

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA NUMUNE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
1. BEYİN ve SİNİR CERRAHİ KLİNİĞİ

ŞEF: Op. Dr. Yamaç TAŞKIN

**DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD KONTÜZYON
YARALANMASINDA
AMİFOSTİNE’NİN NÖROPROTEKTİF ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı: Op. Dr.Mehmet Özerk OKUTAN

DR. ALİ GÜLER

ANKARA–2005

TEŞEKKÜR

Nöroşirürji eğitimimde büyük emeği olan, tecrübesi ile bize, kişiliğiyle ise herkese örnek olan, mesleki ve insan yaklaşımlarını örnek aldığım hocam Op. Dr.Yamaç Taşkın'a teşekkür ederim.

Paramedikal konulardaki engin görüşleri ile her an hayat dersleri alabildiğimiz, akademik başarı ve tecrübelerini bilimsel gelişimimizde tüm samimiyeti ile kullanan, iş ya da özel hayatımızdaki sıkıntılarda her zaman yanımızda olacağını ve sorunları çözeceğini bilmenin huzurunu bize veren Doç.Dr. Ethem Beşkonaklı'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım sırasında yakın desteğini gördüğüm ve bu çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde yardımlarını ve değerli zamanını esirgimeyen ve bir abi olarak gördüğüm Op. Dr.Mehmet Özerk Okutan'a teşekkür ederim.

İhtisasım sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalıştığımız her andan büyük zevk aldığım Doç.Dr. Erkan Kaptanoğlu, Op. Dr.Mutlu Kağan Tun ve Op. Dr.Ömer. Faruk Türkoğlu'na arkadaşça yaklaşım ve ilgileri için teşekkür ederim.

Kısa bir süre de olsa birlikte çalışma mutluluğuna eriştiğim, tez çalışmalarım sırasında yardımlarıyla yanımda olan Op. Dr.Beril Gök'e teşekkür ederim.

Asistanlığım süresince birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, güven ve dostluklarını esirgemeyen, çalıştığımız her andan büyük zevk aldığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Daha önce kliniğimizden ayrılan Op. Dr.Uğur Bostancı ve Op. Dr.İhsan Solaroğlu başta olmak üzere ve şu anda uzman olan ve üzerimde emekleri olan tüm çalışma arkadaşlarıma, dostluklarını hiçbir zaman eksik etmeyen 2.Nöroşirürji Kliniği tüm asistanlarına teşekkür ederim.

Birçok güzel şey paylaştığımız, bize hep arkadaş olan, şu anda aramızda olmayan ancak sevgisini ve hatıralarını hep kalbimde yaşatacağım Op. Dr.Bilal Hançer'e teşekkür ederim.

Servis Sorumlu Hemşiresi Hem. Göksel Yavuz başta olmak üzere tüm servis, ameliyathane, yoğunbakım hemşire ve personeline teşekkür ederim.

Tezimin yazım aşamasında yardımlarından dolayı canım arkadaşım Uzm. Dr.Sadettin Kılıçkap'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve eğitimim sırasında sabır ve desteğini daima hissettiğim sevgili eşim Tuba Güler'e; verdikleri emek ve sevgiyle beni bu günlere getiren aileme en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Ali GÜLER

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. TARİHÇE	3
3. GENEL BİLGİLER	7
4. SPİNAL KORD YARALANMALARINDA PRİMER MEKANİZMALAR	7
5. SPİNAL KORD YARALANMALARINDA SEKONDER MEKANİZMALAR	7
3.2.1 Sekonder Hasar Mekanizmasının Patofizyolojisi	9
3.2.1.1 Sistemik Etkiler	9
3.2.1.2 Lokal Mikrovasküler Yaralanma	9
3.2.1.3 Elektrolit Bozuklukları	10
3.2.1.4 Biyokimyasal Değişiklikler	11
3.2.1.4.1 Eksitotoksisite	11
3.2.1.4.2 Araşidonik Asit Salınımı ve Araşidonik Asit Metabolitlerinin Oluşumu	12
3.2.1.4.3 Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu	13
3.2.1.4.4 Lipid Peroksidasyon	17
3.2.1.4.5 Lipid Karboksilasyonu	21
3.2.1.4.6 Protein oksidasyonu	21
3.2.1.4.7 DNA Hasarı	22
3.2.1.4.8 Nötrofil Kaynaklı hücre Hasarı	22
3.2.1.5 İnflamasyon	23
3.2.1.6 Apoptoz	25

3.3 OMURİLİK YARALANMASINDA FARMAKOLOJİK TEDAVİ.....	27
3.3.1 Spinal kord Yaralanmasında Deneysel Tedaviler	27
3.3.1.1 Kalsiyum Kanal Blokörleri	27
3.3.1.2 Antioksidanlar ve Serbest Radikal Tutucular	28
3.3.1.3 Opioid Reseptör Antagonistleri.....	28
3.3.1.4 İnflamatuar/İmmün Cevapların Baskılanması	29
3.3.1.5 Tirotropin Salıcı Hormon ve TRH Analogları	29
3.3.1.6 GM-1 Gangliozyd.....	29
3.3.1.7 Monoamin Modülatörleri.....	30
3.3.1.8 Büyüme Faktörleri	30
3.3.1.9 Eksitator Aminoasit Reseptör Antagonistleri.....	30
3.3.2 METİL PREDNİSOLON.....	31
3.3.3 AMİFOSTİNE	34
3.3.3.1 Amifostine ve Nöroproteksiyon	36
4. AMAÇ.....	42
5. MATERYAL VE METOD	43
5.1 GRUPLAR.....	43
5.2 CERRAHİ İŞLEM	44
5.3 DOKULARIN HOMOJENİZASYONU	44
5.4 LİPİD PEROKSİDASYON AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ	45
5.5 ELEKTRON MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME	45
5.6 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	46
6. BULGULAR.....	47
7. TARTIŞMA.....	53
8. SONUÇ	58
9. REFERANSLAR	59

1. GİRİŞ

‘Boyun omurlarında kayma olan bir adamı muayene ettiğinde kolları ve bacaklarını hareket ettiremediğini görürsün. Ereksiyon halindeki penisinden idrar damlamaktadır ve adam bunun farkında değildir. Böyle bir adamı muayene ettikten sonra şunu demek zorundasın: Tedavisi olmayan bir hastalık.’

Edwin Smith Surgical Papyrus(M.Ö.500)¹²⁴

(1930’da Breasted tarafından tercüme edilmiştir)

Edwin Smith Surgical Papyrus’un yazıldığı dönemin üzerinden yaklaşık 2500 yıl geçmesine rağmen, spinal kord yaralanmasına bağlı oluşan tam hasarı onaracak bir tedavi seçeneği halen geliştirilememiştir^{124,125}. Bu hastaların yaşam boyu süren tedavi ve bakım masrafları, işgücü ve gelir kayıpları ile yaşadıkları sosyal ve psikolojik problemler göz önüne getirildiğinde hastayı, ailesini ve ülke ekonomisini etkileyen ciddi bir sağlık problemi ile karşılaşıyoruz¹²⁵. Hastaların %61’inin 16-30 yaşları arasında olması, problemin ciddiyetini daha da arttırmaktadır¹²⁴.

Erişkin merkezi sinir sisteminin (MSS) yaralanmadan sonra iyileşememesi, hastayı ve içinde bulunduğu toplumu fiziksel, sosyal, ekonomik ve psikolojik olarak etkileyen önemli bir klinik sorundur. Spinal kord yaralanması Kuzey Amerika’da yılda yaklaşık 13.000 kişiyi etkilemekte ve yüksek oranlarda mortalite ve morbidite ile sonuçlanabilmektedir. Spinal kord yaralanmalı hastaların yaklaşık %50’sinde komplet Spinal kord hasarı, %40’ında ise morbidite görülebilmektedir. Komplet hasarın %54’ü kuadripleji, %46’sı parapleji şeklindedir¹²⁴. Hayatta kalanların hastanede kalış süreleri ve rehabilitasyonları uzun süreli ve tekrarlayıcıdır; tedavi sonrası hayat kalitesi, sosyal ve ekonomik hayata dönüş düşük sınırlardadır. Insurance Institute for Highway Safety’nin yaptığı araştırmalara göre, otomobil kazası ile ilişkili spinal kord yaralanması olan bir hastanın 1984 yılı itibariyle ülke ekonomisine olan yıllık maliyeti 400.000 A.B.D. dolarıdır¹¹⁶. Son yüzyılda ulaşım araçlarının gelişimiyle kazaların artması,

silah teknolojisinin gelişimiyle savaşların daha şiddetli olması Spinal kord yaralanması insidensinin artmasına sebep olmuştur. Ayrıca spor yaralanmaları, düşmeler, iş kazaları ve yaralanma bölgesinden hastaneye transport mortalite ve morbiditede önemli rol oynamaktadır. Travmatik spinal kord yaralanmalarının en yaygın nedenleri sıklık sırasına göre; motorlu araç kazaları (yaklaşık %50), düşmeler, ateşli silahlar veya kesici-delici aletlerle oluşmuş penetran yaralanmalar ve spor kazalarıdır. En sık servikal bölge ve dorsolomber birleşim bölgesindeki spinal kord etkilenir^{116, 124}.

İlk yardım yöntemlerinin gelişmesi, görüntüleme yöntemlerinin ilerlemesi, omurga cerrahisindeki iyileşmeler spinal kord yaralanması olan hastaların daha iyi prognoza sahip olmasını sağlamıştır. Ancak nörolojik iyileşmeyle ilgili ciddi gelişmeler sağlanamamıştır. Nöronal dejenerasyon ve nöronların yaşamlarını sürdürme mekanizmalarını, periferik sinir sisteminde (PSS) spontan aksonal rejenerasyon varken bunun MSS’de olmamasının mekanizmalarını anlamak amacıyla pekçok araştırma yapılmıştır.

Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, posttravmatik doku hasarının çoğunun ve oluşan nörolojik bozuklukların sekonder reaktif olaylara bağlı olduğunu ortaya koymuştur^{62, 64, 65}. Sekonder mekanizma fikri ilk kez 1911’de Allen tarafından ortaya atılmıştır. Allen, travma sonrası oluşan hemorajik nekrotik materyalin sekonder zedelenmeye neden olan zararlı elemanlar ihtiva ettiği ve bu materyalin ortamdan uzaklaştırılmasıyla nörolojik düzelme olabileceği sonucuna varmıştır⁶¹.

İlk hasar, dakikalar içinde oluşan ve günler ya da haftalar süren bir moleküler ve hücresel değişimler kaskadını tetikler. Hasarlı nöronların yaşamlarına devam etmeleri, aksonların uygun hedeflere uzanması ve sonuçta fonksiyonel sinapsların oluşması rejenerasyonda asıl basamaklardır. Halen ağır Spinal kord yaralanmasından sonra klinik olarak düzelme olmamasına rağmen, yapılan çeşitli hayvan deneylerinden olumlu sonuçlar alınmaya başlanmış olması çalışmaların artarak devam etmesi yönünde cesaretlendirici olmaktadır.

2. TARİHÇE

Spinal kord yaralanması yüzyıllardır bilinen patolojik bir süreçtir. Spinal kord yaralanmalarıyla ilgili bilinen ilk yazılı eser 4630 yıllık Edwin Smith Papirüsü'dür (M.Ö. 500)^{50, 124}. İmhotep (MÖ 2686–2613), bu papirüsde sözü edilen ilk cerrahdır. İmhotep, bazıları omurga ile ilgili 48 kemiksel lezyonu anlatarak, ligaman hasarını, vertebral subluksasyon ve dislokasyonu tanımlamış, üst ve alt servikal vertebra yaralanmalarında kuadripleji ve parapleji olacağını belirtmiştir⁵⁰. Mevcut kayıtlar MÖ. 400 yıllarında Hipokrat'ın, bal, eşek sütü ve beyaz şaraptan oluşan yüksek hacimli sıvı tedavisi önerdiğini göstermektedir. Hipokrat kırık ve dislokasyonları redükte etmek için kendine özgü bir traksiyon cihazı imal etmiştir ve paraplejiyi tarif etmiştir. MÖ 150 yıllarında Galen, gladyatörlerin resmi hekimi olduğu için birçok anatomik ve nörofizyolojik çalışma yapma fırsatı bulmuş ve spinal kordda uzunlamasına yapılan kesilerin fonksiyon değişikliği yapmazken, enine kesilerin fonksiyon kaybına neden olduğunu göstermiştir⁴⁷. 7. yüzyılda Aegina'lı Paulus omuriliğe bası yapan kırıkların tedavisinde ilk defa laminektomi yapan hekimdir⁵⁰.

Vertebral kolon ve spinal kord yaralanmaları tarih boyunca ilgi çekici bir konu olmakla birlikte, ilk fizyopatolojik çalışma ancak 1890 yılında Schamus tarafından yapılabilmektedir¹¹⁷. Schamus, tahtalardan hazırladığı bir düzeneği kullanarak tavşanların sırtına travma uygulamış; travmadan sonra spinal kord içinde dejenerasyon ve kavitasyonların oluştuğunu gözlemiştir¹¹⁷. 1897'de Lundberg¹¹⁷, kobay kordunda kontüzyonu takiben anterolateral beyaz cevher dejenerasyonunun geliştiğini bildirmiştir. 19. yüzyılda spinal kord yaralanmasının mekanizmaları hakkında modern temeller atılmaya başlanmış ve takiben tedavi metodları geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu dönemde, insan spinal kord zedelenmelerini taklit eden deneysel akut spinal kord travma modelleri geliştirilmiştir. 1911 yılında, Alfred Reginald ALLEN tarafından hala da en çok kullanılan modellerden birisi olan ağırlık düşürme metodu geliştirilmiştir⁶¹. Bu model duramateri açılmamış spinal kord üzerine değişik ağırlıkların düşürülmesi ve takiben, ağırlıkların hemen uzaklaştırılmasını temel alan çarpma modeline dayanır. Allen köpeklerde torasik laminektomi yaptıktan sonra, hayvanların durasının yüzeyine dik açıyla bir tüp yerleştirmiş, bu tüp aracılığı ile spinal kordun üzerine farklı miktarlarda

ağırlıklar düşürmüş, böylelikle farklı şiddette travmalar oluşturmuştur. Ağırlık düşürme modeli olarak bilinen bu modelde travmanın şiddeti; ağırlık ile yüksekliğin çarpımıdır; şiddetin değeri ise gr-cm'dir. Allen, köpekte 345 gr-cm şiddetindeki travmanın orta şiddette yaralanmaya, 420 gr-cm'nin spastik parapareziye, 450 gr-cm'nin de kalıcı paraplejiye yol açtığını tespit etmiştir¹⁰⁹. Bugüne kadar birçok araştırmacı tarafından kullanılan halen de yaygın olarak kullanılmakta olan bu modelin en büyük dezavantajı, posterior kord kompresyonu oluşturmasıdır; oysa insanlarda anterior kord kompresyonu yaygındır. Buna karşın bu model, insanlardaki spinal kord yaralanmasının biyomekaniğini çok iyi taklit eder. Bu durum özellikle lezyonun gross histolojik görünümünde çok belirgindir^{1,114,117,122,124}. Allen'in ağırlık düşürme modelinden başka birçok deneysel spinal kord travma modeli tanımlanmıştır (**Tablo 1**)¹²⁵. Bunlardan en sıklıkla, travmatik yaralanma modelleri (özellikle akut kinetik kompresyon, akut statik kompresyon ve çarpma) kullanılmaktadır. Kinetik kompresyon 1 saniyeden daha kısa bir sürede, statik kompresyon ise 1 saniyeden daha uzun bir sürede gerçekleştirilen spinal kord kompresyonudur. Tamamen farklı bir model olan fotokimyasal modelde ise, spinal kord vasküler endotelinde fotokimyasal hasar oluşturulur; buna bağlı olarak sırasıyla tromboz, iskemi ve vazojenik ödem meydana gelir. Bu modelin en önemli avantajı laminektomi gerektirmemesidir^{124,125}.

Tablo 1: Deneysel spinal kord yaralanma modelleri¹²⁵

A. Travmatik yaralanma

- 1.Akut kinetik kompresyon: Kaf, klip, balon kompresyon, vertebral dislokasyon, impaktör
- 2.Akut statik kompresyon: Ağırlık uygulama
- 3.Çarpma veya ağırlık düşürme
- 4.Akselerasyon-deselerasyon
- 5.Distraksiyon
- 6.Transseksiyon: Parsiyel veya komplet

B. Non travmatik yaralanma

- 1.İskemi: Aort oklüzyunu, selektif arteriyel veya venöz oklüzyon
- 2.Tümör kompresyonu: Ekstradural
- 3.Kimyasal veya fotokimyasal

Deneyssel spinal kord yaralanması oluşturulan hayvanlarda, iyileşmenin takibi amacıyla birçok parametre geliştirilmiştir (**Tablo 2**). Bu parametrelerden biri olan Tarlov sistemi, klinik nörolojik muayenenin derecelendirilmesi esasına dayanan, subjektif bir yöntemdir. 1977 yılında Rivlin ve arkadaşları¹²³ tarafından geliştirilen ve objektif bir test olan Inclined Plane(eğik düzlem) 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^{123, 125}.

