma uygulanıp ilaç verilmeden kapatılan sıçanlar.

Grup-2: Dorsal 7,8,9 laminektomiye takiben travma uygulanıp serum fizyolojik verilen sıçanlar.

Grup-3 (Tedavi Grubu; Q-VD-OPH Grubu): Dorsal 7,8,9 laminektomiye takiben travma sonrası sadece Q-VD-OPH verilen sıçanlar.

Grup-4 (Tedavi Grubu; Memantin Grubu): Dorsal 7,8,9 laminektomiye takiben travma sonrası sadece memantin verilen sıçanlar.

Grup-5 (Tedavi Grubu; Memantin-QVDOPH Grubu): Dorsal 7,8,9 laminektomiye takiben travma sonrası memantin ve Q-VD-OPH birlikte verilen sıçanlar.

Travmayı takiben denekler beş gün yaşatılarak tedavi gruplarına günlük dozlar verilip, 1. 3. ve 5. günlerde klinik nörolojik değerlendirmeleri eğik düzlem testi ve Tarlov tarafından tanımlanan motor muayene skalası ile yapıldı. Beşinci gün sonunda ise denekler sakrifiye edilerek alınan omurilik örnekleri 0,1 mol fosfat tamponlu (pH: 7,4) % 2.5 gluteraldehit tespit solüsyonu içine konuldu.

2. Omurilik Travmasının Oluşturulması

Omurilik travması 1978 yılında Rivlin ve Tator tarafından tarif edilen klip kompresyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntem mekanik travma yanında vasküler etkilenme ile iskemiye de yol açar. Laminektomi sonrası omuriliğın lateralinden konulan anevrizma klipi belli bir süre omuriliğı komprese eder. Önceden belirlenmiş şiddette yaralanma yaratılabilir. Klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değıştirilerek değışik şiddetlerde yaralanma oluşturulabilir. Kompresyon çevresel olduğı için insanda olan travma tipine daha uygundur.

İşlem sırasında dorsal 7, 8, 9 laminektomiye takiben duramater ortaya konuldu. Ardından iki yanlı fasetektomi yapıp transvers prosesler uzaklaştırılarak omurilik, aksına dik olarak anevrizma klipi yerleştirilebilecek şekilde ortaya konuldu. Yaşargil FE 716 K anevrizma klipi (kapanma gücü 110 gr) ile 30 saniye süresince sıkıştırılarak travma oluşturuldu.

3. Q-VD-OPH ve Memantin

Bu çalışmada kullanılan Q-VD-OPH ve Memantin, Calbiochem'den (Kimeks-İstanbul) sağılandı. Travmadan hemen sonra sıçanların herbirine, katı halde bulunan geniş spektrumlu genel kaspaz inhibitörü olan Q-VD-OPH (1 mg Q-VD-OPH 10 ml DMSO solüsyonunda çözünecek şekilde hazırlandı) 0,4 mg/kg, NMDA reseptör antagonisti olan memantin de 20 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak verildi.

B. Metod

1. Anestezi

Çalışmada kullanılan bütün sıçanlar bir gün önceden aç bırakıldı. İntraperitoneal olarak verilen 60 mg/kg ketamine (ketalar-Eczacıbaşı/İstanbul) ve 9 mg/kg Xylazine (Rompun-Bayer/İstanbul) ile anestezi sağlandı. İhtiyaç halinde başlangıç dozunun % 20 si aralıklı olarak tekrarlandı.

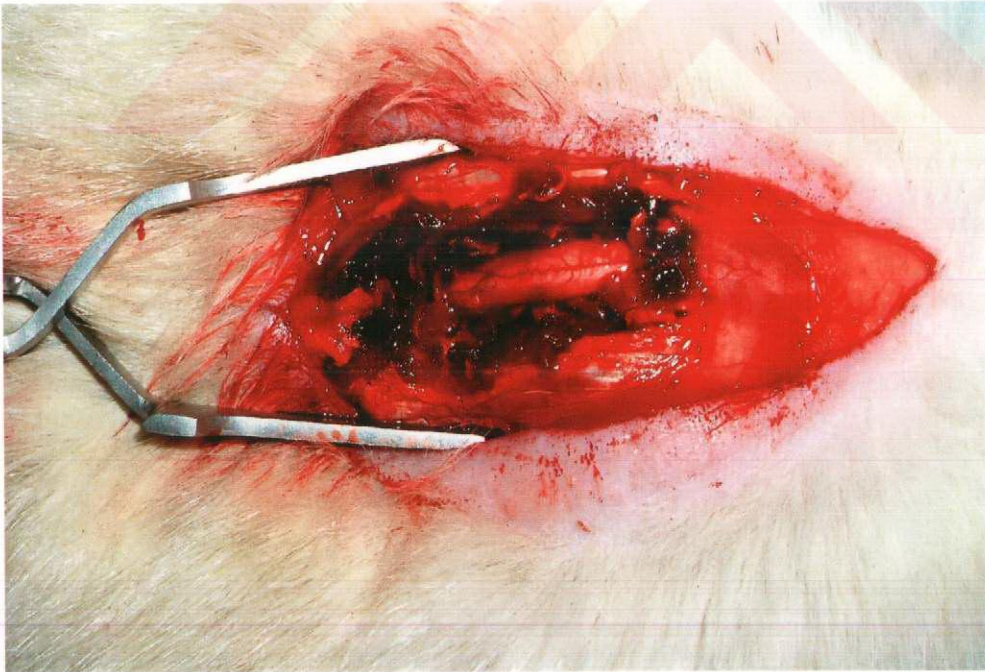
2. Cerrahi İşlem

Çalışmada American National Society for Medical Research ve National Academy of Sciences laboratuvar hayvanlarının kullanım ve bakım prensiplerine uyuldu. Anesteziden sonra sırt bölgesi tıraş edilen sıçanlar ameliyat masasına yatırıldı. Povidin (Batticon) ile yapılan lokal antisepsiden sonra, spinöz çıkıntıları ortalayan orta hat insizyonu ile cilt-ciltaltı geçildi (Resim III.1). Paravertebral kaslar künt diseksiyonla sıyrıldı. Dorsal 7, 8, 9 vertebra laminaları ortaya konuldu ve total laminektomi yapıldı. Daha sonra iki yanlı olarak fasetler alınarak sahanın genişlemesi sağlandı ve omurilik ortaya konuldu (Resim III.2). Bu işlemler sırasında omurilikte travma olmamasına özen gösterildi ve teknik hata nedeniyle lezyon meydana gelen hayvanlar çalışma dışı bırakıldı. Bu işlemler sırasında dura mater sağlam bırakıldı. Bu aşamadan sonra Yaşargil FE 716 K anevrizma klipi omuriliğin rostro-kaudal eksenine dik ve omuriliğin tamamı klip bacakları arasında kalacak şekilde ekstradural olarak yerleştirildi (Resim III.3). 30 saniye sonra klip açıldı. Tüm hayvanlarda klip açıldığında dairesel bir kontüzyon alanının olduğu görüldü (Resim III.4). Daha sonra katlar anatomilerine uygun olarak karşılıklı kapatıldı. Sonrasında Grup I'deki hayvanlara herhangi bir tedavi edici ajan verilmedi. Travmadan hemen sonra, beş gün boyunca hergün ve aynı saatlerde intraperitoneal olarak Grup II'deki hayvanlara serum fizyolojik, Grup III'teki hayvanlara 0,4 mg/kg Q-VD-OPH, Grup IV'teki hayvanlara 20 mg/kg memantin, Grup V'teki sıçanlara 0,4 mg/kg Q-VD-OPH ve 20 mg/kg memantin birlikte uygulandı. Beş gün sonunda sıçanlar önce Ketalar (65 mg/kg)'ın intraperitoneal enjeksiyonu ile derin anestezi altına alındı. Toraks duvarı, prosesus ksifoideus'dan başlanıp, kostaların iki yanından, parasternal çizgi hizasından kesilerek açıldı ve kranyal yönde kaldırılıp, sabitlendi. Diyafram ve perikardiyum kesildi. Ardından 2cc KCl solusyonu sağ ventrikül içine enjekte edilerek kalp kontraksiyonu takip edildi. Kontraksiyonun durmasının hemen ardından denek prone pozisyona getirilip eski dorsal insizyon açılarak laminektomi sahasından omurilik örnekleri

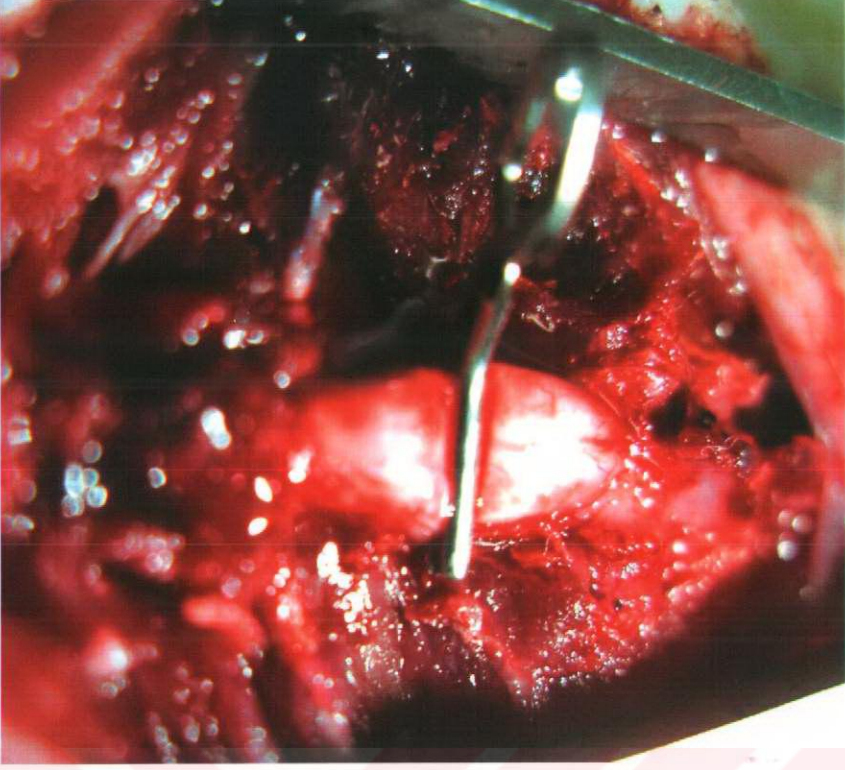
alındı ve 0,1 mol fosfat tamponlu (pH: 7,4) % 2.5 gluteraldehit tespit solüsyonu içine konuldu. % 2.5'luk gluteraldehit solüsyonu içerisindeki omurilik örneklerinden parafin bloklar hazırlandı.