Travmanın şiddeti ve oluş şekline bağlı olarak ortaya çıkan spinal kord yaralanmasına *primer yaralanma* denir. Primer yaralanmadan sonraki saatler ve günler içerisinde gelişen bir dizi fizyopatolojik sürece bağlı olarak ortaya çıkan spinal kord yaralanmasına da *sekonder yaralanma* denir¹¹⁰. Allen ile başlayan, sekonder mekanizma kavramı bugün de hala incelenmekte ve etkili medikal tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

Tablo2: Deneyssel spinal kord yaralanmasında takip parametreleri¹²⁵

1. Klinik muayene
 - a. Subjektif: Tarlov motor skalası gibi
 - b. Objektif: Inclined Plane gibi
2. Histolojik muayene
 - a. Subjektif
 - b. Objektif: Akson sayımı gibi
3. Görüntüleme: CT, MRI gibi
4. Anjiyografik değerlendirme
5. Spinal kord kan akımı ölçümü
6. Aksonal tarayıcılar ile değerlendirme
7. Biyokimyasal ölçümlerle değerlendirme
8. Nörofizyolojik değerlendirme: Uyarılmış potansiyeller gibi.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. OMURİLİK YARALANMALARINDA PRİMER MEKANİZMALAR

Birçok travma spinal kord yaralanmasına neden olabilir. Travma, omuriliğin kendisini veya etrafındaki vertebral kolonu etkileyebilir. Hasarın boyutu, çeşitli biyomekanik faktörlere dayanır. Fleksiyon, ekstansiyon, dislokasyon veya rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetlerin hepsi, nöral elemanların kendisinde veya spinal kord damarlarında gerilme veya yırtılmaya sebep olur. Diğer olası mekanik etkiler, kemik kısımlardan, ligamanlardan veya spinal kanal içindeki hematomlardan kaynaklanan kompresyonu içermektedir. Bu kuvvetler, sadece yaralanma esnasında akut olarak değil; aynı zamanda kalıcı deformiteye sekonder, kronik olarak da omuriliği tahrip edebilirler. Mekanik instabilite, kompresif veya distraktif ek kuvvetler yükleyen posttravmatik kifoz gibi daha ileri yapısal deformasyonlara götürebilir ve nörolojik defisitte daha fazla kötüleşmeye neden olabilir. Yaralanmanın yaygınlığı ayrıca kuvvet uygulanan düzeyde spinal kanalın göreceli boyutlarına da dayanmaktadır. Öyle ki, geniş kanallar herhangi bir mekanik strese bir tampon sağlayabilse de, dar kanallarda böyle bir rezerv yoktur. Konus medullarisle ilişkisine göre yaralanmanın anatomik yerleşimi de kısmen prognostik öneme sahip gibi görünmektedir. Kauda ekuina yaralanmaları, omuriliğin kendisine göre daha iyi bir iyileşme prognozuna sahiptir, zira alt motor nöronlar travmaya daha dirençlidirler^{62,64,65}.

3.2. OMURİLİK YARALANMALARINDA SEKONDER MEKANİZMALAR

Allen 1911’de, kısa süreli spinal kord travmasına maruz kalan hayvanlarda ilerleyici klinikle birlikte ilerleyici doku hasarı olduğunu bildirmiştir⁶¹. Bu durumun açıklanması için, çeşitli patofizyolojik mekanizmalar öne sürülerek ikincil hasar kavramı gelişmiştir. Spinal kord yaralanması sonrasında, spinal kordda hemoraji, ödem, demiyelinizasyon, aksonal ve nöronal nekroz ile kavite oluşumu ve infarkt ile sonlanan bir seri patolojik değişiklikler oluşur. Bu patolojik durum “**santral hemorajik nekroz**” olarak tanımlanır⁶¹.

1978’de Nemecek, ışık mikroskopunda yaralanmış dokudaki intravasküler trombusları göstermiş ve bu ciddi nekrozu “**otodestruksiyon**” olarak tanımlamıştır ⁵².

Spinal kord yaralanmalarında sekonder hasar mekanizmaları birbiriyle ilişkili ve tetikleyen dört ana teoride toplanmıştır:

1. **Serbest Oksijen Radikalleri Teorisi:** İskemik dokuda fazla miktarda biriken radikaller ve onların ürünleri doku hasarının ilerlemesine neden olurlar.
2. **Kalsiyum Teorisi:** Serbest kalsiyum iyonlarının nörotransmitter kanallardan fazla miktarda geçişi sonucu doku yıkım enzimleri olan fosfolipaz, proteaz ve fosfatazin aktive olmaları doku harabiyetine neden olur.
3. **Opiat Reseptör Teorisi:** Naloxone gibi opiat reseptör blokörleri nörolojik iyileşmeyi hızlandırır.
4. **Enflamasyon Teorisi:** Lipid enflamasyon mediatörleri ve diğer sitokinler lezyon sahasında birikirler ve takiben makrofaj ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonuna neden olurlar.

Bu teoriler baz alınarak spinal kord yaralanmalarının medikal tedavisinde nöroprotektör etkisi olduğu düşünülen pekçok madde denenmiştir. Opiat reseptör antagonistleri, steroidler (Metilprednizolon), antioksidan maddeler ve serbest radikal tutucular, gangliozidler, tirotropin salıcı hormon ve analogları, araşidonik asit modülatörleri, glutamat reseptör blokerleri, monoamin modülatörleri, kalsiyum kanal antagonistleri, nonsteroidal antiinflamatuvarlar, immün supresifler, büyüme faktörleri, serotonin reseptör blokerleri ve sodyum kanal blokerleri bu amaçla kullanılmışlardır. Bunlar arasından sadece metilprednizolon klinik uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır ^{25,36,37,39,45}.

3.2.1 Sekonder Hasar Mekanizmasının Patofizyolojisi

3.2.1.1 Sistemik Etkiler

Spinal kord yaralanmasının şiddeti ve seviyesi, spinal kord kanlanmasını etkileyen

lokal travmanın yanında, oluşan nörojenik şokun ağırlığıyla da yakın ilişkilidir. Nörojenik şok, sempatik tonus azalması, vagusun anormal kardiyak etkisi ve bradikardi gelişmesi sebebi ile ortaya çıkar. Servikal düzeydeki bir spinal kord yaralanması ciddi hipotansiyon ve bradikardi yapabilir. Periferik rezistans ve kardiyak output azalırken tüm hemodinamik dengeler bozulur³⁰.

3.2.1.2. Lokal Mikrovasküler Yaralanma

İnsan spinal kord yaralanmalarında ve deneysel modellerde, spinal kord hasarının en önemli sebeplerinden birisi posttravmatik iskemidir. Posttravmatik spinal kord iskemisi travma şiddeti ile lineer korelasyon göstermektedir. Oluşan patolojilerin hepsi, azalmış doku perfüzyonu ve enerji azalmasından kaynaklanmaktadır. Spinal kord yaralanmalarında en sık görülen bulgu özellikle gri cevher ve omuriliğin santralindeki hemorajidir^{4, 5}. Mekanik darbenin ilk etkisi ile kapiller, venüller ve bazı arteriollerde yırtılmalar olur. Deneysel çalışmalarda anterior spinal arter ve anterior sulkal arterin akımının mekanik travma sonrasında da devam ettiği görülmüştür⁵⁶. Ancak omuriliğin santral kısmının kanlanması büyük kısmını sağlayan anterior sulkal arterlerde vazospazm oluştuğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur^{4,45}. Yine angiografik çalışmalarda, büyük arteriol ve arterlerin de etkilenmediği gösterilmiştir^{44,56}. Mikrosirkülasyon bozukluğu sadece yaralanma bölgesinde kalmamakta rostral ve kaudal olarak da ilerlemektedir. Mikrosirkülasyonun bozulmasına, direkt mekanik etkiye bağlı vazospazmın yanında, glutamat, prostaglandinler, katekolaminler gibi travmaya sekonder salgılanan biyokimyasal ajanlarla oluşan vazospazm da sebep olmaktadır⁶⁴. Yine kan ve kan ürünlerinin de direkt etki ile vazospazmı artırdığı bilinmektedir. Bu olay, kan yıkım ürünleri ile karşılaşan damar duvarındaki değişiklikler ile hemoglobinin yıkılarak methemoglobin oluşma sürecinde ortaya çıkan süperoksit radikallerine bağlanmıştır²¹. İntravasküler tromboz ile vazospazm ve sonucunda oluşan iskemiden Tromboksan A₂ sorumlu bulunmuştur. Araştırmacılar, spinal kord yaralanması sonrası spinal kord kan akımı

otoregülasyon mekanizmalarının bozulduğunu bildirmişlerdir. Normalde spinal kord kan akımı, sistemik kan basıncı değişikliklerinden etkilenmez. Otoregülasyonun bozulması spinal kord iskemisini artırır. Spinal kord yaralanması sonrası, otoregülasyon bozukluğu sebebi ile hiperemiler ve sekonder hemorajiler oluşabilir ⁶¹. Oluşan bu reperfüzyon, serbest radikal ve diğer toksik maddelerin oluşumunu artırarak, doku hasarını fazlalaştırabilmektedir ⁶¹.

3.2.1.3. Elektrolit Bozuklukları

Spinal kord yaralanmasının ardından hücre içi ve dışı kompartmanlar arasında ciddi elektrolit değişiklikleri olmaktadır. Kalsiyumun hücre içi artışı özellikle iskemi ve travmada daha fazla olmak üzere, tüm nöral yaralanmalarda başrol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum girişi merkezi sinir sisteminde **“toksik hücre ölümünün son ortak yolu”** olarak isimlendirilmektedir ⁸. Kalsiyum iyon konsantrasyonu ekstrasellüler aralıkta hücre içine göre 1000 kat daha fazladır. Spinal kord yaralanmasında, bu büyük gradient farkı ile hücre içine Ca^{+2} iyon girişi olur. Kalsiyumun travma sonrası hücre içine girişi 3 yolla olmaktadır:

- 1) Hasar görmüş olan hücre membranından,
- 2) Voltaja duyarlı kalsiyum kanallarından,
- 3) Glutamat ile aktive olan kalsiyum kanallarından.

Kalsiyumun hücre içine girmesi nörotoksisiteyi tetikler. Ca^{+2} iyonları hücre içinde fosfolipazları, proteazları ve fosfatazları aktifleştirerek hücre hasarının ilerlemesine neden olur ⁸.

Hücre içine giren kalsiyum, proteinkinaz C enzimini aktive ederek nöroflaman ve mikrotübül parçalanmasına yol açar. Fosfolipaz C enzimini aktive ederek hücre membranını oluşturan yağ asitlerini yıkar. Ayrıca yaralı mikrosirkülasyonda düz kas kasılmasına sebep olarak vazospazma ve dolayısıyla iskemiye neden olmaktadır ⁹. Benzer biçimde, araşidonik asit metabolizmasını başlatmakta ve siklooksijenaz yolunun diğer ürünleri olan serbest radikal üretimine de katkıda bulunmaktadır. Serbest radikallerin etkisiyle de araşidonik asit

metabolizması, hücre yıkımını ve iskemiye arttıran prostanoit üretiminin artışıyla sonuçlanmaktadır ⁴⁶.

Spinal kord yaralanmasından sonra meydana gelen miyelin hasarı ile miyelin kılıfı tarafından sarılmış olan hızlı K^+ kanallarının aktivitesi artar ve membran potansiyeli K^+ denge potansiyeline yaklaşır. Sonuçta aksonal ileti bloğu oluşur ⁵¹.

Beyaz cevher yaralanması sonucu oluşan anoksi, ATP ve membran depolarizasyonunun kaybına sebep olarak Na^+ kanallarından hücre içine Na^+ akışını sağlar. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonundaki bu artış, membran depolarizasyonu ile birlikte olunca, $Na^+ - Ca^{+2}$ değiştiricinin ters çalışmasına sebep olur. Bu da hücre içine zararlı miktarda Ca^{+2} girişini sağlar ³⁷.

3.2.1.4. Biyokimyasal Değişiklikler

3.2.1.4.1 Eksitotoksisite

Spinal kord yaralanmasıyla oluşan iskemi, eksitator aminoasitlerden (EAA) olan glutamat ve aspartatın artarak “**eksitotoksisite**” mekanizmasının aktive olmasına neden olur. Her iki aminoasit de spinal kord ve beyinde düzensiz dağılım gösterirler. Glutamat spinal kordda özellikle arka köklerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Glutamatın duysal iletimin sağlanmasında, ayrıca motor aktivite ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol aldığı düşünülmektedir. Aspartatın da spinal kordda eksitator ara nöronlarda iletilmesi, motor ve spinal reflekslerin düzenlenmesinde rol alması olasıdır ¹⁷.

İskemi, adenozin 5- fosfat azalmasına neden olarak, hücre homeostazını sağlayan Na-K pompası benzeri enerji bağımlı mekanizmaların çalışmalarını engeller. Ekstrasellüler ve intrasellüler alanlardaki iyonik kompozisyon değişiklikleri, membran polarizasyonunu değiştirerek, sinaptik keselerden EAA'ların salınmasına neden olur. EAA salınımı, nöron ve glial hücrelerin enerji bağımlı olan geri-alım mekanizmasının da çalışmaması nedeniyle dengelenemez ¹⁷.

Yapılan çalışmalar EAA'in neden olduğu geç doku hasarında glutamat reseptörlerinin önemini vurgulamışlardır¹⁸. Son yıllarda glutamat reseptörleri “iyonotropik” ve “metabotropik” olarak iki ana grupta toplanmaktadır.

İyonotropik reseptörler farmakolojik özelliklerine göre, N-metil-d-aspartat (NMDA), α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazola-propionik asit (AMPA) ve kainat reseptörleri olarak gruplara ayrılırlar. Metabotropik reseptörler ise guanozin-5-trifosfat-bağlayıcı proteinlerini ya da siklik nukleotid benzeri intraselüler sekonder mesajcılar bağlantısıyla transmembran proteinlerini etkileyen reseptörler olarak ayrılmaktadırlar. Kafa travmasında en güçlü eksitotoksik etki NMDA reseptörleri vasıtasıyla olurken, travmatik spinal kord yaralanmasında AMPA ve kainat gibi non-NMDA reseptörleri üzerinden olmaktadır⁵⁴. AMPA reseptörlerinin aktive olması ağırlıklı olarak sodyumun ve eşlik eden kalsiyumun hücre içine girişine neden olur. AMPA reseptörlerinin aktivasyonu elektrofizyolojik olarak, NMDA reseptörlerinin de aktivasyonunu sağlar. NMDA reseptörlerinin aktivasyonu hücre içi kalsiyum birikimi ile sonuçlanır. Glutamat eş zamanlı olarak metabotropik reseptörleri de etkileyerek, inozitol fosfolipidlerin metabolize olmasına sebep olur. Ayrıca hücre içi kalsiyum depolarının serbest kalmasına ve hücre duvarı, mitokondri ya da endoplazmik retikulum da bulunan kalsiyum pompalarının inaktivasyonuna da sebep olarak daha sonra glutamat düzeyleri normale dönse bile, hücre içi kalsiyum miktarı irreversibl olarak yükselir. Böylece hücre içi kalsiyum artışı, kalsiyum bağımlı-proteaz ve lipazların aktive olması ve hücre iskeletinin yıkımına ve hücre membranının bozulmasına neden olur^{2,18,46}.

3.2.1.4.2. Araşidonik Asit ve Metabolizması

Travmanın direkt etkisi ile ya da kalsiyumun anormal hareketi, membran fosfolipidlerinden, fosfolipaz aktivitesi ile araşidonik asit salınımını artırmakta; o da siklooksijenaz tarafından hızla metabolize edilerek, prostanoidler ve prostasiklin haline dönüştürülmektedir.

Prostaglandin A₂ güçlü bir vazokonstriktör maddedir. Tromboksan benzeri

prostanoidler, trombositlerin endotele yapışmasını artırırken, intravasküler trombosit agregasyonuna, mikrovasküler tromboembolilere ve vazokonstriksiyona neden olur. Prostaglandin ise tam tersi etki göstermektedir. Ancak yapımı siklooksigenaz yolunun ürünlerinden olan serbest radikaller tarafından selektif olarak engellenmektedir. Bu yüzden ortamda vazospazm ve iskemi daha da ilerleyebilmektedir.

3.2.1.4.3. Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu

Serbest radikal, dış yörüngesinde tek sayıda, yani serbest elektron bulunan atom ya da molekül anlamına gelmektedir ⁴². Bu tek elektron, çiftlenme eğiliminde olduğu için ileri derecede reaktiftir ve canlı hücrede bulunan tüm moleküllerle reaksiyona girebilir. İnsan vücudunda pekçok serbest radikalın varlığı gösterilmekle birlikte, en yaygın olanı oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Günümüzde, serbest oksijen radikalleri (SOR) yerine daha kapsamlı olarak, reaktif oksijen türevleri (ROT) tanımı kullanılmaktadır.

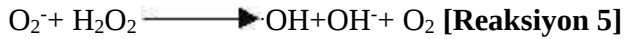
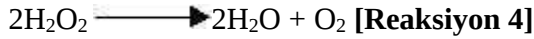
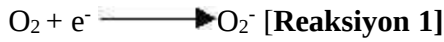
Serbest radikaller protein yapılarla, nükleik asitler ve DNA'yla, hücrenin enerji kaynağı olan karbonhidratlarla reaksiyona girerek, orijinal yapıyı bozarlar. Poliansatüre membran lipidlerinin serbest radikallerle peroksidasyonu iskemik nöronal hasarın gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Sonuç fonksiyonu kaybolmuş ve antijenitesi değişmiş hücre membranı ve hücre yapısındaki yıkımdır.

İskeminin ve reperfüzyonun serbest radikal oluşumundaki rolleri tam olarak açığa kavuşturulmamakla birlikte, iskemi sırasında artan hücre içi Ca^{+2} 'un fosfolipaz- A₂ enzimini aktive ettiği ve karboksigenaz ve lipogenazların etkisiyle prostaglandinler ve lökotrienler oluşurken ortaya çıkan SOR'nin oluşumunda major rol oynadıkları düşünülmektedir.