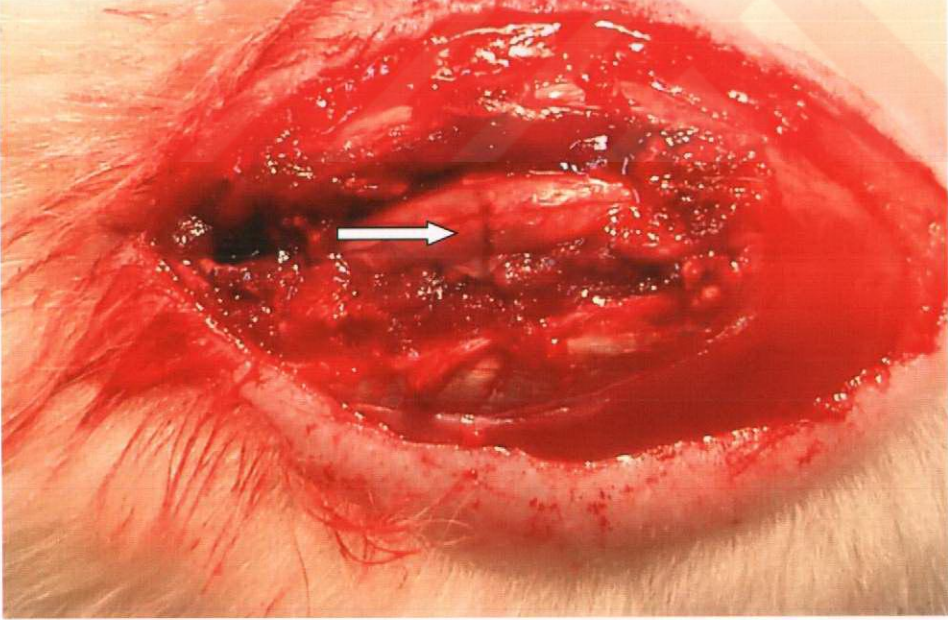
Resim III.1: Cilt insizyonu sonrası görünüm



Resim III.2: İki yanlı fasetlerin uzaklaştırılmasından sonra omuriliğin görünümü.



Resim III.3: Anevrizma klipi ile omurilik travmasının oluşturulması.



Resim III.4: Travma sonrası omurilikte oluşan halkasal ekimoz.

3. Histolojik İnceleme

Histolojik inceleme için Hemotoksilen - Eozin ve TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick and labeling) boyama yöntemi kullanıldı. Hematoksilen ile boyama nekrotik ve apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak kullanılır. TUNEL metodu, terminal deoksi nükleotidil transferazın (TdT), DNA'nın 3-OH gruplarına özgül bağlanması temeline dayanmaktadır. Histolojik kesitlerde nükleer DNA'nın açığa çıkarılmasından sonra, TdT, DNA kırıklarının uçlarına biotinlenmiş deoksiüridin eklemek için kullanılmıştır.

Hematoksilen-eosilin boyama yönteminde parafin kesitler ksilene alındı. Alkol serilerinden geçirilerek suya alındı. Hematoksilende 5 dakika bekletildi, çeşme suyunda yıkanarak renk morlaştırıldı. Ardından eosinde 2-3 dakika bekletildi. Yine çeşme suyunda yıkanıp alkol serilerinden geçirilerek xylene alındı ve kanada balsamı ile kapatıldı.

TUNEL boyama yönteminde ise lamalar bir gece önceden 56°C etüvde bekletildi. Ardından 30 dk ksilende, 10 dk %96 alkolde, 5 dk %80 alkolde, 5 dk da %70 alkolde tutuldu ve seyreltilmiş su ile yıkandı. TBS içine alınıp lamaların etrafı kurulandı ve üzerine TRİS Ph:8.0 de 1/100 oranında seyreltilmiş proteinaz K damlatıldı. 20 dk bekletildikten sonra TBS de yıkandı. %3 H₂O₂, metanolde hazırlanıp damlatıldı ve 5 dk sonra TBS'de yıkandı. 1/10 oranında distile su ile dilüe edilen 10 X Klenow Equilibration tampon damlatılıp 30 dk bekletildi ve yıkanmadan 30 dk sonunda fazlalık, kâğıt havlu ile emdirilerek daha önceden hazırlanmış olan Klenow Labeling Reaction Mix ve Klenow Enzim Solüsyonu damlatıldı. Lamalar parafilmle kaplandı ve 37°C etüvde 1,5 saat bekletildi. Ardından TBS ile yıkanıp STOP tampon damlatıldı ve 5 dk sonra tekrar TBS yıkanıp Blocking tampon damlatıldı. 10 dk bekletildikten sonra TBS ile yıkanmadan 50X conjugate 1/50 olacak şekilde Blocking buffer dilüe edilip damlatıldı ve 30 dk bekletildi. Sonra TBS ile yıkanarak DAB tampon damlatıldı ve 10 dk sonra distile suya alınarak yıkandı. Methyl green damlatıldı, 30 saniye sonra asetona çıkarılıp renk ayarlaması yapıldı ve kurutulup ksilene alınarak kapatıldı.

Preparatların değerlendirmesi Olympus BX50 mikroskopunda 20'lik objektifte 5µm lik 2-3 mm'lik kesitler tüm kesit alanı incelenerek yapıldı. Kesitlerde apoptotik hücre sayımına ek olarak, nekrozun göstergesi olan enflamatuar cevabı göstermesi açısından lenfosit ve lökosit sayımı da yapıldı. Lenfosit ve lökosit sayımında ortamdaki enflamatuar hücreler içindeki yüzde değeri hesaplandı. Nekroz değerlendirilmesinde ise preparatlardaki kavitasyon alanları değerlendirilerek gruplar arasında kalitatif bir karşılaştırma yapıldı ve nekroz varlığı yüzde değeri olarak ifade edildi. Apoptozis değerlendirmesinde hücre sayısı yüzde değeri olarak 0-25 arası (1), 25-50 arası (2), 50-75 arası (3) , 75-100 arası (4) olarak değerlendirildi.

4. Klinik Nörolojik Muayene

Hayvanların klinik motor muayeneleri 3. ve 7. günde yapılarak, Tarlov tarafından tanımlanan şekilde değerlendirildi. Buna göre;

Grade 5: Normal motor hareket.

Grade 4: Yürüyebiliyor; ancak, arka bacaklarında bir miktar spastisite ve inkoordinasyon var.

Grade 3: Ayakta durabiliyor; ancak yürüyemiyor.

Grade 2: Arka bacaklarda minimal istemli hareket var; arka ayakları üzerinde duramıyor.

Grade 1: Hareket yok.

5. Eğik Düzlem İle Değerlendirme

1977 yılında Rivlin ve ark. tarafından geliştirilen ve objektif bir test olan eğik düzlem testinde tekniğinde ise, hayvanın eğik bir düzlem üzerine yatay pozisyonda yerleştirilmesinden sonra, düzlemin zeminle olan açısı giderek arttırılır; hayvanın 5 saniye süresince devrilmeden durabildiği en yüksek açı, o hayvanın Inclined Plane derecesi olarak belirlenir. Bu test her grup için 1, 3 ve 5.günlerde tekrarlandı.

6. İstatiksel Değerlendirme

Lenfosit, PNL, nekroz, apoptozis ve motor muayene bulguları; Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Bu verilerin, gruplar arasındaki ikili kıyaslamaları Mann-Whitney testi ile yapıldı. İkili kıyaslamalarda anlamlılık seviyesi Bonferroni düzeltmesi ile 0,005 olarak kabul edildi.

BÖLÜM IV

BULGULAR

I. Eğik Düzlem Bulguları

Eğik düzlem verilerinin ikili kıyaslamaları Anova ve Scheffe testleri ile yapıldı. Grup 3 ve 5'in 1, 3 ve 5. gün eğik düzlem bulguları, grup 1,2 ve 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. Grup 1,2 ve 4 arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Grup 3 ve 5 arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p < 0.001$).

	EğikDüzlem(derece) 1.gün	EğikDüzlem(derece) 3.gün	EğikDüzlem(derece) 5.gün
Grup-1	27,78±0,97	28,11±1,36	28,44±1,01
Grup-2	27,67±0,71	28,00±0,87	27,78±0,67
Grup-3	31,89±0,78	33,00±1,00	34,00±0,87
Grup-4	27,89±0,78	28,00±0,71	27,89±0,60
Grup-5	32,56±0,53	33,56±0,53	34,56±0,53
F	91,509	84,899	185,379

Tablo IV.1: Eğik düzlem verilerinin ANOVA ve Scheffe ikili kıyaslamaları ile karşılaştırılması.

II. Motor Muayene Bulguları

Motor muayene bulgularının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 5. grubun (Q-VD-OPH ve memantin kombine grubu) 5.gün motor muayene bulguları, travma grupları ve memantin tedavi grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. 3. ve 5. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Diğer grupların birbirleri arasında yapılan ikili kıyaslamalarında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

	Motor Muayene 1.gün	Motor Muayene 3.gün	Motor Muayene 5.gün
Grup-1	1	1	1
Grup-2	1	1	1
Grup-3	1	1	2
Grup-4	1	1	1
Grup-5	1	1	2

Tablo IV.2: Motor muayene bulgularının gruplara göre ortalamaları

	MOTOR-1.GÜN					MOTOR-3.GÜN					MOTOR-5.GÜN				
	Kasgücü (%)														
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Grup-1	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Grup-2	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Grup-3	100	0	0	0	0	55,6	44,4	0	0	0	44,4	55,6	0	0	0
Grup-4	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0	100	0	0	0	0
Grup-5	100	0	0	0	0	55,6	44,4	0	0	0	33,3	66,7	0	0	0

Tablo IV.3: Motor muayene bulgularının Mann-whitney U ikili karşılaştırma yöntemi ile kıyaslanması.

III. Histolojik İnceleme Bulguları

a. Lenfosit

Preparatlardaki lenfosit sayımlarının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 1, 2 ve 3. gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. 4. ve 5. grup, 1, 2 ve 3. gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. 4. ve 5. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. 3. ve 4. grup kendi aralarında kıyaslandığında, 4. grup istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti.

	Lenfosit %
Grup-1	100
Grup-2	88,9
Grup-3	88,9
Grup-4	11,1
Grup-5	22,2

Tablo IV.4: Preparatlardaki lenfosit sayımlarının gruplar arası Mann-Whitney testine göre kıyaslanması.

b. PNL

Preparatlardaki PNL sayımlarının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 1, 2 ve 3. gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. 4. ve 5. grup, 1, 2 ve 3. gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. 4. ve 5. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

	PNL%
Grup-1	100
Grup-2	88,9
Grup-3	88,9
Grup-4	11,1
Grup-5	11,1

Tablo IV.5: Preparatlardaki PNL sayımlarının gruplar arası Mann-Whitney testine göre kıyaslanması.

c. Nekroz

Preparatlardaki nekroz oranlarının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 1, 2 ve 3. gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı. 4. ve 5. grup, 1, 2 ve 3. gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. 4. ve 5. gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

	Nekroz	
	Yok(%)	Var(%)
Grup-1	0	100
Grup-2	0	100
Grup-3	11,1	88,0
Grup-4	77,8	22,2
Grup-5	88,9	11,1

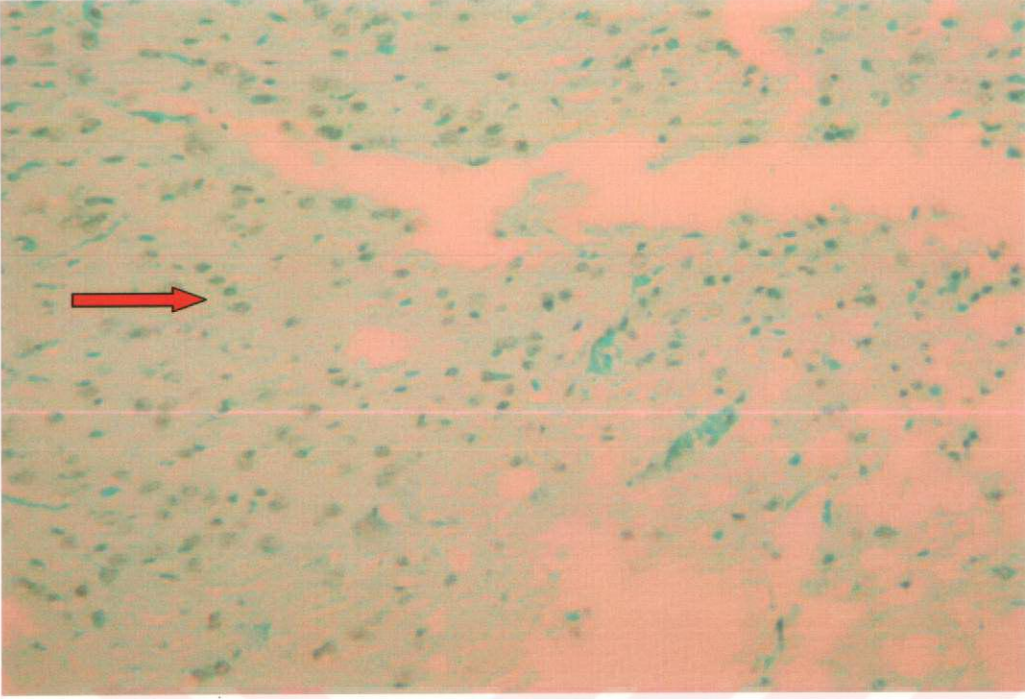
Tablo IV.6: Preparatlardaki nekroz varlığının gruplar arası Mann-Whitney testine göre kıyaslanması.

d. Apoptozis

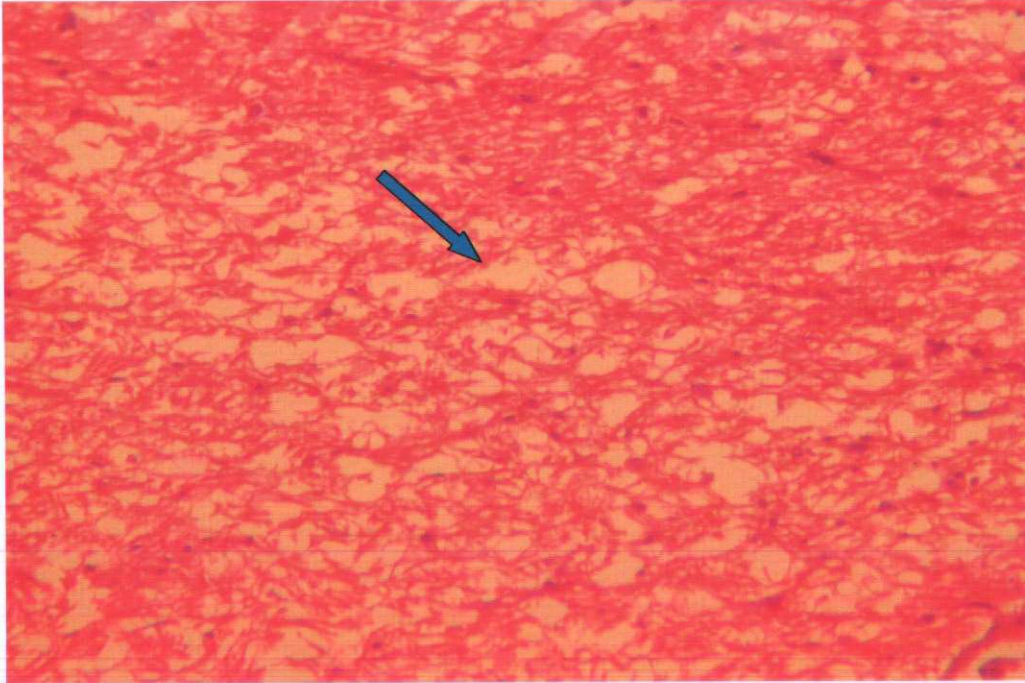
Preparatlardaki apoptozis oranlarının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. 1, 2 ve 4. gruplar arasında fark saptanmadı. 3. ve 5. gruplar, 1, 2 ve 4. gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede olumlu sonuçlara sahipti.

Grup-1	0	11,1	55,6	33,3
Grup-2	0	0	66,7	33,3
Grup-3	77,8	22,2	0	0
Grup-4	0	11,1	66,7	22,2
Grup-5	77,8	22,2	0	0

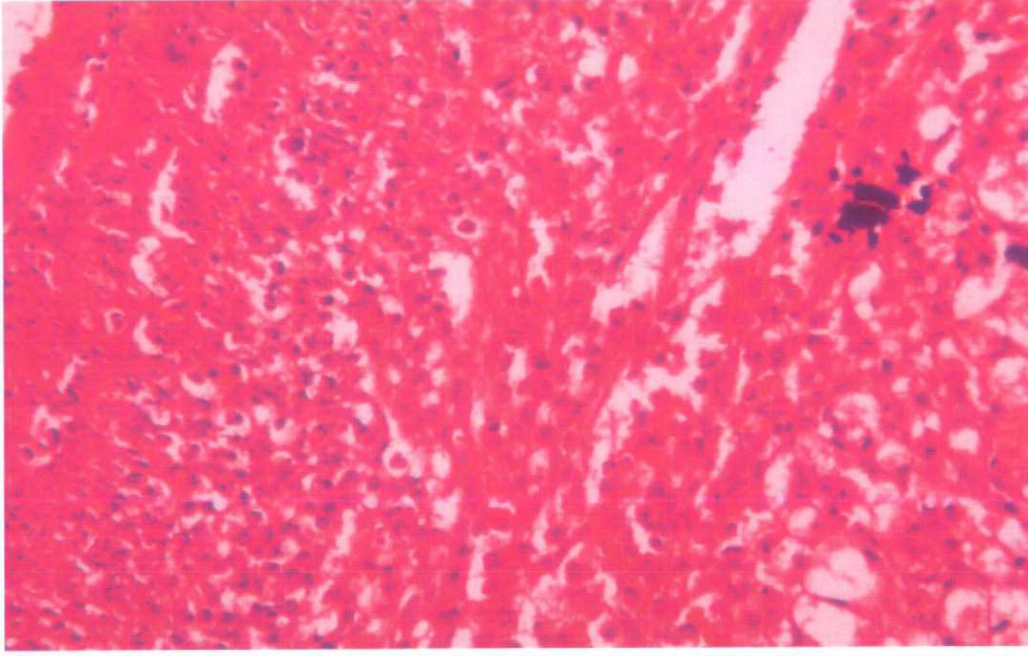
Tablo IV.7: Preparatlardaki apoptozis varlığının gruplar arası Mann-Whitney testine göre kıyaslanması.



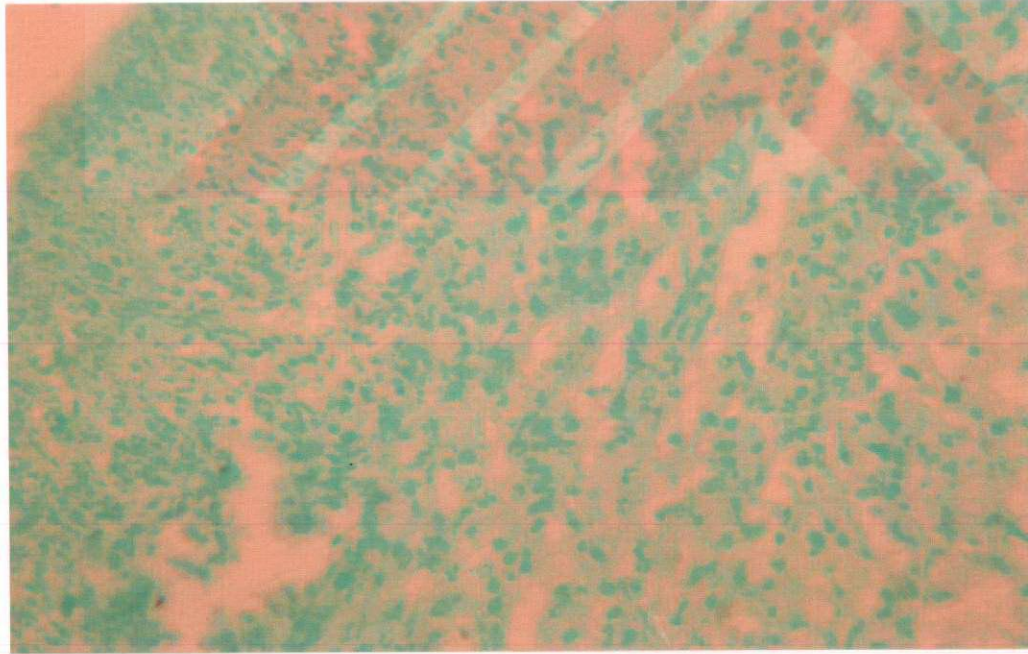
Resim IV.1: Travma uygulanıp tedavi verilmemiş gruptan bir deneğin Tunnel boyası uygulanmış preparat görüntüsü. Apoptotik hücrelerin yoğunluğu dikkat çekmekte.



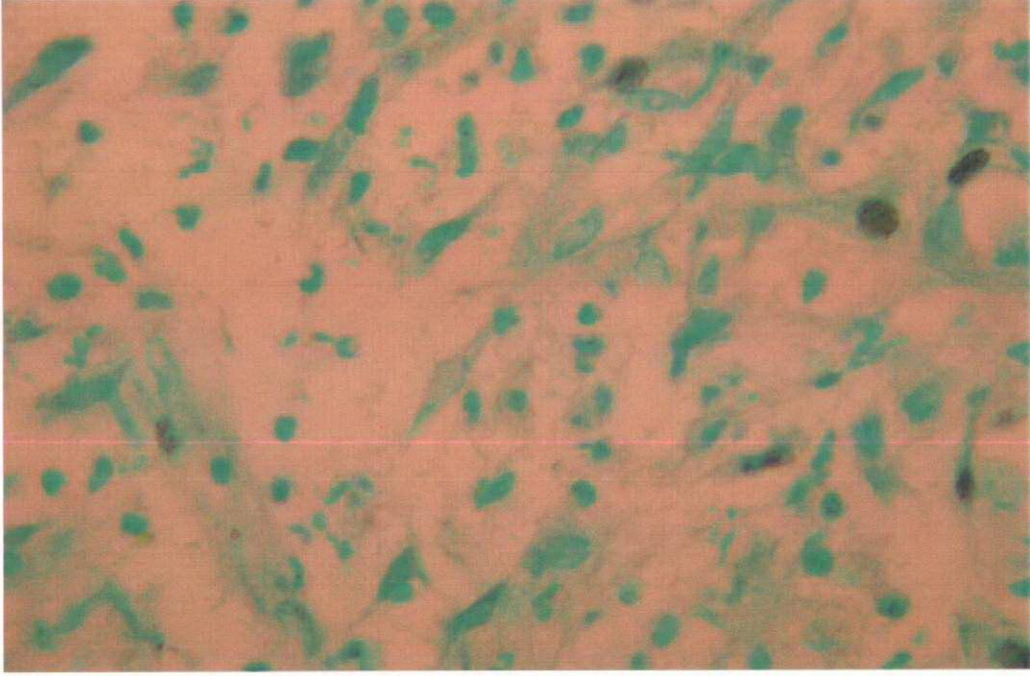
Resim IV.2: Aynı preparatın hematoksilen-eosin ile boyanmış görüntüsü. Yoğun kavitasyon alanları gözlenmekte.