İskeminin neden olduğu hasarın önemli bir kısmının reperfüzyon sırasında, post-iskemik dönemde olduğu düşünülmektedir. Esas hasarın, hipoksi döneminde değil dokunun tekrar moleküler oksijenle karşılaştığı dönemde olduğu kabul edilmektedir ^{31, 46}. Reperfüzyona, doku pH'sının azalmasına neden olan laktat benzeri asit metabolitlerin neden olduğu öne sürülmüştür ³¹.

Reperfüzyonda yüksek miktarda ROT üretilir. Düşük oksijen basıncında meydana gelen ROT'lara bağlı reaksiyonlar, hipokside daha da tehlikeli olur.

İskemik dokunun reperfüzyonu sırasında gerçekleşen reoksijenasyon bir yandan nöronal canlılığın devamını sağlarken diğer yandan da reaktif oksidanların oluşumuna yol açan sayısız enzimatik oksidasyon reaksiyonu için substrat olarak gerekli olan oksijeni ortama getirmektedir. Oksijenin indirgenmesini izleyen dönemde süperoksid (O_2^-), hidroperoksil (HO_2^-), hidrojen peroksid (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) nin dahil olduğu birçok reaktif oksijen türü oluşmaya başlar [Reaksiyon 1,2,3,4,5].

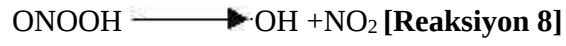


Üç numaralı reaksiyon süperoksid dismutaz (SOD) enzimi tarafından fizyolojik pH'da $2 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1}$ hız sabitesi ile katalizlenir. Reaksiyon sonunda oluşan H_2O_2 , memeli hücrelerinde katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından glutatyon redüksiyonu ile su ve moleküler oksijene detoksifiye edilir [Reaksiyon 4]. Okside glutatyon da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) varlığında glutatyon redüktaz (GR) ile redükte glutatyona dönüştürülür.

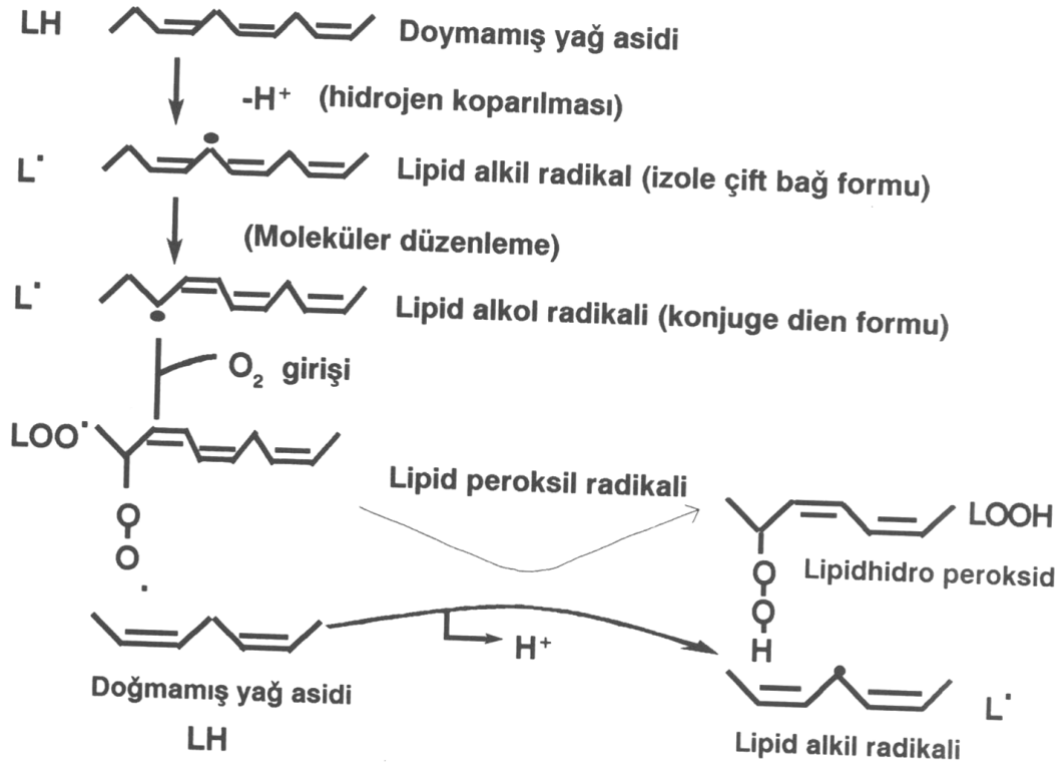
Hidroksil radikalleri son derece aktif oksidanlardır. Bu radikaller hücrede lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarını başlatırlar (**Tablo 3**). Süperoksid radikalleri daha az reaktif olmakla birlikte yarı ömürleri daha uzundur ve Haber-Weiss

reaksiyonu aracılığı ile hidroksil radikallerini oluştururlar [Reaksiyon 5]. Bu reaksiyon Fe^{2+} , Cu^{2+} gibi iz metal iyonları varlığında daha hızlı ilerlemektedir (Fenton reaksiyonu).

Hidroksil radikali oluşumu için bir diğer yol ise O_2^- in beyindeki nöronal endotelial ve glial nitrik oksid sentaz (NOS) aracılığı ile sürekli oluşan ve bir gaz radikal olan nitrik oksid ($\text{NO}\cdot$) ile girdiği reaksiyondur. Bu reaksiyon ürünü peroksinitrittir (ONOO^-) [Reaksiyon 6] ⁶⁹



Tablo 3



Son derece hızlı gerçekleşen bu reaksiyonda ONOO^- oluşum hızı $6.7 \times 10^9 \text{ L. mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ olup difüzyon sınırlıdır⁷⁶. Fizyolojik pH da ONOO^- derhal. OH ve nitrojen dioksit (NO_2) parçalanır [Reaksiyon 7,8]. Çok güçlü bir prooksidan olan ONOO^- , SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur. Sonuçta hücrel proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması hücrel disfonksiyon ve ölüme yol açabilir (3,24). ONOO^- in iskemik beyin hasarındaki rolü son beş yıl içinde araştırılmaya başlanmıştır. Diğer yandan $\text{NO}^\cdot$ in hem serebral kan akımını artırıcı vazodilatatör rolü, hem de nöronal hasar yapıcı serbest radikal özelliği nedeniyle, iskemik nöron hasarındaki yeri konusunda çelişkili görüşler bulunmaktadır.

⁸⁵ NO in nöronal koruyucu şeklinde mi yoksa N-metil-D-aspartat reseptör aktivasyonu ardından hasar verici mediatör olarak mı rol oynayacağını radikalın redoks durumu tarafından belirleneceği öne sürülmektedir. Ayrıca PC 12 hücre dizeleri ile yapılan çalışmalarda Cu Zn-SOD aktivitelerindeki azalmanın $\text{NO}^\cdot$ - ONOO^- yolu aracılığı ile apoptotik hücre ölümüne neden olduğu ortaya konmuştur. ⁸²

Morfolojik çalışmalar korteksin 3. ve 5. tabakalarında bulunan piramidal nöronların ve hipokampusta Ammon boynuzunun CA1 bölgesinde bulunan nöronların iskemi- reperfüzyon hasarından en fazla etkilenen bölgeler olduğunu ortaya koymaktadır. Reperfüzyonun ilk 15 dakikasında nöronlarda morfolojik olarak gözlenen hasar mikrovakuolizasyondur. Sonraki altı saat içinde hasar ilerler ve 48–72 saat sonra nöron parçalanması görülür.

3.2.1.4.4. LİPİD PEROKSİDASYON

Plazma membranındaki doymamış yağ asitleri, fosfolipidler, glikolipidler, gliserid ve steroller, okside olabilen aminoasit içeren transmembran proteinleri, glukoz, mannitol ve deoksi-şekerler serbest radikal hasarına çok duyarlıdır. Reaksiyonlar içinde en önemlisi hidroksil radikalının ($\text{OH}\bullet$) membran lipidleriyle reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatmasıdır. Lipid peroksidasyon, poliansatüre lipidlerin oksidatif yıkımıdır ³. Bu yıkım, genişleyen bir zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Plazma membranı ve hücre içi organellerde lipid peroksidasyon hemen tüm serbest radikal kaynakları tarafından stimüle edilebilir ve ortamdaki Fe ve Cu gibi transizyonel metallerin varlığında potansiyalize edilebilir. Bu reaksiyon tüm yeni oluşmuş kimyasal serbest radikaller tükeninceye kadar devam eder. Hücre membranındaki doymamış yağ asitlerinin kaybı, lipid peroksit oluşumu, lipid preparasyonlar tarafından oksijen tüketimi peroksidasyonu gösterir. Membran yağ asitlerinin peroksidasyonundan sonra oluşan kısa zincirli yağ asitleri, membran permeabilitesini ve viskozitesini önemli ölçüde etkiler ³.

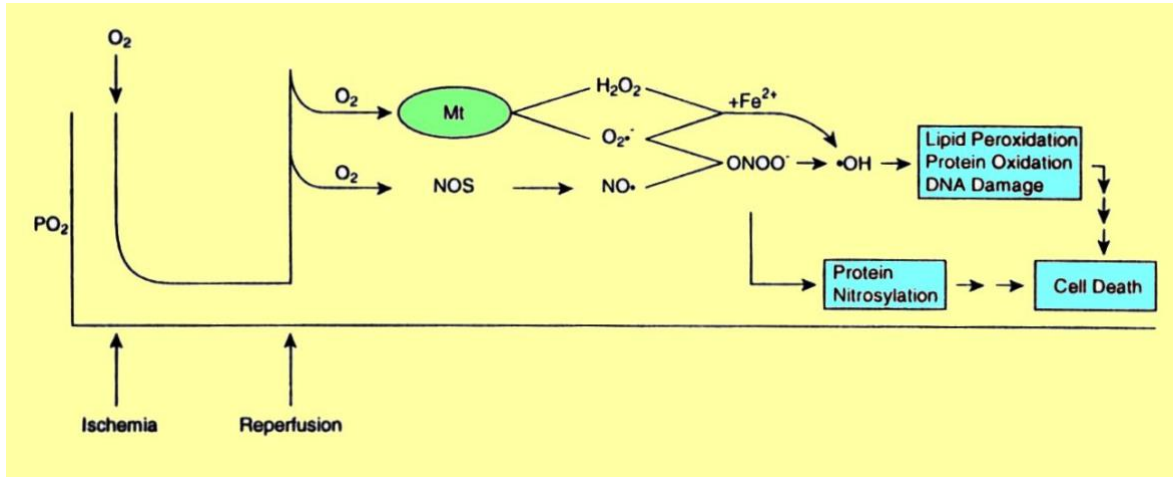
Reperfüzyon hasarının en önemli nedeni, artan serbest radikallerin nöronal hücre, plazma ve organel membranları, vasküler endotel hücre membranı ve myelinde başlattıkları lipid peroksidasyonudur. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizması şeklinde gelişen lipid peroksidasyonu sırasında, doymamış yağ asitlerinin yan zincirlerinde yeniden düzenlenme söz konusudur ⁸⁶. Lipid peroksidasyonu üç aşamada gerçekleşmektedir (**Tablo4**)

Başlangıç basamağı (initiation)

İlerleme basamağı (propagation)

Sonlanma basamağı (termination)

Tablo 4



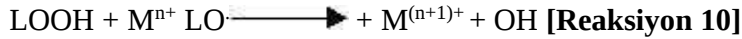
Başlangıç basamağı: Hız kısıtlayıcı olup yeterli reaktivitedeki oksijen kaynaklı bir radikalın bir metilen (-CH₂-) grubundaki divinil (allilik) hidrojen atomunu koparması ile gerçekleşmektedir. Yağ asidinde çift bağ varlığı C-H bağını zayıflatarak H⁺ atomunun kopartılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle membran lipidlerinin doymamış yağ asitleri yan zincirleri, peroksidasyona özellikle duyarlıdırlar. İlk hidrojen atomunu kopartacak reaktivitedeki radikaller, hidroksil (·OH), alkoksil (RO·), peroksil (ROO·) ve hidroperoksil (HO₂·) radikalleri olup, süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit bu reaksiyonu başlatmamaktadır⁷⁴. Hidrojen atomu tek bir elektron içerdiği için, başlangıç reaksiyonu sonunda geride karbon üzerinde eşlenmemiş bir elektron kalmaktadır (-·CH-). Daha önce başlangıç reaksiyonu kavramı daha ileri basamakları kapsamaktaysa da, son görüşler bu aşamanın sadece hidrojen atomunun koparılması reaksiyonu olduğunu kabul etmektedir⁷⁷.

İlerleme basamağı: Karbon merkezli radikal, moleküler bir düzenleme ile izole çift bağ formundan, konjuge dien formuna geçer. Oluşan lipid alkil radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil radikalini oluşturur. Lipid peroksil radikali ise, bir başka yağ asidinden

hidrojen atomunu kopararak lipid hidroperoksidi ve yeni bir lipid alkil radikalini oluşturarak yeni bir zincir reaksiyonu başlatabilmektedir. Lipid hidroperoksidleri, fizyolojik koşullarda nispeten kararlı moleküller olmakla birlikte, geçiş metalleri veya metal komplekslerinin katalizörlüğünde parçalanabilmektedirler. Beyin, ferrik demir (Fe^{3+}) açısından zengin bir organdır. Bu demirin büyük bir kısmı hemoglobin, myoglobin, aktif bölgesinde demir içeren enzimlerde veya ferritin gibi depo proteinleri ile transferrin gibi transport proteinlerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bu şekli ile demir katalizör görevini yapamaz. Serbest demirin en önemli kaynağı ferritindir. NADH ve O_2 , ferritindeki ferrik demirin indirgenmesini ve ferröz demir (Fe^{2+}) olarak salınmasını kolaylaştırmaktadır [Reaksiyon 9] .



İndirgenmiş metal iyonları (Fe^{2+} ve Cu^+) lipid hidroperoksidi ile reaksiyona girerek alkoksil radikalini ($\text{LO}\cdot$), okside metal iyonları ise (Fe^{3+} ve Cu^{2+}) daha yavaş bir reaksiyonla alkoksil ve peroksil ($\text{LOO}\cdot$) radikallerini oluşturmaktadır [Reaksiyon 10].



Her iki radikal de başka yağ asidlerinden hidrojen atomu kopartarak lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu sürdürürler⁷⁴.

Sonlanma basamağı: Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonları, iki lipid peroksid radikali etkileşinceye (annihilasyon) kadar sürmekte ve siklik peroksid (LOOL) oluşumu ile sonlanmaktadır [Reaksiyon 11].



Lipid peroksidasyonu sırasında, karbon bağlarının kopması ile aldehid yapısında yıkılım ürünleri ortaya çıkmaktadır. Bu sitotoksik metabolitler, malondialdehid (MDA) gibi alkaneller, 4 hidroksinonenal gibi hidroksialkenallerdir. Malondialdehid sınıfından olan

tiyobarbitürik asid ile reaksiyon veren maddeler (TBARS), iskemi reperfüzyon olayında lipid peroksidasyonunun en duyarlı göstergelerindendir ⁷⁴.

İskemide başlayan lipolizin, reperfüzyon süresince de devam ettiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Bu nedenle reperfüzyonda, enzimatik lipoliz ve lipid peroksidasyonu, membran hasarında sinerjizm içinde sürmektedir. Perokside olmuş yağ asitleri, lipolizi gerçekleştiren fosfolipazlar için doğal yağ asitlerine oranla daha iyi substratlardır. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünleri de fosfolipaz aktivitesini stimüle etmektedirler ⁸⁶. Lipid peroksidasyonu, ortamda doymamış yağ asitleri, oksijen ve metal katalizörler (Fe^{2+} , Cu^{+}) bulunduğu sürece logaritmik olarak artarken yeni serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle reperfüzyon dönemi, lipid peroksidasyonu için gerekli koşulları sağlaması bakımından çok uygundur ⁸⁶. Lipid radikalleri veya MDA gibi peroksidasyon ürünleri aracılığı ile lipid peroksidasyonu, biyolojik membranlarda yaygın hale geldiği zaman hücresel yapı ve fonksiyon hasarları ortaya çıkmaktadır.

Lipid peroksidasyonu sonucu ortaya çıkan ve fonksiyonel hasara neden olan temel yapısal değişiklik; membran yağ asitlerinin interior alkil zincirlerine hidrofilik bir grubun girmesi ve yağ asitlerinin aköz faza doğru dönmeleridir. Bunun sonucunda oluşan fonksiyonel hasarlar şunlardır:

*Yapısal hasarın derecesine göre, plazma membranında akışkanlığın azalması, membran geçirgenliğinin değişmesi, membran potansiyeli azalması, membrana bağlı enzimlerde (Örn: Na^{+} - K^{+} ATPaz) aktivite azalması ⁷².

*Lizozomal ve mitokondrial membranları ilgilendiren ileri derecede lipid peroksidasyonu ile organel içeriğinin (mitokondrial matriks enzimleri, lizozomal enzimler gibi) hücre içine salınması. Normal koşullarda lizozomlar içinde güvenli bir şekilde tutulan

lizozomal proteolitik enzimlerin sitoplâzmaya salınmaları ile hücre içi proteolizin hızlanması ve doku hasarının şiddetlenmesi ⁷⁶.