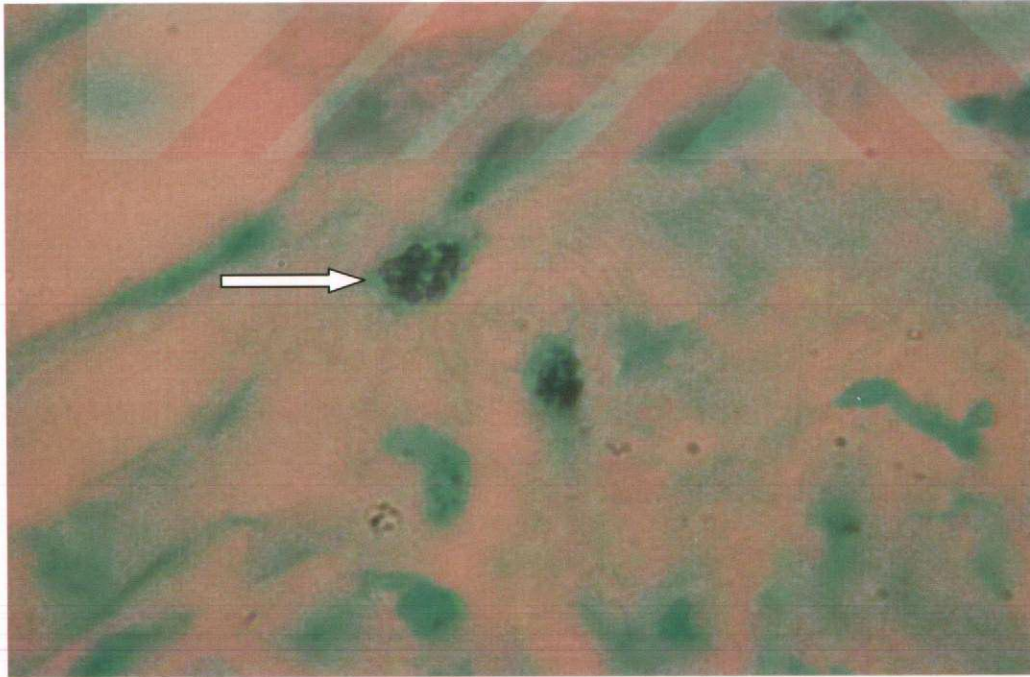
Resim IV.3: Memantin tedavi grubundan bir deneğe ait preparatın hematoksilin-eosin ile boyanmış görünümü. Kaviteyonların bir önceki resime göre azaldığı görülüyor.



Resim IV.4: Karma tedavi grubuna ait bir deneğin tunnel ile boyanmış preparat görüntüsü. Apoptotik hücrelerin ve nekrotik kaviteyonların belirgin olarak azaldığı görülüyor.



Resim IV.5: Q-VD-Oph tedavi grubundan bir deneğin Tunnel ile boyanmış preparat görüntüsü. Apoptotik hücrelerin azalmasına karşı nekrotik kavitasyonların varlığı gözlenmekte.



Resim IV.6: Tunnel ile boyanmış bir preparatta apoptotik hücrenin vakuollerden oluşmuş klasik morfolojik görüntüsü.

BÖLÜM V

TARTIŞMA

Santral sinir sistemi ve omuriliği ilgilendiren birçok hastalığın fizyopatolojisi üzerine son yıllarda yapılan giderek artan sayıdaki çalışma; birincil ve ikincil hasarlanma kavramlarının önemini göstermiştir. Birincil hasar travmatik veya iskemik olay anında oluşan nöral doku zedelenmesi olup bu konuda yapılabilecekler ancak koruyucu yöntemlerdir. İkincil hasar ise yaralanmayı takiben dakikalar içinde gelişmeye başlayan karmaşık olaylar zincirlerini içerir. Sonuçta ortaya çıkan zincirleme reaksiyonla nöral doku hasarı giderek artar ve yayılır. Bu nedenle ikincil hasarın önlenmesi tedavi denemelerinin asıl hedefini oluşturmaktadır.

Apoptozis klasik hücre ölüm şekli olarak bilinen nekrozdan birçok özelliği açısından oldukça farklı olan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (16,17,54,56,57). Apoptozisin, daha önce hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen bugün patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir (17,55,56,59,97).

Apoptozis hücrenin protein sentezi ve enerji gerektiren aktif ölümüdür (17,18,55,56). ATP bulunan ortamlarda seçilen hücre ölüm şekli apoptozis olurken, ATP yoksunluğu olan ortamlarda hücre ölümü daha çok nekroz şeklinde olmaktadır. Eğer hücre ciddi olarak yaralanırsa apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak ve nekroz ile ölecektir (16,56). Deneysel verilere dayanarak, apoptozisin son evresinde çekirdek yoğunlaşması ve DNA yıkımı için, glikoliz ve mitokondrial solunum ile ATP sağlanmasının gerekli olduğu ileri sürülmüştür. ATP, apoptozisin önemli bir bileşeni olan kaspazların etkinleşmesinde de önemli bir role sahiptir (55,56).

Apoptozis geçiren hücreler, nekroz geçiren hücrelere göre daha az şiddette bir travmaya uğramaktadırlar. Şiddetli travmalar hızlı membran ölümüne ve sonuçta nekroza yol açmaktadır. Apoptozis süreci altta yatan moleküler basamakların gerçekleşmesi için zamana ihtiyaç duyar. Bu sebepler nedeniyle apoptozis süreci nekroza göre daha geç ortaya çıkar (56). Apoptozisde, apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden karakteristik bir bulgu olarak yangısal reaksiyon oluşmaz (16,17,54,79).

Doku nekrozu ve kavitasyon gelişimi serbest radikallerin, eksitatör aminoasit nörotoksitesinin, lökosit ve makrofajlardan salınan toksik sitokinlerin tümünün birlikte etkilemesi sonucu olmaktadır. Bu bulgularla uyumlu olarak eksitotoksik hücre ölümünü ve

iltihabi hücre infiltrasyonunu önleyen tedavilerin, omurilik yaralanmasından sonra gelişen ikincil hasarın şiddetini azaltacağı savunulmuştur (105).

Oksijen ve glikozun ortamda bulunmadığı kortikal hücre kültürlerinde, nöronların esas olarak eksitotoksik nekrozla öldüğü, fakat eksitotoksisite birlikte uygulanan NMDA ve AMPA reseptör antagonistleri ile engellendiğinde, apoptozise geçiş yaparak öldükleri belirtilmiştir (17,74). Başka bir çalışmada hücre ölümü yollarından birinin inhibisyonun bir diğeri aracılığıyla hücre kaybını arttırdığını belirtmişlerdir (99).

Apopitozis omurilik yaralanmasından sonra ilerleyici doku hasarına neden olan ikincil hasarın önemli bir bileşenidir ve nöral koruma için yapılacak çalışmalarda stratejik bir hedef olmalıdır. Bu fikirler doğrultusunda hareket ederek biz de bu çalışmamızda, literatürde ilk kez, bir NMDA antagonisti olan memantin ve bir genel kaspaz inhibitörü olan Q-VD-OPH'ın ayrı ayrı ve birlikte kullanımlarının ikincil hasar gelişimi üzerine olan etkilerini inceledik.

Glutamat ve aspartat gibi EAA'ler memeli santral sinir sisteminin ana nörotransmitterleridir. Spesifik membran reseptörleri ile etkileşerek öğrenme, hafıza, hareket, duyu ve sinaptik bağlantıların sağlanması gibi birçok nörolojik fonksiyonda görev alır (24,26,50). EAA'ler normalde sinir iletiminden sorumlu oldukları halde, nörotoksisitenin de potansiyel kaynağıdır. İnme, travma ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda glutamat reseptörlerinin aşırı etkinleşmesi, nöronal hücre harabiyeti ve ölümüne yolaçar. Eksitotoksisite olarak bilinen bu olay, birçok nöronal hastalığın ortak son yoludur (24,36,46,52). Glutamatın anormal düşüklüğü normal eksitasyonun bozulmasına, aşırı yükselmesi ise Ca^{++} homeostazını bozarak eksitotoksisiteye ve hücrenin ölümüne neden olur. Eksitator nörotransmitter maddelerin yüksek konsantrasyonda postsinaptik reseptörler üzerine yaptığı etki, nöron hücresinden K^{+} iyonu çıkışına, Na^{+} ve Ca^{++} iyonları girişi ile birlikte olan iyon kanallarının uzamış depolarizasyonuna yol açar (37,40).

Eksitator aminoasitlerin postsinaptik membrandaki etkileri, hücre yüzeyinde bulunan belli reseptörlerle etkileşimleri sonucunda gelişir. Bu reseptörler metabotropik ve iyonotropik olmak üzere ikiye ayrılır. İyonotropik reseptörler uyarıldıkları zaman membrandan hücre içine iyon geçişini doğrudan etkilerler. Farmakolojik olarak ayrı özellikler sahip üç iyonotropik reseptör tanımlanmıştır: NMDA, AMPA (Quisqualat reseptörleri) ve Kainat reseptörleridir (24,37,42,52). NMDA tipi reseptörler glutamaterjik reseptörlerin, yaklaşık %70'ini oluşturur (26,37). Bu tip reseptörler hem tek değerli katyonların hem de kalsiyum iyonunun hücre membranından geçişini sağlar. Glutamatın eksitotoksik etkilerinin büyük bir kısmı, hücre içine aşırı kalsiyum girişine bağlıdır (14,24,29,36,40). İskemik süreçlerde, glutamat tarafından postsinaptik membran uyarıldığında, önce Na^{+} ardından da Ca^{++} hücre içine girer.

Hücre içine giren Ca^{++} , hücre içindeki bir takım moleküllerle tamponlanır ya da organellerin içinde depolanır. En önemli tampon yapıları kalmodulin ve kalsibindin isimli proteinlerdir. Hücre içinde Ca^{++} ve H^+ , aynı tampon bölgelerine bağlanmaktadır. Bu nedenle asidoz durumunda hücre içi serbest Ca^{++} miktarı artmaktadır (29).

Schanne ve arkadaşları, hücre içine kalsiyum girişinin toksisitenin açığa çıkması için kesin bir gereklilik olduğu sonucunu vardılar ve bu sürece "hücre ölümünün son basamağı" adını verdiler (31). Günümüzde hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda yapılan çalışmalar, hücre içine kalsiyum girişi ve nöral dokuda oluşan hasar arasındaki ilişkiyi desteklemektedir (29). Omurilik hasarı, ak madde anoksisi veya iskemisinin bir sonucu olarak, ak maddede belirgin miktarda kalsiyum birikimine neden olabilir (104). Hücre içinde artan kalsiyum düzeyi birçok yıkıcı enzimin kalsiyum tarafından etkinleştirilmesiyle hücre yıkımına yol açacak bir süreci tetikler. Yeni yapılan detaylı çalışmalar kalsiyumun artmasına yol açan bütün durumların aynı derecede nörotoksik olmadığını göstermiştir. NMDA reseptörleri yolu ile glutamatın tetiklediği kalsiyum artışı, non-NMDA reseptörlerinin veya voltaja duyarlı kalsiyum kanallarının tetiklediği kalsiyum yüklenmesine kıyasla çok daha nörotoksiktir (29).

Deneysel omurilik yaralanmasında, hasardan sonra 15 dakika içinde eksitatör nörotransmitter düzeyinin toksik düzeye ulaştığı gösterilmiştir (26,38,41).

Davies ve Watkins 1983 yılında, omurilikte EAA reseptörlerinin varlığını ortaya koymuşlardır (106).

Faden yaptığı çalışmalarda deneysel omurilik travması modellerinde, travma bölgesi üzerine bölgesel olarak uygulanan NMDA'nın nörolojik defisiti anlamlı derecede kötüleştirdiğini göstermiştir. Buna karşılık uygulanan kompetitif ve nonkompetitif NMDA antagonistlerinin klinik düzelmeyi artırdığını, histopatolojik değişiklikleri de azalttığını belirtmiştir (36). NMDA antagonistleri, fokal iskemiye bağlı beyin hasarının azaltılmasında diğer ajanlara göre daha etkilidir ve hem beyin hem de omurilik yaralanmasını takiben gelişen nörolojik işlev kayıplarını azalttıkları gösterilmiştir (36,89,100).

Panter, bir akut deneysel omurilik yaralanması örneğinde ekstrasellüler alanda glutamat seviyesinin yükseldiğini göstermiştir. Michikawa Kültive omurilik nöronlarının oksijen radikali sebebiyle sitotoksiteden korunmasında NMDA antagonistlerinin olağanüstü etkili olduğunu göstermiştir (26,38).

NMDA reseptör aktivasyonu kompetitif ve non-kompetitif antagonistlerce engellenebilir. Kompetitif NMDA antagonistleri, glutamatın tanıdığı NMDA reseptör bölgelerinde glutamatla yer değiştirerek, dahası glutamatla yarışarak reseptörü bloke ederler (45,31). Bu ajanlar hidrofilik karakterde oldukları için kan-beyin bariyerini geçişleri kötüdür.

Deneysel çalışmalarda sıklıkla iskemi ya da travmadan önce kullanılmışlardır ve iskemik olayı takiben beşinci dakikadan sonra verildiklerinde nöroprotektif etkileri gösterilememiştir. Dolayısıyla klinikte kullanımları sınırlıdır ve daha çok proflaktik olarak uygulanmaları söz konusudur (91).

Non-kompetitif NMDA antagonistlerinden en çok kullanılanlar phencyclidine (PCP), ketamine, magnezyum, MK-801 (dizocilpine) ve memantindir (100). Bu maddeler yağda çözünebilirler ve böylece kan beyin bariyerini kolayca geçebilirler. Membran depolarize iken kanalı daha güçlü şekilde bloke ederler. Glutamatla reseptör bağlanma bölgesi için yarışmazlar. Glutamatın agonist reseptör bölgesini uyarması ile açılan kanaldan içeri girerek kanalı kapatırlar. Uyarıcı artışı ile kanallar açılacağından, iskemi veya travma ne denli güçlü ise etkileri o oranda artar (39,45,100).

Çalışmamızda kullandığımız ajanlardan biri olan memantin, NMDA kanallarını hızlı açıp kapayabilen ve klinik olarak iyi tolere edilen, nonkompetitif bir NMDA reseptör blokeridir ve amantadine analogudur (1-amino 3,5 dimetiladamantane) (93,100). Memantin ilk olarak Eli Lilly ve Şirketi tarafından bir anti influenza ajanı olarak üretilmiş ve 1968'de patenti alınmıştır. Memantin ve amantadinin influenza hastalığı için tedavi edilen bazı hastalarda tesadüfen bulunan Parkinson hastalığı üzerindeki etkinliğinin keşfi, bilim adamlarına bu ajanların dopaminerjik veya muhtemelen antikolinerjik olduğunu düşündürmüştür. Bu tahmin 1980'lerin sonları ve 1990'ların başına kadar devam etmiştir. Bu tarihlerde bu ajanların ne dopaminerjik ne de antikolinerjik olduğu daha ziyade bir NMDA reseptör antagonisti olduğu gösterilmiştir (101).

Memantin, klinikte başlıca demans tedavisinde kullanılmaktadır. Bununla birlikte glutamaterjik ileti bozuklukları ile birlikte görülen diğer santral sinir sistemi hastalıklarında da etkisi araştırılmaktadır. Parkinson Hastalığı ve spastisite tedavisinde memantin etkili olduğuna dair klinik deliller vardır (100). Bundan başka, AIDS demansı, epilepsi, glokom, hepatik ensefalopati, multipl skleroz, inme, depresyon, anksiyete ve tardiv diskinezideki kullanımına yönelik klinik öncesi ve klinik çalışmalar yürütülmektedir (35,93).

M. Ehrlich ve ark. tarafından tavşanlarda yapılan bir çalışmada, deneysel olarak yapılmış aort kliplenmesi sonrası ortaya çıkan omurilik iskemisinde, NMDA reseptörlerinin nonkompetitif antagonisti olan memantin etkileri araştırılmıştır. Histolojik incelemede memantin uygulanan grupta sadece birkaç anormal motor nöron bulunmasına karşın, kontrol grubunda aşırı sayıda anormal motor nöron bulunmuştur. Motor potansiyellerin de plesebo gruba göre, memantin uygulanan tavşanlarda erkenden geriye döndüğü belirtilmiştir (102).

Von Euler ve ark.'nın sıçanlarda yaptığı başka bir araştırmada omurilik iskemisinin ortaya çıkışında hem nörolojik hem de morfolojik olarak memantin tedavisi edici bir etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (103).

Dong-In Sin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada memantin ve bir selektif siklooksijenaz-2 inhibitörü olan selekoksib sıçanlarda intraserebral hematoma modelinde beraber kullanılmıştır. Çalışma sonucunda memantin intraserebral hematoma yayılımını, selekoksibin ise hematoma etrafındaki enflamasyon gelişimini dolayısıyla da ödemi azalttığı gösterilmiştir (107).

William G. Ondo ve ark. tarafından Huntington koresinde memantin etkinliği üzerine yapılan klinik bir çalışmada memantin 20mg/gün dozunda kore tarafından uyarılan motor semptomları belirgin oranda azalttığı fakat hastaların bilişsel, davranışsal veya fonksiyonel belirtileri üzerine bir düzeltici etkisinin olmadığı gösterilmiştir (108).

Parsons ve ark tarafından 1999 yılında memantin hakkında yayınlanan genel bir değerlendirme makalesinde, 15 yıldır kullanımda olan memantin 200.000 üzerinde hastada kullanıldığı ve nadir görülen yan etkiler dışında (örneğin özellikle erkek hastalarda önerilen 5-20 mg'lık tedavi dozunun 3-4 hafta kadar üzerine çıkılması veya dopaminomimetik bir ajanla kombine olarak kullanılması durumunda ortaya çıkan psikomimetik etkiler) oldukça güvenilir bir ajan olduğu belirtilmiştir (109).

Kaspazlar, organizmada inaktif proenzimler olarak sentezlenirler (76,78,97). Yakın zaman önce yapılan çalışmalarda, kaspaz enzim sisteminin 3 farklı yol ile aktive edilebileceği ileri sürülmüştür. Birinci yolda; apoptotik sinyalin (örneğin; CD95 ya da TNF) kaspaz-8'i aktive etmesi, diğer kaspazların basamak şeklinde aktive edilmesiyle sonuçlanır (61,69,79). İkinci yol ise; mitokondri tarafından kontrol edilir ve mitokondride bulunan Apaf-1 ve kaspaz-9 bu yolda rol alır. Sitokrom-c'nin aktive etmesiyle Apaf-1 ile birlikte kofaktör nükleotid trifosfatlar (dATP ya da ATP) pro-kaspaz-9'a bağlanır ve onu aktive eder. Kaspaz-9, kaspaz-3'ü ve diğer kaspazları aktive eder (60,76,94). Üçüncü yol ise; endoplazmik retikulum apoptotik yoludur ve bu yolda kaspaz-12 görev alır (61,62,63).

Travmatik omurilik yaralanmasında rol oynadığı gösterilen kaspaz sistemin proteazları apoptotik hücre ölümünü önemli şekilde etkiler. Travmatik omurilik hasarının ardından devam eden apoptozis, hasar ile tetiklenen nörodejenerasyon ve fonksiyonel bozukluklarda kaspazların aktive etmesinin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kaspaz 3 aktive etmesi hem deneysel omurilik yaralanması oluşturulan modellerde hem de insanlarda oluşan omurilik travmalarından sonra gösterilmiştir. Kaspaz 8 ve 9'un sıçanlarda oluşturulan omurilik hasarının ardından beyaz ve gri maddede aktive ettikleri saptanmıştır (81).

Etkinleşme mekanizmalarına bağlı olarak, kaspazlar başlatıcılar ve efektörler olarak ikiye ayrılmışlardır. Kaspaz 8 ve 9 gibi başlatıcı (inisiyatör) kaspazlar dağılma sürecini başlatırlar ve yükseltilmiş bir kaspaz basamaklanmasına yol açan efektör kaspaz 3, 6 ve 7'yi etkinleştirirler. Etkinleşmiş efektör kaspazlar apoptotik ölümün, membran üzerinde küçük cepçiklerin oluşumu, kromatinin yoğunlaşması ve marjinasyonu, nükleer parçalanma, birçok nükleer ve sitozolik enzim aktivitesinde değişiklikler gibi morfolojik ve biyokimyasal gösterisine katkıda bulunurlar. Efektör kaspazların tersine, başlatıcı kaspazlar uzun bir N-terminal öncü grubu içerir, otoaktivasyondan geçmezler ve birbirlerini bağlamazlar. Etkinleşme için ölüm grubu içeren reseptörler (tip I apoptozis) ya da fonksiyonel apoptozomlar (tip II apoptozis) gibi ek proteinlere ihtiyaç duyarlar (99).

Pro inflamatuvar enzim fonksiyonlarından ötürü üçüncü bir memeli kaspaz grubu (Kaspaz -1, -4, -5, -11, -12 ve -13'ü içeren) tanımlandı. Apoptotik süreçlerin gerçekleştirilmesinde payı olan efektör kaspazlara karşılık, pro inflamatuvar kaspazlar diğer kaspazlar için zayıf substratlardır ve etkinleşme yolları tam olarak anlaşılammıştır (81).

Alexander Yakovlev ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada selektif veya pan-kaspaz inhibisyonunun nörolojik iyileşme üzerine olan etkileri değerlendirildi. Kaspaz 1, 2 ve 6'nın travmatik omurilik hasarından sonra etkinleşmediği görüldü. Bu nedenle sıçanlardaki örneklerinde ikincil hasar cevabı veya apoptozis için önemli birer arabulucu olmadıklarına karar verildi. Buna kıyasla, hasarın oluşmasından sonraki 1 ile 72 saat arasında, kaspaz 3, 8 ve 9'un nöronlarda, oligodendrositlerde ve bazı astrositlerde etkinleştiği saptandı. Bu kaspazlar ayrıca hasarın olduğu bölgenin ön veya arka uzak segmentlerinde beyaz ve gri maddede de etkinleşmişlerdir. Bu veri, bu bölgelerdeki apoptozise ait daha önceki incelemelerle de uyumludur ve travmatik omurilik hasarından sonra kaspaz 3, 8 ve 9'un, diğer kaspazlardan farklı olarak, lezyonun ve beyaz maddedeki hasarın genişlemesine katkıda buldukları olasılığını akla getirmiştir (99).