*Membran geçirgenliğinin bozulması ile protein sentezi için çok önemli olan K^+ ve Mg^{2+} konsantrasyonlarının değişmesi ve buna bağlı olarak protein sentezinin inhibisyonu.

*Lipid peroksidasyonunun yıkılım ürünü olan malondialdehidin, proteinlerin amino grupları ile şift bazı oluşturması ve tiyol grupları ile etkileşim. Bu şekilde oluşturduğu protein fragmentasyonu ve polimerizasyonunun yanısıra MDA'nın mutajenik etkisi de gösterilmiştir

77

3.2.1.4.5. Lipid Karboksilasyonu

Reperfüzyonda ortaya çıkan serbest radikallerin etkisi ile oluşan lipid radikali, dokuda artmış bulunan karbondioksit ile reaksiyona girerek lipid karboksil radikalini oluşturmaktadır. Karboksil radikali, lipid peroksidasyonu kadar yaygın olmasa da membran hasarına katkıda bulunmaktadır [Reaksiyon 12, 13, 14] ⁷⁴.



3.2.1.4.6. Protein Oksidasyonu

Hücresinin protein yapıları, serbest radikallerin, özellikle duyarlı amino asitler ile direkt etkileşimi sonucunda hasara uğramaktadır. Protein fonksiyonu için kritik pozisyonda olan amino asitler (Örn: enzimin aktif bölgesindeki amino asitler), özellikle radikal hasarına duyarlıdır. Metionin, sistein gibi terminal sülfidril (-SH) grubu bulunduran amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler, oksidasyona en fazla maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan

değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir ⁷⁷. Enzim veya reseptör fonksiyonuna sahip membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonlarına duyarlı oldukları için protein oksidasyonu ile önemli hücresel ve membran fonksiyonları bozulmaktadır ⁸⁰. Protein yapılarındaki hasarın gösterilmesi için, protein karbonillerinin belirlenmesi yaygın olarak kullanılan bir göstergedir. Son yıllarda protein bağlı okside amino asitlerin; özellikle aromatik ve sülfidril içeren kalıntıların analizi yapılmaktadır ⁸⁷. Bunun yanısıra iskemi-reperfüzyon sürecinde hücre içi enzimlerden olan antioksidan enzimlerin oksidasyonları da bu enzimlerin aktivitelerindeki azalmanın nedenlerinden birini oluşturabilmektedir ^{71, 79, 83}.

3.2.1.4.7. DNA Hasarı

Reaktif oksijen radikallerinin, hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır ^{68,80,81}. DNA yapısında 100 den fazla modifikasyon tanımlanmıştır, ancak sadece guanozinin 8-hidroksilasyonu yaygın olarak çalışılmaktadır ^{70,73}. Beyinde temel makromoleküler genetik yapılara olan hasar nedeniyle kreatin kinaz-BB (CK-BB), tubulin, nöron spesifik enolaz (NSE) gibi beyin proteinlerinin sentezinin azaldığı ortaya konmuştur ⁸⁶.

3.2.1.4.8. Nötrofil Kaynaklı Hücre Hasarı:

İskemik dokuda, serbest radikaller de dahil olmak üzere diğer bazı kemoatraktanların etkisi ile göç eden nötrofiller, aşağıdaki mekanizmalar ile reperfüzyonda doku hasarının ilerlemesine yol açmaktadırlar:

*Salgıladıkları proteazlar (elastaz, jeletinaz vb.) ile endotel hücre parçalanmasına neden olurlar.

*Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akışının geri dönmemesi fenomenine (no reflow phenomen), aktive olmuş nötrofillerin yol açtığı ve. nötrofillerin kapillerlerdeki agregasyonları ile kan akımının geri dönmesine engel olan kapiller tıkaçları oluşturduğu bildirilmiştir⁸⁴.

*Salgıladıkları vazokonstrüktör ajanlar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) ile daha büyük damarlarda da(arteriyol, prekapiller damarlar) daralmaya neden olmaktadır.

*Bir araşidonik asid metaboliti olan LTB4 salgılayarak, süperoksid anyon radikali üretimine ve nötrofillerin kemotaksisine neden olmaktadır. Böylece bir geri beslenme mekanizması ile toplanmış olan nötrofillerden salgılanan kemotaktik faktörler yeniden serbest radikal üretimine ve nötrofil infiltrasyonuna neden olmaktadır.¹¹⁷ Hartmann ve arkadaşları nötrofillerce üretilen süperoksid anyon radikalinin, eritrositlerin agregasyonunu da hızlandırdığını ve bu etkinin nötrofil agregasyonu ile birlikte kapiller tıkanmayı daha arttırıcı olabileceğini savunmuşlardır⁷⁵.

3.2.1.5. İnflamasyon

İnflamasyon, spinal kord yaralanması sonrasında çok hızlı bir şekilde başlamaktadır. Yaralanmayla başlayan ve devam eden kanama, ödem, nöroeksitotoksinlerin akümüasyonu ve biyokimyasal değişiklikler, inflamasyonun MSS üzerindeki esas etkilerini belirlemede zorluklar yaratmaktadır. İnflamasyon, canlı dokunun her türlü zedelenmeye karşı gösterdiği ortak bir reaksiyondur. İnflamasyon yaralanma alanındaki vasküler, nörolojik, hüморal ve hücrel yanıtları içerir. İnflamasyon, organizmanın zedeleyici etkeni çevreleyerek yok etme ve zararlı süreçleri sınırlandırmasını sağlayan ve takiben doku onarımına yol açan bir süreçtir^{57, 61}.

Akut inflamasyonun ortaya çıkmasındaki en büyük etken yaralanma bölgesindeki vasküler yanıttır. Yaralanmadan hemen sonra kısa süren bir vazokonstrüksiyon ve ardından

arterioller vazodilatasyon oluşur. Bu da kapiller yatağa daha fazla kan gelerek konjesyona ve takiben vasküler permeabilitede artışa sebep olur. Lezyon bölgesine inflamatuvar hücre infiltrasyonu, polimorfonükleer granulositlerin (PMNL) lezyon bölgesini birkaç saat içinde infiltre etmesiyle başlar ve travmanın ilk gününde en yüksek seviyeye ulaşır. Yapılan ışık ve elektron mikroskopi çalışmalarında 4. saatten önce kan damarları dışında çok az sayıda PMNL bulunurken, 4. saatte bunların damar içinde sayıca çok arttıkları ve damar duvarından çıkarak dokuya girmeye başladıkları görülmektedir⁵⁷. 8 saatlik preparatlarda, gri cevherde PMNL kümeleşmeleri görülmekte ve beyaz cevherde PMNL'ler nöronların içindeki inklüzyonlar olarak belirmektedir. 24 saatlik preparatlarda, dejenere nöronların PMNL tarafından sarıldığı ve PMNL'ler arasında sellüler kalıntıların bulunduğu gösterilmiştir⁵⁷. PMNL'ler üçüncü günde kaybolurlar. Bu süre içinde granüler içeriklerini ortama salarak litik enzimlerinin etkisiyle vasküler, nöronal ve glial hasarı daha da artırabilmektedirler⁵⁷. PMNL infiltrasyonu miktarı ile oluşan hemoraji miktarı korelasyon göstermektedir. Histamin, plazma proteazları, bradikinin, prostaglandinler, trombosit aktive edici faktör, lökotrienler, platelet-aktive edici faktör, serbest oksijen radikalleri, serotonin gibi inflamasyon mediatörleri yaralanmış spinal kordda lezyon bölgesinde birikirler. İnflamatuvar hücreler için kemoatraktan olan bu maddeler doku hasarının hızla ilerlemesine neden olurlar⁵⁷. Ortamdan kaybolan PMNL'lerin yerini mikrogial hücrelerden ve dolaşımdan kaynaklanan makrofajlar almaktadır. Makrofajlar myelin, hemorajik ve nekrotik doku kalıntılarını fagosit etmektedir. Aynı zamanda makrofajlar, angiogenezi başlatan interlökin-1 benzeri sitokinleri de salgılamaktadırlar.

Tüm bu süreçler sırasında, giderek ilerleyen aksonal zedelenme ve demyelinizasyon oluşmaktadır. Hasarlı bölgede kavitasyonlar meydana gelmekte ve bunlar da birleşerek posttravmatik syringomyeliyi oluşturabilmektedirler⁵⁷.

3.2.1.6. Apopitoz

Apopitoz terimi, biyomedikal terminolojiye ilk defa 1972’de Kerr tarafından sokulmuştur. Hücrelerin asla sebepsiz ve bilinmeyen bir yolla ölmediği, bir program dahilinde bu sürecin gerçekleştiği 1951’de Glücksmann, 1974’te de Saunders tarafından öne sürülmüş ve araştırılmıştır. Lockshin 1974’te tüm bu süreci “**programlanmış hücre ölümü**” olarak tanımlamıştır ⁶⁶.

Apopitoz, embriyolojik gelişim, immün sistem, kimyasal nedenli hücre ölümü, hormon bağımlı atrofi, metamorfoz ve normal hücre yaşamı gibi çok çeşitli farklı biyolojik sistemlerde önemli ve normal bir süreçtir ⁶⁶. Uygunsuz apopitoz ise, insanda; Alzheimer ve Huntington hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklarla, iskemik hasarlarla, otoimmün hastalıklarla ve kanserin birçok formu ile ilişkilidir.

Apopitoz, hücrelerin parçalanması için endojen hücresel enzimlerin aktif katılımını gerektiren otonom hücre ölüm süreci olarak tanımlanmaktadır ⁶⁶. Bu süreç morfolojik olarak, hücre ölümünün major formu ve dramatik bir yok olma fazıdır. Bu faz, hücre volüm kaybını, plazma membran şişmesini, sıklıkla subplazmalemmal olmak üzere endoplazmik retikulumun dilatasyonunu, nükleer kromatinin ve sitoplazmik organelerin yoğunlaşmasını içermektedir. Tüm bu stereotipik morfolojik değişiklikleri takiben, hücresel komponentler **apopitotik cisim** olarak adlandırılan membran ile kaplanmış veziküller haline getirilerek, komşu hücreler tarafından hızla fagosite edilirler. Bu otonomik hücre ölüm süreci, kaspaz olarak adlandırılan bir enzim grubunun proteolitik olarak birbirlerini ve birçok intrasellüler anahtar hedef proteini bölerek aktiflemesi ile hücre ölümünün gerçekleştirilmesi esasına dayanır.

Apopitozise bağlı olarak hücrede büzüşme, çekirdeğin küçülmesi ve piknotik bir hak alması, kronatin kondansasyonu ve apopitotik cisimcik oluşumları ortaya çıkar ve hücre sonunda parankimal hücreler veya fagositlerce ortadan kaldırılır. Bu biçimde oluşan hücre kaybı esnasında, nekrozun aksine çevre hücreler bu ölümden etkilenmez ve ortaya inflamatuvar bir yanıt çıkmaz ⁴⁹.

Apoptozisde amaç, ekstraselüler ortama salındıklarında, immünogenetik, otoreaktif ve inflamuar istenmeyen etkiler oluşturabilecek sitoplazmik komponentlerin zararsızca uzaklaştırılmalarını sağlamaktır. Böylece hücre, çevredeki hiçbir hücreye zarar vermeden ortadan kaldırılmış olur ⁴⁹.

Apoptozis aktif bir süreç olup en azından bu sürecin başında internal ve eksternal uyarılara karşı spesifik genlerin aktivasyonuna gereksinim gösterir. Apoptotik ve anti-apoptotik genler aracılığı ile dengelenen bu aktif süreçte rol oynayan genler **Tablo 5’de** sıralanmıştır. Söz konusu genlerde izlenen mutasyonlar kanser gelişiminde önemli rol oynar.

Tablo 5: Pro-Apoptotik ve Anti-Apoptotik Genler

Pro-Apoptotik Genler		Anti- Apoptotik Genler
Cmyc	Bak	Bcl-2
Fas(CD95)	Bax	
TNF	BCL-Xs	Bcl-X _L
P53	Ced-3	
BAD	Ced-4	
	Hid	

Tablo 6: Apoptozis Üzerine Etkili Faktörler

Programlı hücre ölümü
Genetik kontrol
Reseptör aracılıklı apoptozis
Fas + Fas ligand
TNF-R1 + TNF
Sitotoksik T hücre aracılıklı
Yaşamsal faktörlerin eksikliği
Sitokin ve büyüme hormonları(testosteron,IL2,HGF, IGF)
Ekstrasellüler matriksten adhezyon molekülleri ile sinyal iletimi
DNA hasarı
Radyasyon(p53 gen aracılıklı apoptozis)
Kemoterapi(p53 gen aracılıklı apoptozis)
Sitotoksik uyarı
İskemi
Sitotoksik ajanlar
Viral enfeksiyon
Bakteriyel toksinler
Oksidanlar

Nörönal dokuda, iskemik dokunun resirkülasyonu ile ortama gelen ve fizyolojik metabolizasyon sınırı üzerindeki moleküler oksijenin indirgenmesi ile superoksid radikali başta olmak üzere, hidroksil, hidroperoksil, peroksinitrit radikalleri ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türleri oluşmaktadır. Oksijen kaynaklı radikallerin, özellikle membranlardaki lipid yapılarında bulunan doymamış yağ asitlerinin reaktif metilen gruplarından allilik bir hidrojen atomunu koparmaları ile başlayan lipid peroksidasyonu reperfüzyon hasarının en önemli nedenidir. Ayrıca lipid karboksilasyonu, protein oksidasyonu, DNA hasarı ve nötrofil kaynaklı hücre hasarı da hücresel fonksiyonları etkileyen diğer hasarlardır. Sonuç olarak nöronal dokuda iskeminin derinliği süresi ve reperfüzyonda oluşan reaktif oksidan miktarı ile ilişkili olarak hücrenin temel makromoleküler yapılarında meydana gelen değişiklikler nedeniyle farklı derecelerde fonksiyonel ve morfolojik doku hasarı ortaya çıkmaktadır.

3.3. SPİNAL KORD YARALANMASINDA FARMAKOLOJİK TEDAVİ

Spinal kord yaralanmasının fizyopatolojisinde ve farmakoterapisindeki son gelişmelere bağli olarak deneysel spinal kord yaralanmalarında, nöroprotektif etkili çok sayıda madde denenmektedir. Bu ilaçlardan sadece metilprednizolonun, kontrollü, çok merkezli ve geniş klinik çalışmalarda, insanlarda fonksiyonel iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir ⁶¹. Son zamanlarda, birçok karşıt görüşlü çalışmalar yapılıyor ve bazı kliniklerde terkediliyor olmasına rağmen, halen en geniş kullanıma sahip tek ilaçtır. Yapılan deneysel çalışmalara paralel olarak, henüz prelinik çalışma aşamasındaki pek çok yeni ilaç spinal kord yaralanması için ümit vericidir.

3.3.1. Spinal kord Yaralanmasında Deneysel Tedaviler

3.3.1.1. Kalsiyum Kanal Blokörleri

Kalsiyum, ikincil hasarda voltaj bağımlı kanallardan girerek hücre içinde aşırı miktarda artmakta ve nöral yaralanmalarda önemli rol oynamaktadır. Kalsiyum kanal blokerlerinin

nöroprotektif etkilerini mikrosirkülasyon üzerindeki anti-vazospazmik etkileriyle gösterdikleri düşünülmektedir ⁶⁴. Bu nedenle seçilecek kalsiyum kanal blokörleri sistemik hipotansiyon ve iskemi artışına neden olmayacak şekilde, santral sinir sistemi damarlarına selektif etkili olmalıdır. En çok çalışılan maddelerden birisi, merkezi sinir sistemi için selektif etkinliği olduğu düşünülen nimodipindir. Nimodipinle yapılan pek çok çalışmada, nöroprotektif etkiden çok posttravmatik kan akımını artırdığı saptanmıştır. Takiben, nimodipin verilmesiyle birlikte, kardiyak debinin ve intravasküler volümün artırıldığı çalışmalarda bir miktar nöroproteksiyon sağlanmıştır.

3.3.1.2. Antioksidanlar ve Serbest Radikal Tutucular

Glutasyon, alfa-tokoferol (vitamin E), askorbik asit gibi antioksidanlar merkez sinir sisteminde çok miktarda bulunmaktadır. Bu antioksidanların serbest radikalleri tutucu özelliği ile nöroprotektif etkili olduğu ileri sürülmüştür. 21-aminosteroid, tirilazad mesilat, siklosporin A gibi antioksidanlardan da yeterli etki sağlanamamıştır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, bir serbest radikal tutucu olan melatoninin ultrastrüktürel korumayı sağladığı ve nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir ³⁶. Yine, lipid peroksidasyon üzerinden nöroprotektif etkisi olduğu ve gerek klinik gerekse ultrastrüktürel iyileşme sağladığı gösterilen magnezyum da çalışılan ve ümit bağlanan bir ilaçtır ³⁹. Bir antiaritmik olan meksiletin, lipid peroksidasyon düzeyini düşürmekte ve nöroprotektif etki sağlayabilmektedir ³⁷.

3.3.1.3. Opioid Reseptör Antagonistleri

Deneyssel spinal kord yaralanmalarından sonra endojen opioid peptidlerde lokal artış olmakta ve bunlar da opioid reseptörleri aracılığı ile sekonder hasarda önemli rol oynamaktadırlar ⁸. Opiat reseptör antagonistlerinden olan naloxone ile birçok çalışma yapılmış ve spinal kord kan akımını ve nörolojik iyileşmeyi arttırdığını gösteren sonuçlar elde edilmiştir ¹³.

3.3.1.4. İnflamatuar/ İmmün Cevapların Baskılanması

Vücutta herhangi bir doku yaralanması polimorfonükleer lökositleri ve makrofajları içeren inflamatuvar reaksiyonu başlatmaktadır. Bu reaksiyon, doku iyileşmesini sağlamaktadır. Erişkin merkezi sinir sistemi, kendine ait immünsupressif mekanizmalar aracılığı ile kendisini immün hücrelerin potansiyel zararlı etkilerinden korumaktadır ²⁷.

Metilprednizolon ve PAF antagonistleri de inflamatuvar cevabı kısmen azaltarak ya da tamamen inhibe ederek etki göstermektedirler. Klorakin ve kolşisin kullanımının, spinal kordda iskemi sonrası inflamatuvar değişiklikleri ve doku hasarını azalttığı deneysel çalışmalarda bildirilmiştir ²⁷.

3.3.1.5. Tirotropin salıcı hormon ve TRH analogları

Tirotropin salıcı hormon ve TRH analogları pek çok çalışmada kullanılmış ve spinal kord kan akımını iyileştirme, lipid yıkımını azaltma, endojen opioidlerin etkisini antagonize etme gibi etkileriyle iyi sonuçlar bildirilmiştir.

3.3.1.6. GM–1 Ganglioizid

GM–1 ganglioizid, memeli MSS hücrelerinde bulunan bir glikolipiddir. Deneysel çalışmalarda nöroprotektif ve nöronal fonksiyon restorasyonunda potansiyel etkileri bulunmuştur. İn vitro çalışmalarda GM–1 ganglioizidin, eksitator aminoasitlere bağlı nörotoksositeye karşı nöronu koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalar, GM–1 ganglioizidin oluşturduğu uzun dönemdeki nöronal ve klinik düzelmenin, akut hasardaki sonuçlarına göre daha iyi olduğu saptanmıştır ⁶¹. GM–1 ile metilprednizolonun kombine kullanımlarında, GM-1'in metiprednizolonun nöroprotektif etkisini bloke ettiği bildirilmiştir²⁹.

3.3.1.7. Monoamin modölatörleri

Yaralanma bölgesindeki norepinefrin akümülyasyonunun, nekrozUN patolojik temelini oluşturduğu düşünülmüştür. Deneysel spinal kord çalışmalarında, 5-HT kullanımının,

iyileşmeyi arttırdığı gösterilmekle birlikte, bu konuda henüz klinik çalışma yoktur.

3.3.1.8. Büyüme faktörleri

Spinal kord yaralanması sonrasında omuriliğin belirli bölgelerinde asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörleri salgılanmaktadır. Bu faktörler nöronların yaşamalarını kolaylaştırır, nörit gelişimini artırır, nörotransmitter sentezini değiştirir ve eksitatör amino asitlere bağlı nöron ölümlerinde koruyucu etki gösteririr ⁵⁷.

Yeni doğmuş sıçanlarda, aksonotomi sonrası rubrospinal ve kortikospinal nöronlarda yaygın hücre ölümü olduğu ve bunun beyin kaynaklı nörotrofik faktör ya da nörotropin-3 tarafından büyük ölçüde engellendiği gösterilmiştir ⁵⁷. Benzer biçimde, erişkin sıçanlarda da spinal kord transeksiyonu sonrası bölgesel uygulanan nöron büyüme faktörünün aksonal yenilenme ve uzamayı arttırdığı gösterilmiştir.

3.3.1.9. Eksitator Amino Asit Reseptör Antagonistleri

Deneyssel spinal kord yaralanmalarında, MK-801 ve deksmetorfan gibi NMDA reseptör antagonistlerinin etkili oldukları ve nörolojik iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir⁶³. AMPA ve kainat reseptör antagonistleri de çalışılmıştır. AMPA reseptör antagonisti olan, 2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoilbenzoquinoksalin'in travma öncesi ya da ilk 15 dakika içinde uygulanmasının, sıçanlarda histopatolojik, elektrofizyolojik ve fonksiyonel düzelme yaptığı gösterilmiştir ².

Bununla birlikte, eksitatör aminoasit antagonistlerinin sistemik yan etkileri klinik kullanımı sınırlanmaktadır. Bu ajanlar kan-beyin bariyerini geçebilir ve sistemik kullanım glutamat üzerinden ilerleyen sinaptik iletimi bozabilir. Travmaya sekonder ekstraselüler glutamat artışının 1-2 saat içinde normale döndüğü gösterilmiştir. Bu mekanizma ilaçların ilk 1-2 saat içinde uygulanması zorunluluğunu getirmektedir ⁶³. Daha geç uygulanan NMDA agonistlerinin glutamat nörotoksisitesini arttırdıkları gösterilmiştir ².

3.3.2. METİL PREDNİSOLON (METİL PREDNİSOLON SODYUM SÜKSİNAT-MPSS)

Deneysel spinal kord yaralanmalarında, nöroprotektif etkili çok sayıda madde denenmiştir. Bracken ve ark.'nın 1991'de yayınladıkları çok merkezli, randomize kontrollü bir çalışmaya kadar, travmatik spinal kord hasarlı hastalarda nörolojik iyileşmeyi artıracak hiçbir tedavi yok denilmekteydi. Ancak bu çalışmanın, yaralanmadan sonra 8 saat içinde başlayıp 24 saat süren tedavide verilen yüksek doz MPSS uygulamasının (total doz 154,2 mg/kg/24 st), nörolojik fonksiyonu iyileştirdiğini göstermesi, akut spinal kord hasarının farmakolojik tedavisi için önemli vaat vermiştir ¹².

Günümüzde, insanlarda akut travmatik spinal kord hasarının tedavisinde, akut fazda, MPSS tek terapötik ajan olarak kabul edilmektedir. Ancak, MPSS'nin spinal kord hasarındaki etkisinin kesin mekanizmaları hakkındaki bilgilerimiz yetersizdir.

MPSS, diğer glukokortikoidler gibi antiinflamatuvar etkiye sahiptir. Akut inflamasyon, nötrofil infiltrasyonu, trombosit parçalanması, endotel hücre fonksiyon değişiklikleri, vasküler permeabilite artışının pik yapması ve ödem formasyonunu içeren kompleks hormonal ve selüler cevaptır. Eikosanoidler, serbest radikaller, kininler, proteolitik enzimler ve diğer inflamatuvar mediatörler inflamatuvar prosesin aktivasyonuna katkıda bulunurlar. Yüksek doz MPSS'nin antioksidan etkisi, spinal kord hasarındaki etkisini tanımlamak üzere kullanılmıştır.

MPSS'yi de içeren glukokortikoidler güçlü antiinflamatuvar ajanlardır. Glukokortikoidlerin antiinflamatuvar etkisi geniş olarak çalışılmıştır. Araştırmalar, glukokortikoidlerin inflamasyonu baskılamalarının kemotaksisi, fagositozu, inflamatuvar mediatör sentezi ve lizozomal enzim salınımını da içeren lökosit fonksiyon inhibisyonu yoluyla olduğunu göstermiştir ⁶¹. Antiinflamatuvar etkiler, en azından kısmen lipokortin, vazokortin ve anjiotensin konverting enzimler gibi antiinflamatuvar polipeptitlerin sentezi üzerine uyarıcı etkiye, nihayetinde membran fosfolipidlerinden araşidonik asit salınımını ve sonrasında

eikosonoidler ve serbest radikallerin oluşumunu katalizleyen fosfolipaz A2 inhibisyonuna bağlanabilir ⁶¹.

Spinal kord yaralanma modellerinde MPSS ve deksametazonun, çoğunluğu fayda rapor eden çok sayıda dozlama programları incelenmiştir. MPSS, glukokortikoid potensi kortizondan daha büyük ama deksametazondan daha düşük olan sentetik steroidlerin bir grubudur ⁶¹.

Demir bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eden ancak glukokortikoid aktivitesi olmayan 21-aminosteroidlerin spinal hasar modellerinde faydalı olduğu bildirilmiştir ³⁹.

Spinal kord hasarlı hastada iyileşme 30 mg/kg bolus dozdan sonra oluşur ve vücuttaki glukokortikosteroid reseptörlerini aktive etmeye gereken miktarın 1000 katıdır. Bu nedenle, MPSS'nin hormonal etkisiyle ilgisi bulunmayan direkt bir kimyasal etkisi olabilir ⁶¹. Demopoulos ve arkadaşları, steroidlerin membranları stabilize etmede travma ile indüklenen serbest radikal reaksiyonlarını inhibe ederek önemli bir rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir ⁶¹. Braugher ve Hall yüksek doz MPSS'nin (30 mg/kg, iv) lipid peroksidasyonu azalttığı, ATPaz gibi membrana bağlı enzimleri ve nöroflamanlar gibi intraselüler moleküler yapıları koruduğunu ve spinal kord hasarından sonra laktik asidin tehlikeli biyolojik artışını geriye çevirdiğini bulmuştur ¹⁰. Tüm bu sonuçlar ışığında, MPSS'nin spinal kord hasarındaki koruyucu etkisinin en muhtemel açıklaması, MPSS'nin hasar bölgesinde lipid peroksidasyonu ve hidrolizi inhibe ederek membran bozukluğunu baskılamasıdır ^{37, 39, 61}.

Klinik kullanımda terapötik sonuçlar için gereken doz (154,2 mg/kg/24 st), hayvan modellerinde lipid peroksidasyonu ve nöroflament kırılmasını inhibe etmede en etkili olduğu gösterilen doza benzerdir ¹¹. Membranın bu yıkılması hasarın 8 saati içinde pik yapar ¹⁰. Bu bulgular Bracken ve arkadaşlarının hasardan 8 saatten daha sonra MPSS ile tedavi edilmiş hastaların nörolojik sonuçlarının plasebodan farklı olmadığı gözlemi ile tutarlıdır ¹³.

Lipid peroksidasyonunun inhibisyonunun sekonder bir etkisi de araşidonik asit mekanizmasının vazoaaktif yan ürünlerinin azalmasıdır. Bu da hasar bölgesinde kan akımını artırır ⁶⁷.

MPSS ve diğer glukokortikoidlerin, nötrofil bağımlı hücre apoptozu üzerinde kuvvetli inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir. Kato ve arkadaşları bu etkinin doz bağımlı olarak hem spontan hem de tümör nekroz faktörü (TNF) nötrofil bağımlı hücre apoptozda etkili olduğunu göstermişlerdir ⁴⁰. Benzer biçimde, devamlı prednisolon uygulamasının, sağlıklı popülasyonda hücre apoptozu azalttığı gösterilirken, inflamatuvar reaksiyonlara bağlı olaylarda apoptozu normal seviyelere kadar indirdiği bulunmuştur ^{40, 53}. Prednisolonun bu etkisinin, sitokin oluşumunu azaltmasına ve reseptör düzeyindeki etkilerine bağlı olduğu düşünülmektedir. Sitokinler ve benzeri kemotaktik maddelerin azalması, PMNL göçünü engellerken, reseptör değişiklikleri ise nötrofillerin endotel yüzeyine yapışabilirliklerini ve doku içine infiltrasyonlarını engellemektedir ⁴⁰.

MPSS ile ilgili çok merkezli ve kontrollü ilk çalışma, “**National Acute Spinal Cord Injury Study-NASCIS**” olarak bilinen çalışma serilerinin ilki olan ve 1979–1984 yılları arasında yapılan NASCIS-I’dir. Burada, 1000 mg lık doz kullanılmış ancak uzun dönem takiplerinde bu dozun yetersiz olduğuna karar verilmiş ve 1985–1988 yılları arasında sürdürülen ve sonuçları halen birçok klinikte kullanılan NASCIS-II yapılmıştır. Bu çalışmada, MPSS’nin doz bağımlı antioksidan etkisinin 30 mg/kg dozunda maksimum olduğu ve 60 mg/kg’dan sonra zararlı etkilerinin başladığı gösterilmiştir. Yine ilk 8 saatte verilen MPSS’nin uzun dönem takiplerinde daha iyi nörolojik iyileşme görülmüştür ¹². Takiben MPSS tedavi süresini belirlemek için NASCIS-III yapılmıştır. Yaralanmadan sonraki ilk 3 saatte MPSS başlanan hastalarda, tedavinin 24 saatten fazla sürmesinin nörolojik değişiklik yapmadığı saptanmıştır. Yaralanmadan sonraki 3–8 saat içinde başlanan MPSS tedavisinin 48 saate uzatılmasının ise nörolojik iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir ^{12, 14}.

Yüksek doz MPSS tedavisi alan hastalarda daha fazla yara yeri ve ameliyat bölgesi enfeksiyonu bulunmuştur. Yine yapılan klinik serilerde gastrointestinal kanama oranının arttığı bildirilmekle birlikte tüm bu yan etkilerin plasebo gruplarından farklı olmadığı da bildirilmiştir

Yüksek doz MPSS'nin nörolojik iyileşmeyi artırdığı bildirilmesine rağmen, uzun süreli kullanımlarında makrofajların antijen sunumunu ve immün hücre aktivitesini azaltarak nöronal iyileşmeyi zayıflatabildiği de bildirilmiştir ⁴².

3.3.3. AMİFOSTİNE

Kemoterapötiklerin kanser tedavi başarısını sınırlayan en önemli etki, normal dokularda oluşturduğu sitotoksisitedir. Bu etki, sitostatiklerin kullanımını önemli ölçüde engellemektedir. Söz konusu etkinin engellenmesi için birçok "sitoprotektif" ilaç geliştirilmeye çalışılmaktadır ⁵⁵. Günümüzde, sitoprotektif amaçlı olarak en sık kullanılan ilaçlardan biri de Amifostine'dir.

Amifostine'nin gelişimine yol açan araştırmalar Soğuk Savaş süresince başladı. II. Dünya savaşını sonlandıran atomik kirlilikler sonrasında radyasyon hasarından vücudu koruyan kimyasal maddelerin gelişimine yönlenildi. A.B.D. askeri kuvvetleri, atomik kirlenmenin radyasyon etkilerinden askerlerini koruyan ajanlarla ilgilendiler ⁵⁹.

Radyasyon, reaktif atom grupları olan serbest radikallerin üretimine neden olarak hücrelere zarar verir. Hücrelerde serbest radikaller DNA gibi diğer atomlara yapışır ve hasar verir ve tahrip eder. Serbest radikaller daha fazla hücre hasara neden olan oksijen ile reaksiyona girer. Sülfidril bileşikler veya tioller, DNA hasarını tamir eden veya önleyebilen serbest oksijen radikalleri olarak etkileyebilir. 1940'ların ilk yıllarında glutatyon ve sistein gibi tiol içeren bileşiklerin radyoprotektif etkileri olduğu gösterildi.

Amifostine (WR-2721), soğuk savaş yıllarında "Walter Reed Army Institute" araştırma laboratuvarlarında, askeri personeli olası bir nükleer savaşta radyasyon etkisinden korumak için geliştirilmiş radyoprotektif bir ajandır ⁵⁹. Bu amaçla geliştirilen ve isimlerini "Walter Reed Army" 'nin ilk harfleri olan WR'den alan 4400 kimyasal ajan içinde radyoprotektif etkinliği en belirgin ve güvenle kullanılabileni amifostine (WR-2721) olmuştur. Soğuk savaş yıllarında yapılan hayvan çalışmaları, bu kimyasal ajanın fare, köpek ve

maymunları letal dozda radyasyon etkisinden koruduğunu ortaya koymuştur ⁵⁹.

İlacın tıp dünyasının ilgisini çekmesi, soğuk savaş riskinin azaldığı, ilacın formülasyonunun saklanması gerek kalmadığı dönemlerde, normal dokuları nitrojen mustard (HN₂), L-phenylalanine mustard (L-PAM) ve sisplatin gibi alkilleyici ajanların olumsuz etkisinden koruduğunun gösterilmesi ile başlamıştır ⁸⁸. Bu şekilde başlayan süreç giderek hızlanmış ve ilaç günümüzde radyoprotektif ve sitoprotektif bir ajan olarak yaygın biçimde kullanım alanı bulmayı başarmıştır.

Thiol içeren ve dolayısı ile antioksidan olan sodyum tiyosülfat ve dietil-ditiyokarbomat gibi bileşiklerin normal dokuyu radyasyon ve bazı kemoterapötiklerin istenmeyen etkilerinden koruduğu uzun yıllardan beri bilinmektedir ^{55, 88}. Ancak Thiol bileşiklerinin kanser tedavisinde bir sitoprotektan olarak kullanımı mümkün olamamıştır. Çünkü thiol içeren bileşikler, sadece normal dokuyu sitotoksiteden korumakla kalmıyor, sitotoksik anti-tümör etkiyi de ortadan kaldırıyordu. Bir thiol bileşiği olan amifostine (WR-2721) bu yanı ile diğer thiol içeren bileşiklerden ayrılmaktadır.

Amifostine, organik bir thiofosfat bileşiğidir. Kimyasal adı 2-3 aminopropil amino ethanethiol, dihidrojen fosfattır. S-2 etiolfosforothiotik işaretlidir. Moleküler ağırlığı 214,22 ve moleküler formülü C₅H₁₅N₂O₃PS dir.

Amifostine, diğer sülfidril içeren bileşiklerden farklıdır. Thiol grubu fosfat ile kaplanmış ve korunmuştur. Böylece Ethyol aktif metaboliti olan serbest thiole dönüşüm için alkalın fosfataz ile defosforilasyon gerektirir.