Genel kaspaz inhibitörlerinin son üyesi olan Q-VD-OPH; likid formda, DMSO ile çözüldürüldüğünde hücre geçirgenliği yüksek olan geri dönüşümsüz geniş spektrumlu bir kaspaz engelleyicidir. Caserta ve arkadaşlarına göre Q-VD-OPH apoptozisi 3 temel yoldan önlemektedir: 1) Mitokondrideki sitokrom-C nin salınmasıyla etkinleşen Kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün etkinleşmesini engelleyerek, 2) TNF alfa ve Fas/CD95'nin ölüm reseptörlerine bağlanarak etkinleşen kaspaz 8 ve kaspaz 10 etkinleşmesini engelleyerek, 3) Endoplasmik retikulum membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden kaspaz 12 nin etkinleşmesini engelleyerek (6).

Genel kaspaz inhibitörü olan Z-VAD-FMK, Boc-D-FMK ve Q-VD-OPH ile yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda Q-VD-OPH daha etkili bulunmuştur (6). Z-VAD-FMK ile yapılan bir çalışmada, bu maddenin düşük membran geçiş özelliğine bağlı olarak kan-beyin bariyerini veya nöron hücre zarını geçemediği, buna bağlı olarak da etkinleşmiş kaspazlara bağlanıp hücresel ölüm basamaklarını durdurma işlevini gerçekleştirmediği belirtilmiştir (77).

Q-VD-OPH'in etkili konsantrasyonu, Boc-D-FMK konsantrasyonundan on kat daha düşüktür. Artmış etkinliğe ek olarak yüksek konsantrasyonlarda bile hücrelerde toksik etkiye sahip değildir. Z-VAD-FMK, Boc-D-FMK 'nın toksik değerlerinin yüksek olması fluomethyl ketone grubuna (-FMK) bağlanmıştır. Kaspaz engelleyicilerin büyük bir dezavantajı *invivo* gelişen net toksisitedir ve bu durum kaspaz engelleyicilerin kullanımını zorlaştırmaktadır. Genel kaspaz inhibitörleri, FMK (fluomethyl ketone) grubu çıkarılıp OPH (Non toksic 2,6-difluorophenoxy) eklenmesiyle daha etkin ve daha az toksik hale getirilmiştir (6).

Sylvain Renolleu ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada 7 günlük sıçanlarında serebral iskemik hipoksi üzerine Q-VD-OPH'in etkisini incelemişlerdir. İskemi öncesi Q-VD-OPH verilen grupta kontrol grubuna oranla enfarkt volümünde %48 oranında azalma ve tunnel pozitif apoptotik hücre sayısında belirgin azalma tespit edilmiştir (110).

Ulrike Martin ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise Q-VD-OPH'in Coxackie-B3 Virüsü enfeksiyonlarında apoptozis üzerindeki etkinliği incelenmiş ve apoptotik hücre sayısını aalttığı tespit edilmiştir (111).

Melnikov ve ark.'nın akut böbrek yetmezliğinde apoptozis üzerinde Q-VD-OPH'in etkinliği üzerine yaptıkları bir çalışmada tedavi grubunda kontrol grubuna kıyasla kan üre azotu (BUN) ve serum kreatinin düzeylerinde %100'e varan bir azalma ve morfolojik akut tubuler nekrozda oldukça belirgin bir azalma sağladığı gösterilmiştir (112).

Q-VD-OPH toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda Melnikov ve ark. 120mg/kg dozunda, Yang ve ark. da 20mg/kg dozunda Q-VD-OPH kullanmış ve bu dozlarda bile hücreler üzerinde toksik etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (112).

Q-VD-OPH'in *invivo* özgülüğünü, klirensini ve toksisitesini tespit eden çalışmalar, bu yeni nesil O-fenoksi (OPH) grubu eklenmiş kaspaz inhibitörlerinin gelecek vaat eden yeni töröpatikler olarak potansiyel kullanımını belirleyecektir (6).

Akut omurilik travmalarının mekanizmasını ve fizyopatolojisini daha iyi anlamak ve tedavisini planlamak amacıyla çeşitli deneysel travma modelleri geliştirilmiştir. 19. yüzyılda omurilik yaralanmasının histopatolojik etkileri üzerine deneysel çalışmalar yapan Alfred

Reginald Allen deneysel omurilik yaralanması modellerinden biri olan ağırlık düşürme metodunu geliştirmiştir. Araştırmacı aynı zamanda omurilik yaralanmasının mekanizmaları hakkında modern temellerin atılmasını sağlamış ve ilk kez olarak ikincil hasar kavramını ileri sürmüştür (11,12).

Deneysel omurilik travma modellerinde omuriliğin tespitinde ve travma esnasında göstereceği esnekliğin derecesindeki farklılıklara bağlı olarak, temas yüzeyi alanının ve travma şiddetinin değişebileceği göz önüne alınmalıdır. Ağırlık düşürme modelinin avantajları kolay ve tekrarlanabilir olmasıdır. Ancak bu modelde travmanın sadece çarpma yerini ilgilendirmediği, şok dalgasının komşu segmentlere yayıldığı bilinmektedir. Modelin bu dezavantajı nedeniyle birçok araştırmacı farklı omurilik travma modelleri geliştirmiştir (3). Bizde çalışmamızda omurilik travması oluşturmak için, 1978 yılında Rivlin ve Tator tarafından tarif edilen, anevrizma klipi ile ekstradural kompresyon uygulanan, klip kompresyon yöntemini kullandık. Bu yöntem mekanik travma yanında vasküler etkilenme ile iskemiye de yol açar. Laminektomi sonrası omuriliğin lateralinden konulan anevrizma klipi belli bir süre omuriliği basıya uğratar. Önceden belirlenmiş şiddette yaralanma yaratılabilir. Klip kapanma gücü ve bası süresi değiştirilerek değişik şiddetlerde yaralanma oluşturulabilir. Bası çevresel olduğu için insanda olan travma tipine daha uygundur (2, 15).

Deney hayvanı olarak sıçan seçilmesinde etkili faktörler; omurilik kanlanması açısından sıçanın insana yakın benzerlikler göstermesi ve kolay bulunabilir olmasıdır (2).

Çalışmamızda, toksik etkilerinin az olması, tolarebilitesinin yüksek olması, tedavi doz aralığının geniş olması ve apoptoz yollarının üçünü de inhibe etmesi açısından kaspaz inhibitörü olarak Q-VD-OPH ile yine kan-beyin bariyeri için yüksek geçiş oranına sahip olması, klinikte uygulanması ve yan etkilerinin de az olması nedeniyle NMDA antagonisti olarak da memantin kullanmayı uygun bulduk.

Çalışmamızda 5. grubun (Q-VD-OPH ve memantin kombine grubu) 5. gün motor muayene bulguları, travma grupları ve memantin tedavi grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. 3. grup (Q-VD-OPH grubu) ile 5.grup motor muayene bulguları açısından kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmadı. 3. ve 4. gruplar arasında da istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmasada, 3. grubun 3. ve 5. gün motor muayene bulguları 4. gruba göre daha iyi sonuçlara sahipti. Eğik düzlem verileri değerlendirildiğinde Grup 3 ve 5'in 1, 3 ve 5. gündeki eğik düzlem bulguları, grup 1,2 ve 4'den istatistiksel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahipti. Grup 1,2 ve 4 arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Grup 3 ve 5 arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. İkincil hasarın göstergesi olarak histopatolojik bulgular nekroz, lenfosit ve PNL açısından

değerlendirildi. Preparatlardaki nekroz, PNL ve lenfosit oranlarının, 4. (memantin grubu) ve 5. grupta 1, 2 ve 3. gruplarla kıyaslandığında istatikselsel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahip olduğu saptandı. 4. ve 5. gruplar arasında istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı. 1,2 ve 3. gruplar kendi aralarında kıyaslandığında istatikselsel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. Preparatlardaki apoptoz oranlarının ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırılmasında 1, 2 ve 4. gruplar arasında fark saptanmadı. 3. ve 5. gruplar, 1, 2 ve 4. gruplarla kıyaslandığında istatikselsel olarak anlamlı derecede olumlu sonuçlara sahipti. 3. ve 5. gruplarda kendi aralarında kıyaslandığında istatikselsel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç olarak genel kaspaz inhibitörü olan Q-VD-OPH ve NMDA reseptör antagonisti olan memantin'in birlikte uygulandığı grupta nörolojik bulgularda istatikselsel olarak anlamlı düzelme görüldüğü, buna daha çok Q-VD-OPH'in katkısının olduğunu ve memantin'in de bu etkiyi potansiyelize ettiğini düşündük. Q-VD-OPH grubu ile Q-VD-OPH ve memantin'in birlikte uygulandığı grup arasında motor muayene bulguları açısından istatikselsel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlendi. Memantin'in tek başına kullanıldığında motor muayene bulguları üzerinde bir iyileşme sağlamadığı gözlemlendi. Eğik düzlem bulguları açısından da Q-VD-OPH grubunun ve Q-VD-OPH-memantin'in birlikte uygulandığı grubun diğer gruplarla kıyaslandığında istatikselsel olarak anlamlı derecede iyi sonuçlara sahip olduğu görüldü. Memantin'in tek başına kullanımının eğik düzlem bulguları üzerinde anlamlı bir düzelme sağlamadığı gözlemlendi. Histopatolojik bulgular açısından bakıldığında Q-VD-OPH'in apoptozisi önemli ölçüde önlediğini, memantin'in tek başına kullanımının apoptozisi önlemede etkili olmadığını gözlemledik. Nekroz ve inflamasyonun belirteçleri olan PNL ve lenfosit bulguları açısından kıyaslandığında, Q-VD-OPH'in tek başına kullanımının nekroz, PNL ve lenfosit oranlarını azaltmadığını, fakat memantin'in tek başına kullanımıyla bu oranlarda anlamlı derecede bir azalma olduğu saptandı.

Böylece genel kaspaz inhibitörü Q-VD-OPH'in motor muayene ve eğik düzlem bulgularında anlamlı bir iyileşme sağladığı, memantin'in ise motor muayene ve eğik düzlem bulgularında iyileşme sağlamadığı, Q-VD-OPH'in ve memantin'in birlikte uygulanmasının motor muayenedeki düzelmeyi istatikselsel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı gözlemlendi. Q-VD-OPH'in apoptozis oranlarını, memantin'in de nekroz oranlarını anlamlı derecede azalttığını, ikincil hasarın göstergesi olan apoptozis ve nekrozun, genel kaspaz inhibitörü Q-VD-OPH ve NMDA antagonisti memantin'in birlikte uygulanmasıyla önemli ölçüde azaltılabildiğini gözlemledik.

BÖLÜM VI

SONUÇ

Yaşargil FE 716 K anevrizma klipi ile oluşturulan omurilik yaralanmaları sonrası, denekler motor muayene ve eğik düzlem bulguları açısından değerlendirildi. Alınan omurilik örnekleride hematoksil-eosin ve TUNEL yöntemi ile boyanarak nekroz, PNL, lenfosit ve apoptozis bulguları için değerlendirildi. Genel kaspaz inhibitörü olan Q-VD-OPH'in ve NMDA reseptör antagonisti olan memantin'in ayrı ayrı ve birlikte kullanımının ikincil hasarı önlemedeki etkinliği araştırıldı.

Çalışmada;

- 1) Klip kompresyon yöntemi ile oluşturulan deneysel omurilik yaralanması modelinde nekrozun yanısıra apoptozisin varlığı,
- 2) Genel kaspaz inhibitörü Q-VD-OPH'in diğer gruplarla kıyaslandığında istatistiksel olarak olmasada nörolojik fonksiyonlarda anlamlı düzelme sağladığı, Q-VD-OPH ve memantin'in birlikte uygulanmasıyla bu düzelmenin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı
- 3) Memantin'in tek başına kullanıldığında nörolojik fonksiyonlarda düzelmeye yol açmadığı, Q-VD-OPH ile birlikte kullanıldığında nörolojik fonksiyonlardaki düzelmeyi potansiyelize ettiğini
- 4) Q-VD-OPH'in belirgin ölçüde apoptozisi engellediği fakat nekroz, PNL ve lenfosit oranlarına etki etmediği
- 5) Memantin'in nekroz, PNL ve lenfosit oranlarını anlamlı derecede azalttığı fakat apoptozisin engellenmesinde etkili olmadığı
- 6) Q-VD-OPH ve memantin'in birlikte kullanımının akut iltihabi cevap, nekroz ve apoptozis gelişimini diğer tedavi gruplarına göre belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir.

BÖLÜM VII**YARARLANILAN KAYNAKLAR**

- 1) Talat Kırış (1992): Deneysel omurilik yaralanmasında eksitatör aminoasit reseptör antagonisti MK-801'in lipid peroksidasyonuna etkileri/ *Uzmanlık Tezi*
- 2) Mustafa Bozboğa (1991): Deneysel akut medulla spinalis travmasında kronik alfa tokoferol kullanımının lipid peroksidasyonu üzerine etkisi/ *Uzmanlık Tezi*
- 3) Murat Döşoğlu (1992): Deneysel medulla spinalis travmasında deferoxamine'nin lipid peroksidasyonuna etkileri/ *Uzmanlık Tezi*
- 4) Jafar Hassanzadeh (1992): Deneysel omurilik yaralanmasında eksitatör aminoasit reseptör antagonisti dextromethorphan'ın lipid peroksidasyonuna etkileri/ *Uzmanlık Tezi*
- 5) Tevfik Gözüm (1985): Deneysel omurilik travmasında T:R:H (thyrotropin-releasing hormone) ve Deksametazon tedavileri/ *Uzmanlık Tezi*
- 6) T.M Caserta, A.N Smith, A.D. Gultice, M.A. Ready, T.L. Brown (2003): Q-VD-OPH, a broad spectrum caspase inhibitör with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis* 8: 345-352
- 7) Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, SümbüloğluG (2000): Traumatic spinal cord injuries in Turkey; a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord* 38: 697-701
- 8) Diana D. Cardenas, Jeanne M. Hoffman, Steven Kirsblum, William Mc Kinley (2004): Etiology and incidence of Rehospitalization after traumatic spinal cord injury; A Multicenter Analysis. *Arch Phys Med. Rehabil*; 85: 1757-63
- 9) Dincer F, Oflazer A, Beyazova M, Çeliker R, Basapze O, Altıoklar K. (1992) : Traumatic Spinal Cord İnjuries in Turkey. *Paraplegia*; 30: 641-6
- 10) Karamehmetoğlu SS, Nas K, Karacan I, Sara CAJ, Koyuncu H, Ataoğlu S, Erdoğan F, (1997): Traumatic spinal cord injuries in southeast. Turkey :an epidemiological study. *Spinal cord* ; 35: 531-3

- 11) Jason Lifshutz, Austin Colahan (2004): A brief History of therapy for traumatic spinal cord injury. *Neurosurg Focus* 15;16(1): E5
- 12) Naderi S, Tune V, Pait TG (2004): History of the spinal cord localization. *Neurosurg Focus* 15;16(1): E15
- 13) Arun Paul Amar, Michael L. Levy (1999): Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating Secondary Damage in Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurgery*, 44: 1027-1032
- 14) Charles H. Tator. Pathophysiology and Pathology of Spinal Cord Injury. Wilkins R.H, Rengachary S.S (ed) *Neurosurgery* 2 nd ed. Mc Graw Hill; 1996: 2847-2857
- 15) Christos Profyris, Surindor S. Cheemo, Da Wei Zang, Michael F. Azari (2004): Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of disease* 15: 415-436
- 16) Brian K Kwan, Wolfram Tetzlaff, Jonathan N. Grauer, John Benler, Alexander R. Vaccaro (2004): Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spinal Journal* 4: 451-464
- 17) Jike Lu, Ken Ashwell, Phil Waite (2000): Advances in secondary spinal cord injury. *Spine* 25: 1859-1866
- 18) Claire E. Hulsebosch (2002): Recent Advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in physiology education* 26: 4238-255
- 19) Hakan Özsüer, Aşkın Görgülü, Talat Kırış, Sabahattin Çobanoğlu (2005): The effects of memantine on lipid peroxidation following closed-head trauma in rats. *Neurosurg Rev* 28: 143-147
- 20) Ahn YH, Lee G, Kongs K. (2006): Molecular insights of the injured lesions of rat spinal cords, inflammation, apoptosis and cell survival. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 560-570

- 21) Guha A, Tator CH. (1988): Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J. Trauma* 28: 481-490
- 22) Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ (1993): Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: Acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 33: 285-292
- 23) Charles H. Tator, Izumi Koyanagi (1997): Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J. Neurosurg Volume* 86: 483-492
- 24) Rothman SM, Olney JW (1986): Glutamate and the pathophysiology of hypoxic ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111
- 25) Vemuganti L. Raghavendra Rao, Aclan Dogan, Kathryn G. Todd, Kellie K. Bowen, Robert J. Dempsey (2001): Neuroprotection by memantine, a non-competitive NMDA receptor antagonist after traumatic brain injury in rats. *Brain Research* 911: 96-100
- 26) Panter SS, Yum SW, Faden AJ (1990): Alteration in extracellular amino acids after traumatic spinal cord injury. *Ann Neurol* 27: 96-99
- 27) Linda R. Mills, Alexander A. Velumian, Sandeep K. Agrawal, Elizabeth Theriault, Michael G. Fehlings (2004): Confocal imaging of changes in glial calcium dynamics and homeostasis after mechanical injury in rat spinal cord white matter. *NeuroImage* 21: 1069-1082
- 28) Daniel J. Tomas, Sandeep K. Agrawal (2001): Role of Na⁺-Ca⁺⁺ exchanger after traumatic or hypoxic/ ischemic injury to spinal cord white matter. *Spine J.* 2(1): 35-40
- 29) Michael Tymianski, Charles H. Tator (1996): Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: A basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38: 1176-1195
- 30) Stys DK, Waxman SG, Davis PK (1990): Role of extracellular calcium in anoxic injury of mammalian central white matter. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4212-4216

- 31) Schanne FAX, Kane AB, Young AB, Farber JL (1979): Calcium dependence of toxic cell death; A final common pathway. *Science* 206: 700-702
- 32) Werth JL, Thayer SA (1994): Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 14: 348-356
- 33) Blaustein MP (1998): Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neuro Sci* 11: 438-443
- 34) Gunter TE, Pfeiffer DR (1990): Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258: 755-786
- 35) Rehncrona S, Mela L, Siesco BK (1979): Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia. *Stroke* 10: 437-446
- 36) Faden AI, Simon RP (1988): A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol* 23: 623-626
- 37) Sandeep K Agrawal, Michael G Fehlings (1996): Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *The Journal of Neuroscience* 17: 1055-1063
- 38) Talat Kırış, Murat Döşoglu, Nail İzgi (1999): The effect of the NMDA antagonist Dizolcilpine on lipid peroxidation in an experimental spinal cord trauma model in rat. *Med. Bul* 32:1
- 39) Mc Culloch J, Isersen LL (1991): Autoradiographic assesment of the effects of N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist in vivo. *Neurochem Res* 16: 951-963
- 40) Greenamyre JT, Porter RHP (1994): Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurolgy* 44: 7-13

- 41) Guo Ying Xu, Michael G Hughes, Zaiming Ye, Claire E Hulseboch, David J Mc Adoo (2004): Concentrations of glutamate released following spinal cord injury kill oligodendrocytes in the spinal cord. *Experimental Neurology* 187: 329-336
- 42) Charles D Mills, Kathia M Johnson, Claire E Hulsebosch (2002): Role of group II and Group III metabotropic glutamate receptors in spinal cord injury. *Experimental Neurology* 173: 153-167
- 43) Haghghi SS, Johnson GC, De Vergel CF, Vergel Rivas BJ (1996): Pretreatment with NMDA receptor antagonist MK-801 improves neurophysiological outcome after an acute spinal cord injury. *Neurol Res.* 18(6): 509-15.
- 44) Faden AI, Lamke M, Simon RP, Noble LJ (1988): N-Methyl-D-Aspartate antagonist MK-801 improves outcome following traumatic spinal cord injury in rats; Behavioral, anatomic and neurochemical studies. *J.Neurotrauma* 5: 33-45
- 45) David J Mc Adoo, Michael G Hughes, Linghui Nie, Bhavin Shah, Cannon Cliften, Steven Fullword, Claire E Hulsebosch (2005): The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage - glutamate release-damage-glutamate release. *Brain Research* 1038: 92-99
- 46) Yanase M, Sokou T, Fukuda T (1995): Role of N-Methyl-D-Aspartate receptor in acute spinal cord injury. *J. Neurosurg* 83: 884-888
- 47) Shuxin Li, Geoff AR. Mealing, Paul Monley, Peter K. Stys (1999): Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: Glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *J Neurosci.* 15;19(14): RC16.
- 48) Ahmet Çolak, Osman Say, Hafize Uzun, Özcan Aslan, Şeref Barut, Ahmet Belce, Aysenur Akyıldız, Mustafa Tasyürekli (2003): Neuroprotective effects of GKKI 52466 on experimental spinal cord injury in rats. *J. Neurosurg* (Spine 3) 98: 275-281