Amifostine (WR-2721), bir ‘‘pro-drug’’(ön ilaç) olup sitoprotektif etkinliği yok ya da çok azdır ^{59, 89}. İlacın etkin olabilmesi için, hücre içinde alkalen fosfataz enzim katalizörlüğünde bir fosfat grubunun uzaklaştırılması ve thiol grubunun serbest hale gelmesi gereklidir. Bu etki ile pro-drug, aktif metaboliti olan WR-1065’e dönüşür^{59, 89}. Oluşan

metabolit dokular tarafından hızla alınan ve sitoprotektif etkiden sorumlu olan metabolittir. Kendisi de bir aktif metabolit olan WR-33278'e okside olarak etkisini kaybeder (**Tablo 7**). Protektif etkiden sorumlu olan serbest sülfidril grubudur. Bu etkiyi, normal hücre DNA'sında hasar ve kırıklar meydana getiren serbest radikalleri, alkile edici ve platinyum bazlı sitostatik ajanlar tarafından oluşturulan karbon iyonlarını ortadan kaldırarak yaptığı düşünülmektedir.

Amifostine'nin normal dokuyu tercih etmesi birkaç faktörle açıklanmaktadır. Bunlardan biri, aktif metaboliti olan WR-1065'e dönüşümünü sağlayan membran pH bağımlı alkalin fosfatazın, normal hücrelerde daha fazla ve aktif transport sistemini kullanmasıdır. Normal dokularda kanlanmanın ve mikroçevre pH değerinin malign hücrelerdekine nispetle daha yüksek olması da sözü geçen özelliklere yardımcı faktörlerdir.

İlaç intravenöz uygulamayı takiben hızla plazmadan temizlenerek normal dokular tarafından tutulur. İlacın çok kısa olan yarı ömrü diğer ilaç etkileşimlerine olanak tanımamaktadır. Gerçekten de yapılan çalışmalar, eliminasyon yarı ömrünün 8 dakika olduğunu ve 10 dakika içinde aktif metabolitine dönüştüğünü ortaya koymaktadır^{23, 91}. Kendisinin aksine, metaboliti dokularda çok uzun süre kalabilmektedir. Normal dokular, özellikle kapiller düzeyde belirgin alkalin fosfataz aktivitesine sahip olduğundan, amifostine (WR-2721)'nin aktif metaboliti olan WR-1065'e dönüşümü daha kolay gerçekleşmekte ve normal doku ilaç etkisinden korunmaktadır. Buna karşılık tümör dokuya ait kapiller yapılarda, alkalin fosfataz aktivitesi belirgin olarak azdır. Dönüşümü sağlayacak bu enzim eksikliğinden dolayı benzer sitoprotektif etki tümör dokusunda ortaya çıkmamaktadır. Tümör dokuda, alkalin fosfataz aktivitesini daha da azaltan bir diğer faktör, dokunun pH değeridir. Alkalin fosfataz aktivitesi, en küçük pH değerinden bile etkilenmektedir. Tümör doku normal dokuya kıyasla daha asidik olduğundan, bu pH'da enzim aktif hale geçemez.

İlacın, uygulanımı takiben ilk 30 dakikada karaciğer, böbrek, kalp, kemik iliği, tükrük bezi gibi dokularda, tümör dokusuna göre 100 kat daha yüksek konsantrasyonlara ulaştığı yapılan farmakokinetik çalışmalarda gösterilmiştir. İlk 60 dakikadan sonra ise aradaki

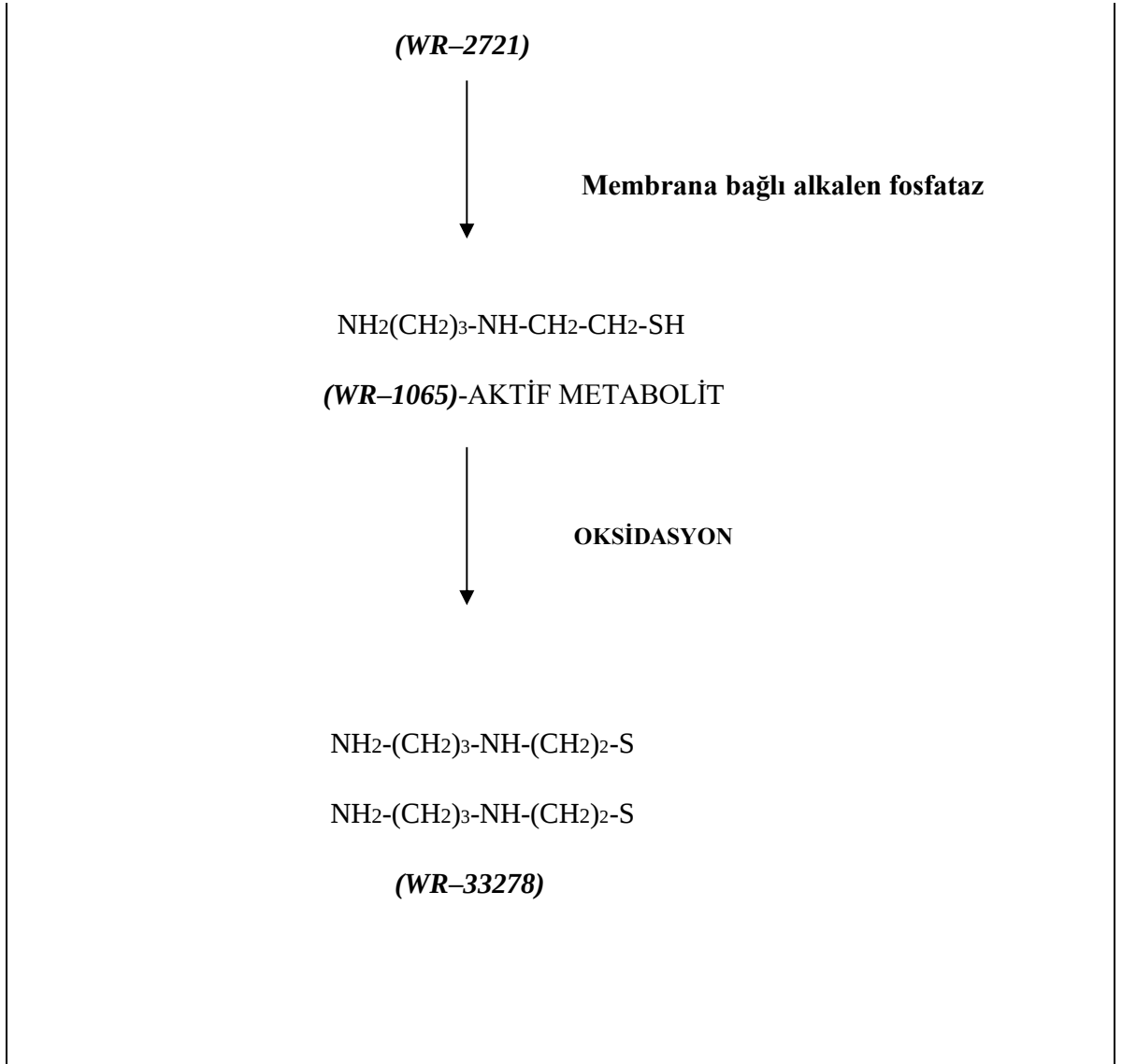
konsantrasyon farkı azalarak 10 kata inmektedir. Hayvan deneylerinde, 21 gün ve 100mg/kg uygulamada, amifostine (WR-2721)'nin tümör dokularında çok önemsiz miktarlarda tutulduğu gösterilmiştir. Oysaki ilaç normal dokularca oldukça sabit bir oranda ve yüksek konsantrasyonlarda tutulabilmiştir⁹⁰.

Amifostine (WR-2721)'nin kemoprotektif ve radyoprotektif özellikleri benzerdir. İlaç, yapısında antioksidan olduğu bilinen thiol içerdiğinden, özellikle platinium, alkilleyici ilaçlar ve radyasyonun neden olduğu serbest oksijen radikallerini temizleyebilmekte, sellüler toksisiteyi önlemekte ve bu yolla "sitoprotektan" etki gösterebilmektedir^{59, 89}. Amifostine (WR-2721)'nin sitoprotektif etkinliği birçok klinik ve pre-klinik çalışma ile gösterilmiştir. Yapılan birçok ex vivo çalışma, ilacın sisplatin, carboplatin, siklofosfamid, nitrojen mustard, bleomisin, cytarabin, etoposide, daunorubusin, paclitaxel, mitoxantron, vinblastin, idarubicin, melphalan, mitomycine C, carmustine(BCNU) ve 5-florourasil' in neden olduğu kemik iliği toksisitesini azalttığını ve "colony forming unit-spleen"(CFU-S) hücrelerini koruduğunu ortaya koymaktadır^{90,93,95}. Ancak benzer koruyucu etki tümör hücrelerinde ortaya çıkmamaktadır^{93, 96}.

Amifostine (WR-2721), radyoterapi alan hastalarda, "radyoprotektan" olarak da uygulanmaktadır. Yapılan çalışmalar, radyoterapinin neden olduğu hematopoetik sistem, akciğerler, gastrointestinal sistem toksisitelerini, ototoksisiteyi ve periferik nöropatiyi önlediğini ortaya koymaktadır. İlacın, radyasyonun oksijen serbest radikal oluşumu aracılığı ile neden olduğu DNA ve hücre membran hasarını önlediğine inanılmaktadır.

Tablo 7. Amifostine ve Aktif Metabolitinin Kimyasal Formülü

(AMIFOSTINE) $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{-NH-CH}_2\text{-S-PO}_3\text{H}_2$ (S-2-(3 aminoprophylamino) ethyldihydrogen phosphorothioate)
--



3.3.3.1. AMİFOSTİNE ve NÖROPROTEKSİYON

Amifostine tarafından MSS radyoproteksiyonu üzerine klinik veriler henüz yetersizdir. Amifostine kan-beyin bariyerini (KBB) geçemez^{59, 89}. Bu problemin çözümü için bazı gruplar intratekal uygulamayı incelediler. İlave olarak servikal spinal kord irradiyasyonu tarafından indüklenen rodent myelopati modelleri mevcuttur¹³¹.

Normal merkezi sinir sistemi ve spinal kordun tolere edebileceği radyasyon dozu malign astrositik glioma için kür sağlaması açısından oldukça düşüktür. Bu potansiyel problemin çözümü için normal MSS dokularını tümörden daha fazla koruyan bileşikler geliştirmek gerekir. WR-27721, WR-77913 ve WR-3689 gibi radyoprotektif fosfotioatlar suda yüksek oranda çözünebilir ama kan beyin bariyerini kolayca geçemez. Kan beyin bariyerini geçen yollarla bu ilaçların verilmesi rat servikal spinal kordunun radyoproteksiyonunu bize değerlendirmek için izin verir.

Spence ve arkadaşları'nın ratlarda yaptığı çalışmada, sağ lateral serebral ventrikül içine WR-2721, 0.33 mg; WR-77913, 2.75 mg ve WR-3689, 2,0 mg olarak ayrı gruplar halinde verilmiştir. Takiben 45 dakika sonra hayvanların servikal spinal kordlarına tek doz fraksiyone radyasyon verilmiştir. Her rat haftalık olarak el ve bacak paralizi bulguları yönünden incelenmiştir. Sonuç olarak 3 ilaç grubunda da servikal spinal kordda radyoproteksiyon ve buna bağlı olarak nöroproteksiyon olduğu gösterilmiştir. Bu ilaçların da etkinlik sırası WR-2721>WR-3689>WR-77913 olarak bulunmuştur. Histolojik değişikliklerin de benzer olduğu ve aynı etkinlik sırasına göre hücre yapısının korunduğu gözlenmiştir. Bu etkinin de beyaz cevher ve vasküler elemanlarda koruma yaparak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ancak aynı etki servikal spinal korddan çıkan schwann hücreleri ile kaplı periferik sinirlerde görülememiştir¹³⁰.

Van der Kogel'in çalışmasında, 20- 40 Gy aralıkta rat spinal korduna uygulanan radyoterapi sonrasında beyaz cevherde nekroz ve demiyelinizasyon 4-7 ay sonra değerlendirilmiş ve sonuçlar Spence ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmaya benzer bulunmuş¹²⁶.

Guelman ve arkadaşları, ratlarda tek fraksiyon 5 Gy neonatal radyoterapi ile indüklenen serebellar morfolojik hasar ve motor bozukluğu incelemişler. Maruziyetten 30 dakika önce subkütan (sc) 100 mg/kg amifostine uygulamasının bu tip nörotoksisiteyi önlediği saptanmıştır¹²⁷.

. Alaoui ve arkadaşları, 15 günlük ratların 2,5 Gy radyasyon uygulanmasından 20 dk. sonra verilen intraperitoneal 75 mg/kg amifostine uygulamasının beyine koruma sağlamadığı göstermişlerdir. Bu da ilacın verilme zamanının çok önemli olduğu ve bu çalışmada radyasyon sonrası 20 dk'nın çok geç olduğu bildirilerek açıklanmıştır.¹²⁸

Lamproglou ve arkadaşları da, 45 günlük ratlara tüm beyin radyasyonu uyguladılar. Beraberinde farklı dozlarda amifostine verdiler. 75 veya 150 mg/kg doz amifostine verilen gruplarda istatistiksel anlamlı sonuçlar elde edildi. 37.5 mg/kg doz daha az etkiliydi¹²⁹.

Spence ve arkadaşları, santral spinal kordun tek fraksiyon radyoterapisi öncesi 45. dakikada ratlara intratekal amifostine verdiler. Erken toksisite çalışmalarına dayanarak doz 0.33 mg idi. Onlar radyasyon myelopatisinin radyasyon dozuna bağımlı olarak uzadığını gösterdiler. Amifostine'nin de bu dozda nöroprotektif olduğunu belirttiler¹³⁰.

Nieder ve arkadaşları'nın çalışmasında, 180–210 mg ağırlığında 12 haftalık rat kullanıldı. Amifostine veya salin uygulaması için sisterna magnaya kanul yerleştirildi. Yerleştirilen kanüller injeksiyon sonrası çıkarıldı. Her grupta (intra tekal 0,3 mg, subkütan 40 mg) 8–9 rat vardı ve radyasyon fraksiyonu öncesi 45. dakikada intratekal (it) veya subkütan (sc) amifostine verildi. Kontrol grubu it veya sc salin ile tedavi edildi. Ratlar en az 12 ay süresince spinal kord hasarı bulguları ve parezi açısından monitörize edildi. Klinik tanı histolojik inceleme ile desteklendi. Sonuçta; intratekal amifostine ile spinal kord korumasının sağlanamadığı belirtildi. Ancak yazarlar bu etkisizliğin önemli bir sebebi olarak it uygulamanın zor olmasına bağlamışlardır. Subkütan amifostine uygulanmasında ise myelopati insidansının azaldığı görüldüğünü belirtmişlerdir¹³¹.

4.AMAÇ

Bu çalışmanın amacı, deneysel spinal kord kontüzyon yaralanmasından sonra uygulanan Amifostine'in, doku lipid peroksidasyonu ve hücre ultrastrüktürü üzerine etkilerini araştırmak ve bu etkileri halen kliniklerde sıklıkla kullanılmakta olan Metil Prednisolon'la karşılaştırmaktır.

5. MATERYAL VE METOD

Deneyin yapılabilmesi için gerekli etik kurul onayı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan alındı. Bu çalışmada denek olarak ağırlıkları 210–250 gr arasında değişen 35 erkek Wistar albino rat kullanıldı ve rastgele 5 gruba ayrıldı.

5.1. GRUPLAR

Grup I (n:7) (Kontrol) : Laminektomiye takiben travma uygulanmaksızın doku örnekleri 24 saat sonra alındı.

Grup II (n:7) (Travma) : Laminektomiye takiben 50 gr-cm travma uygulandı. 24 saat sonra yaralanma merkezinden 1 cm boyutunda doku örnekleri alındı.

Grup III (n:7) (MPSS) : Laminektomiye takiben 50 gr-cm travma uygulandı ve derhal 30 mg/kg metil prednisolon (Mustara Nevzat-İstanbul), ip. olarak verildi. 24 saat sonra yaralanma merkezinden 1 cm boyutunda doku örnekleri alındı.

Grup IV (n:7) (AMİFOSTİNE) : Laminektomiye takiben 50 gr-cm travma uygulandı ve derhal 200 mg/kg Amifostine(Er-Kim İlaç-İstanbul) ip. olarak verildi. 24 saat sonra yaralanma merkezinden 1 cm boyutunda doku örnekleri alındı.

Grup V (n:7) (Vehicle) : Laminektomiye takiben 50 gr-cm travma uygulandı ve derhal 2 mL % 0,9 NaCl (SF) solüsyonu ip. olarak verildi. 24 saat sonra yaralanma merkezinden 1 cm boyutunda doku örnekleri alındı.

Alınan doku örnekleri derhal –196°C’deki sıvı azot tankında dondurularak saklandı.

5.2. CERRAHİ İŞLEM

Bütün cerrahi işlemler genel anestezi altında gerçekleştirildi. Bu amaçla 10 mg/kg xylasine (Bayer-İstanbul) ve 60 mg/kg ketamine hydrochloride IM (Parke-Davis-İstanbul) kullanıldı.