- 49) Shuxin Li, Peter K Stys (2000): Mechanism of ionotropic glutamate receptor-mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter. *The Journal of Neuroscience* 20:1190-1198
- 50) Louis P. Vera, Charles D. Mills, Zaiming Ye, Steven D. Fullwood, David J. Mc Adoo, Claire E. Hulsebosch, Karin N. Westlund (2002): Rapid changes in expression of glutamate transporters after spinal cord injury. *Brain Research* 927: 104-110
- 51) Allen S Mendir, Marc F Poitnos, Valina L Dowson (2000): NMDA but not non-NMDA excitotoxicity is mediated by poly (ADP-ribose) polymerase. *The Journal of Neuroscience* 20: 8005-8011
- 52) Stefanie Ortinau, Babo Laube, Herbert Zimmerman (2003): ATP inhibits NMDA receptors after heterologous expression and in cultured hippocampal neurons and attenuates NMDA-mediated neurotoxicity. *The Journal of Neuroscience* 23: 4996-5003
- 53) E. Park, Y.Liu, M.G. Fehling (2003): Changes in glial cell white matter AMPA receptor expression after spinal cord injury and relationship to apoptotic cell death. *Experimental Neurology* 182: 35-48
- 54) Margaret C. Cummings, Clay M Winterford, Neal I Wolker (1997): Apoptosis-Histological Section. *The American Journal Of surgical Pathology* 21(1): 88-101
- 55) David H.Kim, Alexander R. Vaccaro, Fraser C. Henderson, Edward C. Benzel. Neural injury at the molecular level. Edward C. Benzel (ed). *Spine Surgery*. 2nd ed.Mc Graw Hill; 2004: 100-107
- 56) Hirayoki Kato, Georgios K.Kanellopoulos, Saburou Matsuo, Yingi Wu, Dennis W. Choi(1997): Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Experimental neurology* 148: 464-474
- 57) Guido Majno, Isabella Jonis (1995): Apoptosis, oncosis and necrosis. *American Journal of Pathology* 146(1): 3-15

- 58) Yael Gaunieli, Yoav Sherman, Shmuel A. Ben-Sasson (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclea DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119(3): 493-501
- 59) Lou J, Lenke L G, Ludwing F J, O'Brien M F (1998): Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal dord injury. *Spinal Cord* 36: 683-690
- 60) Hu Ym, Benedict M A, Ding L Y (1999): Role of cytochrome-c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBOJ* 18: 3586-3595
- 61) Keane R W, Knaydieh S, Lotochi G, Bethea JR, Kro Jewski S, Reed J. C, Dietrich WD (2001): Apoptotic and antiapoptotic mechanism following spinal cord injury. *J. Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429
- 62) Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K (2000): Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 150: 731-740
- 63) Rao R V, Hermel E, Castro-Obregan S (2001): Coupling endoplasmic reticulum stres to the cell death program mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 869-874
- 64) Yakoulau AG, Faden AI (2001): Caspase dependent apoptotic pathways in CNS injury. *Mol Neurobiol.* 24: 131-144
- 65) Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS (1997): Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res.* 1;50: 798-808
- 66) Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT (1996): Apoptosis: Molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem.* 15;236(1): 1-26.
- 67) Peter ME, Heufelder AE, Hergartner MO (1997): Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA* 25: 12736-12737

- 68) Beattie MS, Faroogui AA, Bresnahan JC (2000): Review of current for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 17: 915-925
- 69) Yong C, Arnold PM, Zoubne MN, Citron BA, Festaff BW (1998): Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma* 15: 459-72
- 70) Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC (2002): Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137: 37-47
- 71) W Gomes-Leal, DJ Corkill, MA Freire, CW Picanço-Diniz, VH Perry (2004): Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration and pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental Neurology* 190: 456-467
- 72) Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivason A, Keane RW, Bethea J, Levi AD (1998): Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurgery* 89 :911-920
- 73) Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Mauters JN, Beattie MS (1997): Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3: 73-76
- 74) Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, Mc Donald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu YC, Choi DW (1997): Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 15: 5395-5406
- 75) Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, Citron BA, Watonabe I, Berman NE. Festoff (1998): Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma* 15: 459-472
- 76) Brigitte Petmann, Christopher E Henderson (1988): Neuronal cell death. *Neuron* 20: 633-647
- 77) Hiroshi Ozawa, Robert W Keane, Alexander E Moncillo, Paulo H Diaz, W Dalton Dietrich (2002): Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Experimental Neurology* 177: 306-313

- 78) Tagaki T, Takayasu M, Mizuno M, Yashimoto M, Yoshido J (2003): Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir* 43: 20-30
- 79) Li M, Ona V.O, Chen M, Kaul M, Tenneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander (2000): Functional role and therapeutic implications of caspase-1 and 3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99(2): 233-342
- 80) Kaptanoglu E, Caner H, Solaroglu I, Kilinç K (2005): Mexiletine treatment-induced inhibition of caspase-3 activation and improvement of behavioral recovery after spinal cord injury. *J. Neurosurg Spine* 3: 53-6
- 81) Knoblach SM, Huang X, Van Gelderen J, Cavla-Cerqueina D, Faden AI (2005): Selective caspase activation may contribute to neurological function after experimental spinal cord trauma. *J Neurosci Res* 1;80: 369-80
- 82) Yashino O, Matsuno H, Nakamuro H, Yudah K, Abe Y, Sawai T, Uzuki M, Yonehara S, Kimuro T (2004): The role of Fas-mediated apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Spine* 1;29: 1394-404
- 83) Şeref Barut, Yusuf Atilla Ünlü, Alper Karaoğlan, Matem Tunçdemir, Fatma Kaya Dağistanlı, Melek Öztürk, Ahmet Çolak (2005): The neuroprotective effects of Z-DEVD-fmk, a caspase-3 inhibitor, on traumatic spinal cord injury in rats. *Surgical Neurology* 64: 213-220
- 84) Christopher B. Mc Bride, Lowell T. Mc Phoil, Jacqueline L. Vanderkit, Wolfram Tetzloff, John D. Steeves (2003): Caspase inhibition attenuates transection-induced oligodendrocyte apoptosis in developing chick spinal cord. *Molecular and Cellular Neuroscience* 23: 383-397
- 85) Wilson S, Raghupathi R, Sootman KE, Mac Kinnon MA, Mc Intosh TK, Grohom DI (2004): Continued in situ DNA fragmentation of microglia/macrophages in white matter weeks and months after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 21(3): 239-50

- 86) Hommay Dubrahim, P.Boon Chock, Earl R.Stadtman (2002): Manganes (II) Induces Apopitotic Cell Death in NIH3T3 Cells via Caspase-12 dependent pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 277(23): 2135-2138
- 87) Michael S. Beattie (2004): Inflammation and apoptosis; linked theuropotic targets in spinal cord injury. *Trends in Molecular Medicine* 10(2): 581-585
- 88) Kroller SM, Seifried C (2000): Historical perspective history of spinal surgery. *Spine* 25: 2838-2843
- 89) Park CK, Nehis DG, Graham DI, Teasdale GM, Mc Culloch J (1988): The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 24(4): 543-51.
- 90) Mankates SG, Skiadas P (1999): Hippocrates. The father of spine surgery. *Spine* 24: 1381-1387
- 91) Kemp JA, Foster AJ, Wong EHF (1987): Non-competitive antagonists of excitatory aminoacid receptors. *Trends Neurosci* 10: 294-298
- 92) Nasr MS, Peruche B, Roberg C, Mennel HD, Kriegl Stein J (1990): Neuroprotective effect of memantine demonstrated in vivo and in vitro. *Eur J Pharmarol* 185: 19-24
- 93) Persons CG, Danyz W, Quack G (1999): Memantine is a clinically well tolerated N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) receptor antagonist a review a preclinical data. *Neuropharmacolgy* 38: 735-767
- 94) Hu YM, Benedict MA, Ding LY (1999): Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1 mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 18: 3586-3595
- 95) Newton K, Strosser A (1998): The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 8: 68-75

- 96) Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, Munnoy M, Tersler A, Saavedra RA (1999): DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *J Comp Neurol* 404: 159-171
- 97) Eldadah BA, Faden AI (2000): Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury. *J Neurotrauma* 17: 811-829
- 98) Kraus J, Xra J, Jewski S, Xra J, Jewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Reed JC (1999): Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5752-5757
- 99) Alexander G, Yakovlev, Alan I. Faden (2004): Mechanisms of Neuronal Cell Death: Implications for Development of Neuroprotective Treatment Strategies. *NeuroRx*. 2004 1(1): 5-16.
- 100) A. Görgülü, T. Kırış, S. Çobanoğlu, F. Ünal, N. İzgi, B. Yanık, M. Küçük (2000): Reduction of Edema and Infarction by Memantine and MK-801 After Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rat. *Acta Neurochir* 142: 1287-1292
- 101) Stuart A Lipton (2004): Paradigm shift in NMDA receptor antagonist drug development: Molecular mechanism of uncompetitive inhibition by memantine in the treatment of Alzheimer's disease and other neurologic disorders. *Journal of Alzheimer's Disease* 6: 61-74
- 102) Ehrlich M, Krolle E, Chiovica R, Bock P, Turkof E, Grabenwager M, Cortes-Zumelzu F, Kocher A, Pockberger H, Fang WC, Wolner E, Havel M (1999): *J. Thorac Cardiovasc Surg* 117: 285-91
- 103) Von Euler M, Li-Li M, Whit Temore S, Seiger A, Sundstrom E (1997): No protective effect of the NMDA antagonist memantine in experimental spinal cord injuries. *J Neurotrauma* 14: 53-61
- 104) Saden RJ, Walsh J, Middleton JW, Croven ML, Rutkowski SB, Yeo JD (2000): Causes of death after spinal cord injury. *Spinal Cord* 38: 604-10

- 105) Minoru Fujiki, Yoshie Furukawa, Hidenori Kobayashi, Tatsuya Abe, Keisuke Ishii, Susumu Uchida, Tohru Kamida (2005): Geranylgeranylacetone limits secondary injury, neuronal death and progressive necrosis and cavitation after spinal cord injury. *Brain Research* 1053: 175-184
- 106) Davies J Watkins (1983): Role of excitatory amino acid receptors in mono and polysynaptic excitation in the cat spinal cord. *Exp Brain Res* 49: 280-290
- 107) Sinn DI, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, Kim JM, Park DK, Kim M, Roh JK (2006): Combined neuroprotective effects of and memantine in experimental intracerebral hemorrhage. *Neurosci. Lett.* 16: 238-242
- 108) Ondo WG, Mejia NI, Hunter CB (2006): A pilot study of the clinical efficacy and safety of memantine for Huntington's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 12
- 109) Parsons CG, Danysz W, Quack G (1999): Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist a review of preclinical data. *Neuropharmacology.* 38: 735-67
- 110) Sylvain Renolleau, Sebastien Fau, Catherine Goyenvalle, Luc Marie Joly, David Chauvier, Etienne Jocotot, Jean Mariani, Christiane Charriaut-Marlangue (2007): Specific caspase inhibitor Q-VD-Oph prevents neonatal stroke in P7 rat: a role for gender. *Journal of Neurochemistry.* 100: 1062-1071
- 111) Ulrike Martin, Nadine Jarasch, Matthias Nestler, Alexander Rassmann, Thomas Munder, Simone Seitz, Roland Zell, Peter Wutzler, Andreas Henke (2006): Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. *Apoptosis* 12: 523-533
- 112) Vyacheslav Y. Melnikov, Sarah Faubel, Britta Siegmund, M. Scott Lucia, Danica Ljubanovic, and Charles L. Edelstein (2002): Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1- and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 110: 1083-1091

ÖZGEÇMİŞ

29 Temmuz 1971'de Amasya'nın Merzifon ilçesinde doğdum. İlkokulu İstanbul Bahçelievler Bağlar İlkokulunda, orta ve lise öğrenimimi ise Bahçelievler Kocasinan Lisesi'nde tamamladım. 1995 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Tıp Fakültesi mezuniyetimi takip eden 6 yıl boyunca Amasya ve Edirne illerinde pratisyen hekim olarak görev yaptım. Ocak 2002'de İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalında asistanlık eğitimime başladım. Evli ve bir kız çocuk babasıyım.