Anestezi verilen ratlar prone pozisyonunda yatırılarak tespit edildi. Sırt traşını ve Batticon® ile cilt temizliğini takiben orta hatta 3 cm uzunluğunda longitudinal cilt insizyonu yapıldı. Paravertebral adaleler sıyrıldıktan sonra torakal 7, 8 ve 9 vertebralarına total laminektomi uygulandı. Dura intakt bırakıldı. Kontrol grubu dışındaki deneklere, Allen metoduna uygun olarak 50 gr-cm standart spinal kord travması uygulandı. Bunun için yüksekliği 10 cm, çapı 5 mm olan silindir şeklindeki bir cam tüp, laminektomi alanına dik olarak yerleştirildi. 5 gramlık ağırlık (3 mm çapında, silindir şeklinde çelik sütun) bu tüpün içinden 10 cm yüksekten dura üzerine düşürüldü. Böylece 50 gr-cm (travma şiddeti= ağırlık x yükseklik) şiddetinde spinal kord travması oluşturuldu.

Ratlar, dokular alındıktan sonra derin anestezi altında sakrifiye edildi.

5.3. DOKULARIN HOMOJENİZASYONU

Doku örnekleri tartıldıktan sonra, yaş ağırlıklarının 10 katı hacmindeki 1 mM EDTA içeren 10 mM TRİS tamponu içinde cam-cam tipi homojenizatör kullanılarak buz içinde homojenize edildi. Doku homojenatının 1 mililitresi konik ependorf tüplere aktarıldı ve mikrofüjde 5000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Örneklerin süpernatanı lipid peroksidasyon aktivitesi tayininde kullanıldı.

5.4. LİPİD PEROKSİDASYON ÖLÇÜMÜ

Dokularda lipid peroksidasyon seviyelerinin ölçümü için aşağıdaki sıra izlendi: %10 homojenize doku örneklerinin 0,2 ml'sinden daha azına 0,2 ml %8,1 SDS, NaOH ile pH 3,5'e ayarlanmış %20'lik asetik asit solusyonundan 1,5 ml ve %0,8'lik TBA aköz solusyonundan 1,5 ml ilave edildi. Karışım kondensatör olarak 60 dakikada 95 °C'de yağ banyosunda ısıtıldıktan sonra 4,0 ml distile su eklendi. Su ile hafifçe soğutulduktan sonra, 1,0 ml distile su ve 5,0 ml butanol ve pridin karışımı eklendi ve kuvvetlice sallanarak karıştırıldı. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra, organik tabaka alındı ve karışımın emilimi 532 nm'de ölçüldü. TMP eksternal standart olarak kullanıldı. Ve lipid peroksidasyon seviyesi nmol olarak eksprese edildi. Küçük bir organ veya biopsi örneği gibi küçük miktarda bir doku ile ölçüm gerektiğinde, fluorometrik değerlendirme (eksitasyon: 515 nm; emisyon: 553 nm) 532 nm de spektrofotometrik ölçüm alanında kullanıldı.

5.5. ELEKTRON MİKROSKOBİK İNCELEME

Torakal seviyedeki travma bölgesinden alınan spinal kord segmentleri, %2,5' luk gluteraldehit içine konularak 6 saat fiksasyon sağlandı. Takiben %1' lik osmiumtetroksit içine fiks edildikten sonra artan alkol konsantrasyonlarında dehidrate edildi. Takiben örnekler propilenoksit ile yıkandı ve epoksiyresin içine yerleştirildi. 60 nanometre (nm) kalınlığında ultra ince kesitler LKB Nova (Bromma, İsveç) ultramikrotomun cam bıçağı ile kesildi ve takiben bakır ızgaralar üzerine alındı. Bu kesitler üranyl asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak jeol JEM 1200 EX transmission elektron mikroskop (Tokyo, Japonya) ile incelendi.

5.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Gruplar arasında lipid peroksidaz aktivitesi açısından farklılıkları saptamak için SPSS 11,0 ortamında tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Farklılığın hangi gruplardan kaynaklandığını göstermek için post-hoc test kullanıldı. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

6. BULGULAR

Yapılan istatistiksel inceleme sonucunda; amifostine grubunun diğer gruplarla arasında doku lipid peroksidaz (MDA) aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$) (Tablo 8). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, travma grubunda doku lipid peroksidaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 8). Travma, doku lipid peroksidaz aktivitesini arttırmıştır. Kontrol, MPSS ve Amifostine grupları arasında doku lipid peroksidaz seviyeleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 8). MPSS ve Amifostine, doku lipid peroksidaz aktivitesindeki artışı engellemiştir. Travma ve Vehicle grupları arasında da doku lipid peroksidaz aktivitesi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo 8). Vehicle solüsyonunun, doku lipid peroksidaz aktivitesi üzerine etkisi saptanmamıştır.

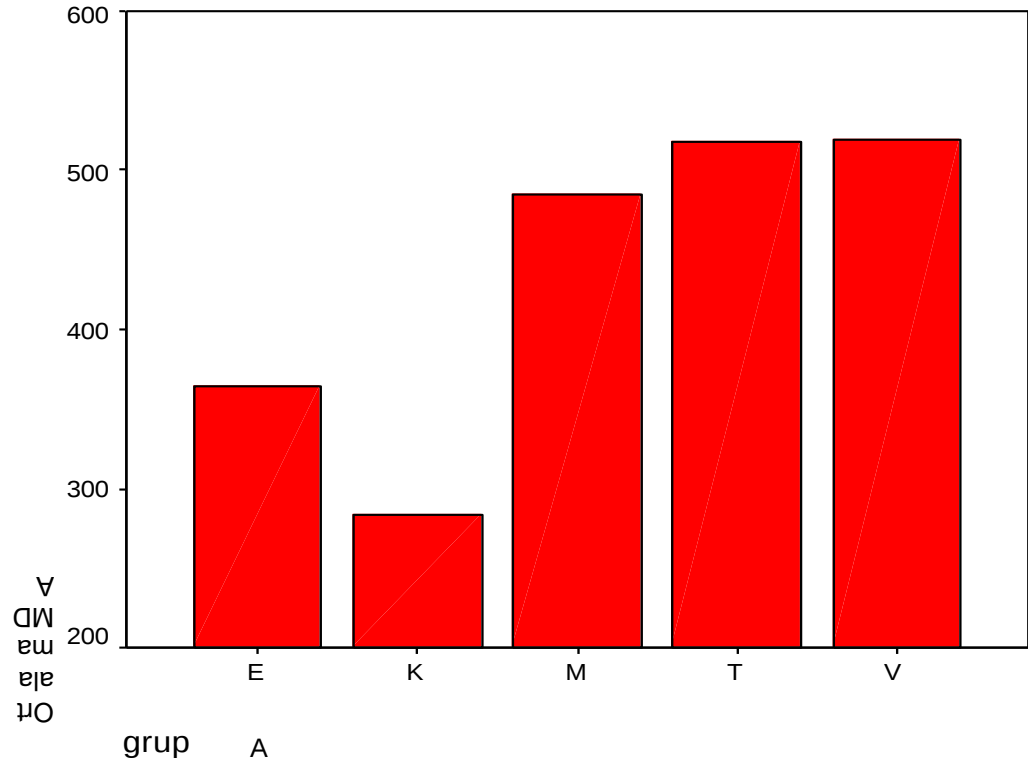
Spinal travmada Amifostine'nin hücre içi yapılardaki koyuculuğunu gösterebilmek ve karşılaştırabilmek amacıyla tüm gruplara elektron mikroskopik inceleme yapıldı. Her grupta yaklaşık 300 örnek sayıldı. Küçük çaplı miyelinli aksonlarda sonuçlarda kontrol ile Amifostine arasında önemli fark saptanmadı. Orta ve büyük çaplı miyelinli aksonlarda Amifostine'nin önemli miktarda koruma sağladığı gözlemlendi (Resim 2). Nukleus tüm gruplarda normaldi.

MPSS: Birkaç normal mitokondri gözlenmekle beraber kalan mitokondrilerin yaklaşık yarısında kristaller belirgin; kalan yarısında da mitokondriler şişmiş olarak gözlemlendi. Küçük çaplı miyelinli aksonlarda; az miktarda miyelin katmanlarına kesinti gözlenirken kalan aksonların yarısı normal olup, kalan yarısında da miyelin katmanlarında ayrılma saptandı. Orta çaplı miyelinli aksonlarda; miyelin katmanlarında kesinti görülen akson sayısı daha çok olup kalan aksonların büyük çoğunluğunda miyelin katmanlarında ayrılma saptandı. Normal olarak görülen akson sayısı daha çok azdır. Büyük çaplı miyelinli aksonlarda; normal akson bulunmayıp orta miktarda aksonlarda miyelin katmanlarında

kesinti görülmüş olup aksonların çoğunluğunda miyelin katmanlarında ayrılma saptanmıştır (Resim 1).

AMİFOSTİNE: Nukleus normaldi. Mitokondri: 1/6'da normal mitokondri görülmüş olup çok az miktarda şişmiş mitokondri saptanmıştır. Kalan mitokondrilerin tamamında ise kristalar belirgin olarak saptandı. Küçük çaplı miyelinli aksonlarda; görüntüler tamamen normale yakın olup sadece çok az miktarda aksonlarda miyelin katmanlarında ayrılma görüldü. Orta çaplı miyelinli aksonlarda; orta miktarda normal akson görülmüş olup çok az miktarda miyelin katmanlarında kesinti saptanmıştır. Kalan büyük çoğunlukta miyelin katmanlarında ayrılma görülmüştür. Büyük çaplı miyelinli aksonlarda; diğer gruplara göre daha az sayıda olmakla beraber yine de orta sayıda normal görünümlü büyük çaplı akson görülmüş olup yine de çok az miktarda miyelin katmanlarında kesinti görülmüş ve kalan büyük orandaki aksonlarda miyelin katmanlarında ayrılma görülmüştür (Resim 2).

Travma, Vehicle ve MPSS gruplarındaki nöronlarda görülen küçük vakuoller Amifostine grubunda görülmemiştir.



GRUPLAR

(Tablo 8).Gruplar Arası Ortalama Lipid Peroksidasyon Düzeyleri

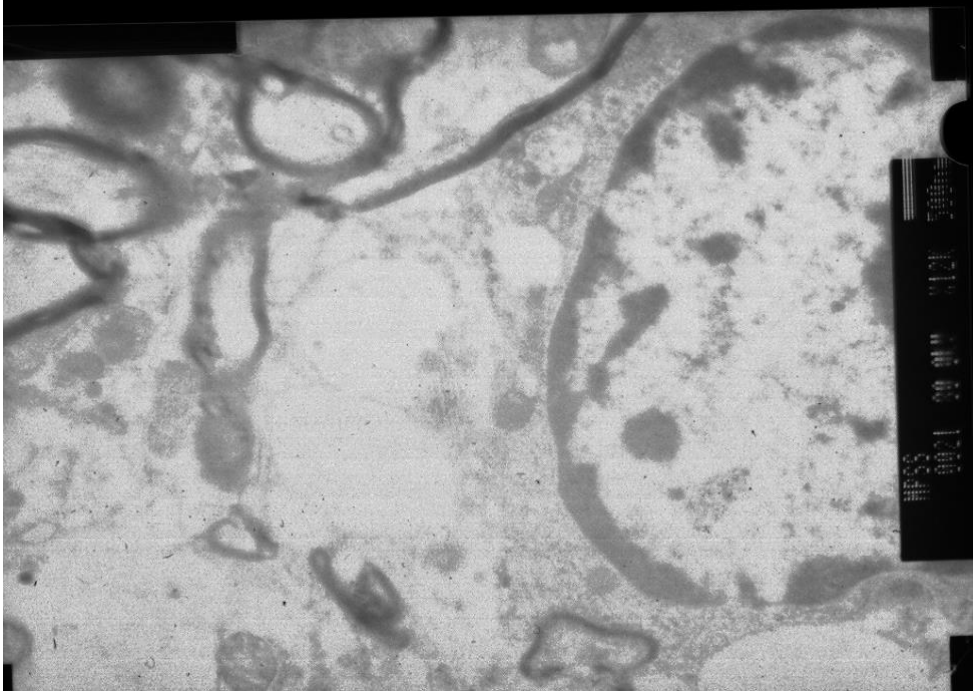
A: Amifostine

K:Kontrol

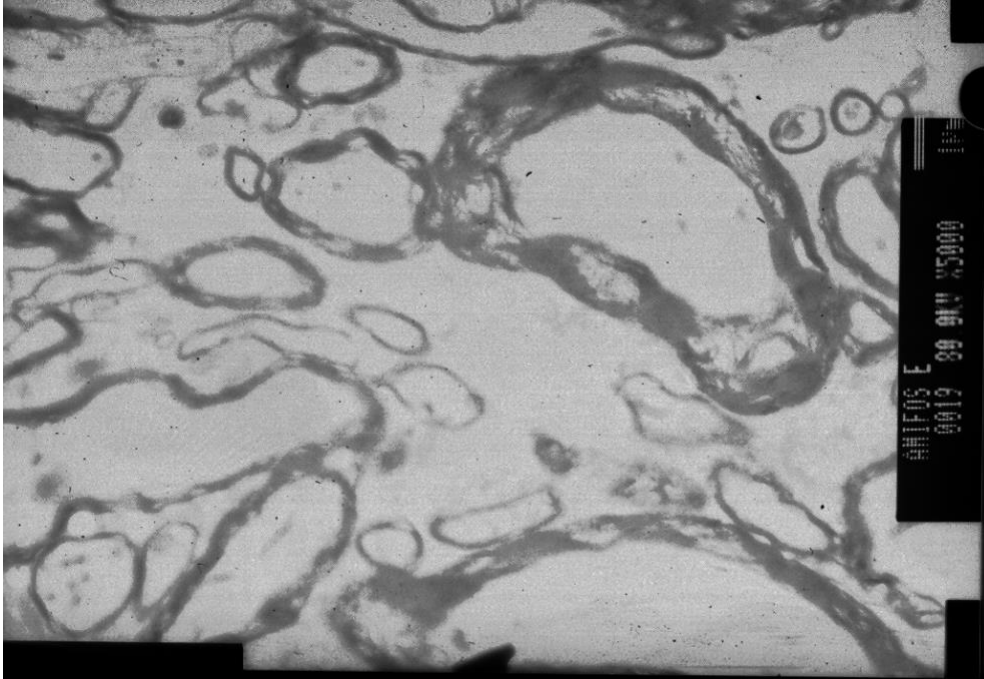
M:MPSS, Metil prednisolon

T: Travma

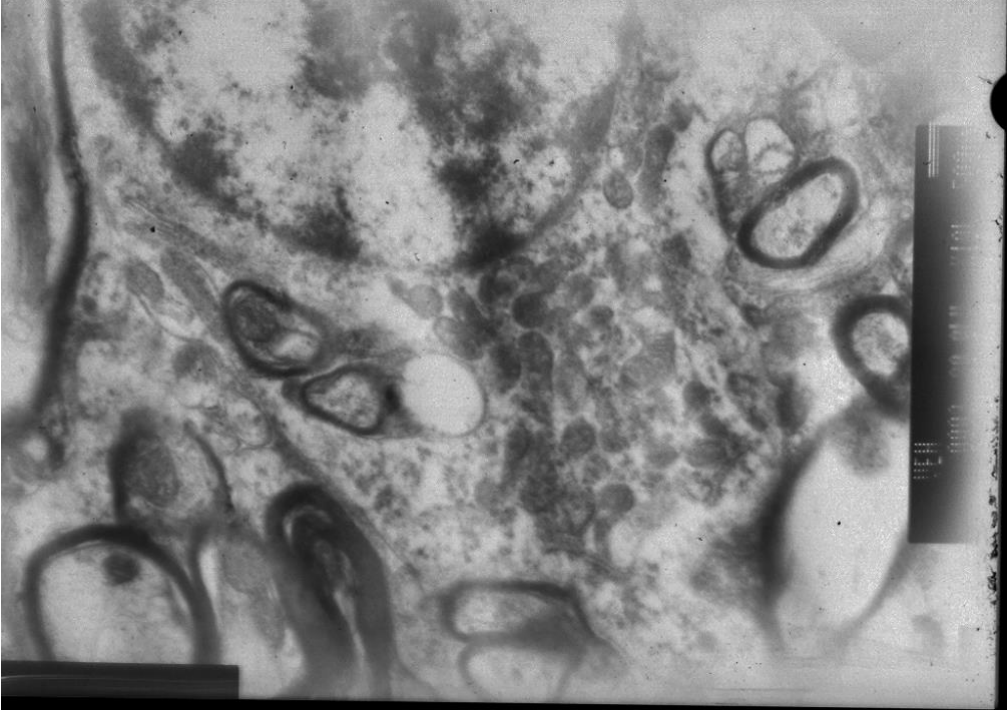
V:Vehicle



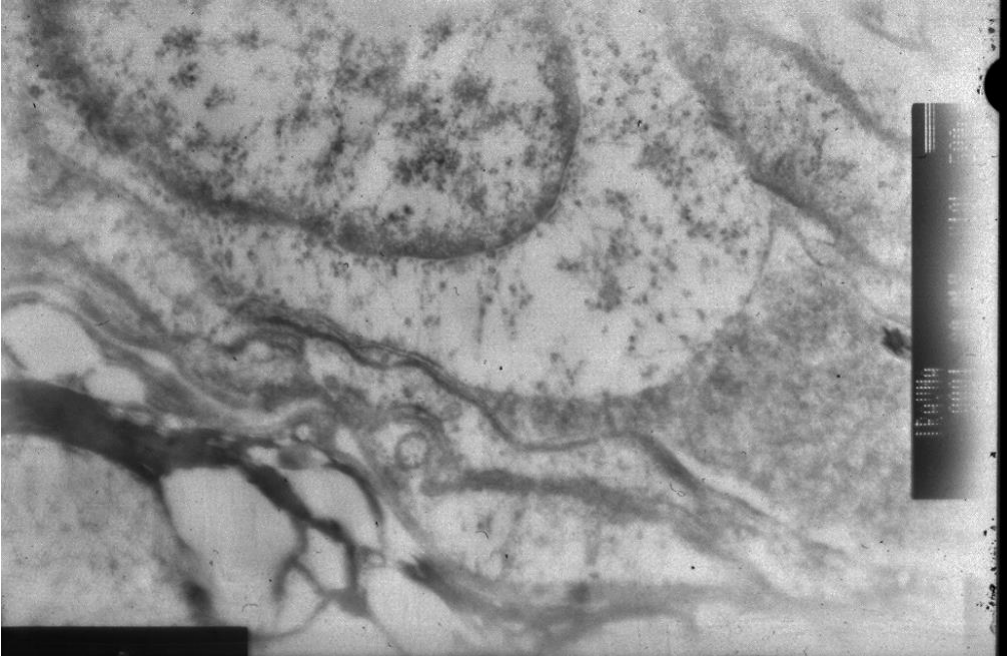
Resim 1: MPSS grubuna ait spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nukleus normal. Mitokondrilerde şişme ve mitokondrilerin kristalarında belirginleşme görülmektedir. Küçük vakuoller mevcuttur.



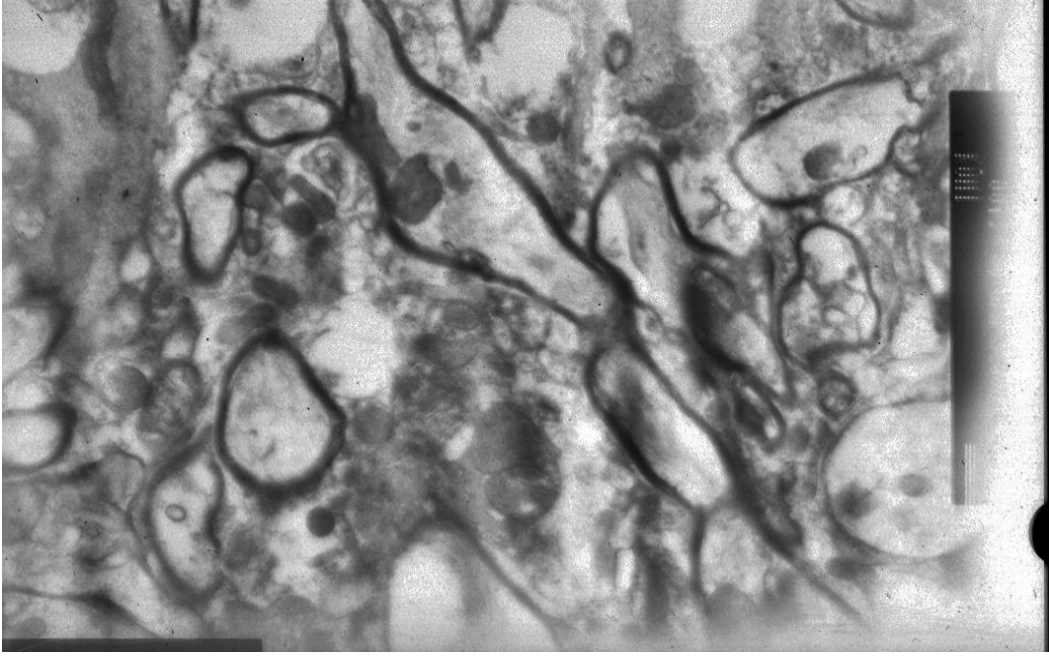
Resim 2: Amifostine gruna ait spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nukleus normal. Mitokondri çok az şişmiş. Küçük vakuoller yok.



Resim 3: Vehicle grubuna ait spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünüm. Mitokondrilerde ileri derecede şişme, kristalarda ileri derecede belirginleşme ve küçük vakuoller görülmektedir.



Resim 4: Travma grubuna ait spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünüm. Mitokondrilerde ileri derecede şişme olup krista gözlenmiyor. Vezikül dejenerasyonu tüm sahalarda mevcut.



Resim 5: Kontrol grubuna ait normal spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü görülmektedir.

7. TARTIŞMA

Spinal kord yaralanmaları geçmişte olduğu gibi günümüzde de önemini koruyan ciddi bir sağlık problemidir. Spinal kord yaralanması iki aşamada gerçekleşir¹. İlk aşamada travmanın şiddetine ve oluş şekline bağlı olarak, primer yaralanma olur. İkinci aşamada ise, primer yaralanmadan sonraki saatler ve günler içerisinde ortaya çıkan bir dizi fizyopatolojik sürece bağlı olarak sekonder yaralanma gelişir^{1,37,38,42,60,61}. Spinal kord yaralanmalarının tedavisindeki temel yaklaşım sekonder yaralanmanın önlenmesine yöneliktir. Sekonder yaralanmadan hemorajik nekroz, iskemi, ödem, inflamasyon, ekstrasellüler mesafeden Ca^{+2} ve intrasellüler mesafeden K^{+} kaybı gibi patofizyolojik olaylar sorumlu tutulmuşlardır⁴². Sekonder hasarı engellemek için magnezyum, kalsiyum kanal blokerleri, NMDA reseptör blokerleri, serbest radikal tutucular gibi birçok madde deneysel spinal kord hasarında denenmekle birlikte sadece MPSS geniş klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Ancak bunun da sekonder hasar mediatörlerine etkisi yeterli görülmemektedir^{37,38,60,61,63}.

Spinal kord yaralanmasında en önemli patofizyolojik mekanizmalardan biri de serbest oksijen radikallerinin travma sonrası artması ve buna eşlik eden lipid peroksidasyon ile birlikte sekonder doku hasarına yol açmasıdır²⁸. Antioksidanlarla yapılan çalışmalarda posttravmatik iskemi, ödem, inflamasyon ve iyon akımlarının değişmesi ile indüklenen membran fosfolipidlerinin ve lipazların aktivasyonu sekonder hasar gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Birçok deneysel çalışmada bu yol üzerine etki ederek oluşturulabilecek sinir koruyuculuğunda birtakım ilaçların etkili olabileceği gösterilmiştir. Kaptanoğlu ve arkadaşlarının deneysel spinal kord travması modelinde yaptıkları bir çalışmada, lipid peroksidasyonun ve serbest oksijen radikallerinin sekonder hasar mekanizmalarında önemli rol üstlendikleri belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, bu yolların engellenmesi durumunda, elektron mikroskopik olarak da hücre ultrastrüktürlerinin de korunduğu gösterilmiştir¹³⁵. Bu maddelerin etkilerinin, membran peroksidatif reaksiyonları önleme ve membran fosfolipidlerinden yağ asitlerinin serbestleşmesini inhibe etme yetenekleri ile doğrudan ilişkili olduğu belirtilmiştir²⁶. Travmatik spinal kord yaralanmasında lipid peroksidasyonunun zaman

ile olan ilişkisini ortaya koyan Barut ve arkadaşları tarafından ratlarda oluşturulan klip kompresyon travmasından sonra MDA düzeyleri bakılmıştır. MDA'nın 15. dakikada artmaya başladığı, 1. saatte maksimum düzeye ulaştığı ve ancak 3. günde kontrollerin seviyesine kadar indiği bildirilmiştir¹³². Yine, Fujimoto T ve arkadaşları, deneysel spinal kord travmasında hasara bağlı ortaya çıkan serbest oksijen radikallerinin; vazoaktif aminlerin, eksitotoksik aminoasitlerin, eikosonoidlerin ve araşidonik asitlerin salınımının artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca aynı sebeple serbest oksijen radikalleriyle indüklenen lipid peroksidasyonun da artarak sekonder hasarın artmasında önemli bir etken olduğunu göstermişlerdir¹³⁶. Bu çalışmalar, travmatik spinal kord hasarı sonrasında oluşan doku hasarında, serbest oksijen radikal bağımlı lipid peroksidasyonun önemli fonksiyonel rolü olduğunu göstermektedir. Öyleyse, lipid peroksidasyon inhibisyonu spinal kord hasarının tedavisi için önemli bir stratejik hedef olabilir.

Amifostine, kanser tedavisinde kullanılan radyoterapiden sonra ortaya çıkabilen merkezi sinir sistemi hasarını önlemek için kullanılan sitoprotektif bir ilaçtır. Merkezi sinir sistemine uygulanan radyasyondan sonra mikrovasküler hasar ortaya çıktığı bilinmektedir. Neider ve arkadaşları, radyasyon sonrası ortaya çıkan MSS toksisitesinden radyasyon bağımlı damar hasarının ve etrafında gelişen perifokal ödem alanının sorumlu olduğunu bildirmişlerdir¹³¹. Yine Neider ve arkadaşları ile Ginapolu ve arkadaşlarının döllenmiş yumurtaların area vasculozalarına uyguladıkları radyasyondan sonra kan damarı yapımının azaldığını ve mevcut olanların da hasarlandığını göstermişlerdir^{131,133}. Bu bulgular ışığında Kruse ve arkadaşları, ratlarda kalp radyasyon modelinde verilen sistemik Amifostine sonrasında perivasküler ve intersitisyel fibrozisde azalma olduğunu belirtmişlerdir¹³⁴. Bu bulgular MSS toksisitesinin en önemli komponentlerinden biri olan vasküler hasara karşı sistemik Amifostine'nin kullanılması umudunu doğurmuştur. Yine Neider ve arkadaşları, yaptıkları in vitro çalışmada, sistemik Amifostine'nin hem radyasyon sonrası hem de radyasyon harici kullanımlarında, endotel proliferasyonunu artırdığını göstermişlerdir.

Nöroproteksiyon, spinal korddaki nöronların rejenere olma kabiliyetinin bulunmaması nedeniyle son derece önemlidir. Nöroproteksiyon muhtemel iki yolla olmaktadır. İlk olarak, hasarlı hücrelerin iyileşmesi için gereken aksonal yolların yanında hasarlı nöronlara da nörotropik ve metabolik destek sağlayarak, ikinci olarak da; hücrelerden sitokinler ve serbest radikaller gibi komşu hücrelere de ek toksik etki yapan ve daha fazla nörodejenerasyona neden olan mediatörlerinin ortaya çıkmasını ve meydana gelen hücresel şişme, inflamasyon ve oksidatif stresi engelleyerek 65.

Deneyssel akut spinal kord yaralanmalarından sonra bu mediatörlerin yüksek bulunması, bu moleküllerin nörodjenerasyon döngüsünü aktive edebilme potansiyeline sahip olabileceklerini gösterebilmektedir 90. Bunlar, glutamat salınımı ve intrasellüler Ca^{+2} seviyeleri artışı da içeren merkezi sinir sistemi nekrozu ile klasik olarak birliktelik gösteren molekülleri de içerir 18,55 56 62 65,89,90. Glutamat MSS travmasını takiben hızla salınır 23, 24, 90. Günümüzde, hasarla indüklenmiş glutamat salınım artışı, intrasellüler Ca^{+2} artışı ve hücre ölümü arasındaki ilişki açık değildir. Amifostine KBB'yi geçemez veya çok küçük miktarlarda geçebilir. Ancak radyasyon sonrasında sürekli bir geçiş olduğu saptanmıştır. 59, 89 Neider ve arkadaşları radyoterapi sonrası artan KBB permeabilitesinin Amifostine'nin yeterli miktar penetrasyonuna da izin verdiğini belirtmişlerdir. Lamproglou ve arkadaşları, radyoterapiye bağlı beyin hasarında sistemik yolla verilen 75 mg/kg ve 100 mg/kg Amifostine'nin glutamat salınımını azaltarak nöroprotektif etki gösterdiğini belirtmişlerdir 129

Spence ve arkadaşları'nın ratlarda yaptığı çalışmada, sağ lateral serebral ventrikül içine Amifostine verilmiştir. Takiben 45 dakika sonra hayvanların servikal spinal kordlarına tek doz fraksiyone radyasyon verilmiştir. Her rat haftalık olarak el ve bacak paralizi bulguları yönünden incelenmiştir. Sonuç olarak servikal spinal kordda nöroproteksiyon olduğu gösterilmiştir. Ayrıca histolojik inceleme yapılmış ve hücre yapısının korunduğu gözlenmiştir. Bu etkinin de beyaz cevher ve vasküler elemanlarda koruma yaparak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Ancak aynı etki servikal spinal korddan çıkan schwann hücreleri ile kaplı

periferik sinirlerde görülememiştir¹³⁰. Van der Kogel'in çalışmasında, 20- 40 Gy aralıkta rat spinal korduna uygulanan radyoterapi sonrasında beyaz cevherde nekroz ve demiyelinizasyon 4-7 ay sonra değerlendirilmiş ve sonuçlar Spence ve arkadaşları'nın yaptığı çalışmaya benzer bulunmuştur.¹²⁶ Çalışmamızda, elektron mikroskopik inceleme sonunda Amifostine verilen grupta, diğer gruplardan farklı olarak nükleus ve mitokondri korunmuş olarak saptandı. Ayrıca, başta küçük çaplı miyelinli liflerde olmak üzere hücre içi yapıların korunduğu gözlemlendi.

Radyasyonun MSS toksisitesindeki önemli komponentlerinden birisi de, hücre membranlarındaki doymamış lipidlerde peroksidasyon reaksiyonalarını başlatan oksijenden derive edilmiş serbest radikallerin üretimidir. Serbest radikaller protein yapılarla, nükleik asitler ve DNA'yla, hücrenin enerji kaynağı olan karbonhidratlarla reaksiyona girerek, orijinal yapıyı bozarlar. Sinir sistemi poliansatüre yağlardan zengindir. Poliansatüre membran lipidlerinin serbest radikallerle peroksidasyonu nöronal hasarın gelişmesinde önemli bir mekanizmadır. Serbest radikaller hasardan sonraki erken dönemde görüldüğü için, bu önemli problem travma sonrası erken dönemde verilecek etkili bir nöroprotektif ajan geliştirmek gerekliliğini de vurgulamaktadır. Çalışmamızda, omuriliğe uygulanan kontüzyon travmasından hemen sonra verilen 200mg/kg Amifostine, lipid peroksidasyonu travma, vehicle ve MPSS gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür.(Tablo 8) Neider ve arkadaşları ile Lamproglou ve arkadaşları Amifostine'nin bu etkisini, radyasyonu iyodine ederek üretilen süperoksid anyonları serbest radikallerine karşı bir çöpçü gibi etkiyerek ortamdan uzaklaştırarak gösterdiğini bildirmişlerdir ^{129,131}. Ayrıca Amifostine'nin memeli MSS'de major antioksidan sistem olan endojen glutatyon konsantrasyonunu da artırarak hem hasarlı dokuda koruma yaptığı hem de etraf sağlam dokuları da dirençli hale getirdiği düşünülmektedir^{129,131}.

Çalışmamızda, travma uygulanmaksızın sadece laminektomi yapılan kontrol grubunda lipid peroksidaz aktivitesinde artış görülmemiştir. Çünkü Kaptanoğlu ve

arkadaşlarının da daha önce belirttiği gibi, laminektominin spinal kordda hasar yapıcı etkisi yoktur³⁷.

Amifostine, SF içinde çözündüğü için bir gruba da (Vehicle) SF verildi. Ancak şu ana kadar, akut spinal kord yaralanmasındaki etkisi bildirilmemiştir^{36,37,38,60}. Çalışmamızda SF verilen grup ile travma grubu arasındaki lipid peroksidaz aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Tablo 8). Bu da verdiğimiz dozdaki SF'in nöroprotektif etkisinin olmadığını göstermektedir. Bu sonuç elektro mikroskopik inceleme sonucuyla da korele bulunmuştur (Resim 3).

Günümüze kadar, travmatik spinal kord yaralanmasında etkinliği gösterilmiş ve klinik olarak da kullanılan tek farmakoterapötik MPSS'dir. Ancak, son zamanlarda spinal kord travmasındaki etkileri ve ortaya çıkardığı komplikasyonlar tekrar tartışmalara sebep olmakta ve kullanımı sınırlandırılmaktadır⁹¹. Çalışmamızda, MPSS grubuna klinikte insanda kullanıldığı dozda travmadan hemen sonra 30 mg/kg bolus uygulanmış ve Amifostine ve kontrol grupları ile arasında istatistiksel anlamda farklılık saptanmıştır ($p<0.05$) (Tablo 8). MPSS nöroprotektif etki göstermekle birlikte, Amifostine kadar iyi değildir.

Literatürde, Amifostine'nin radyasyon hasarına karşı MSS'deki nöroprotektif etkileri ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sınırlı olmakla birlikte mevcuttur. Ancak gerek beyin gerekse spinal kord üzerinde iskemik ya da travmatik modellerdeki nöroprotektif etkileri ile ilgili çalışma mevcut değildir. Bu çalışma akut spinal kord kontüzyon hasarında Amifostine'nin nöroprotektif etkisini incelemek açısından ilk olmuştur.

Sonuç olarak, akut spinal kord kontüzyon yaralanması sonrası intraperitoneal olarak verilen 200mg/kg Amifostine'nin, lipid peroksidaz aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaltarak, MPSS'den daha etkili bir nöroprotektif ajan olduğu gösterilmiştir

8. SONUÇ

Spinal kord travmasının tedavisinde elimizde hala etkin bir tedavi yoktur. Daha önce çalışılmamış bir noktaya ışık tutmak amacıyla yapmış olduğumuz bu deneysel çalışmada, etkisi kanıtlanmış ve bugün için kliniklerimizde kullanabildiğimiz tek ilaç olan metilprednisolonu karşılaştırma grubu olarak kullandık. Sitoprotektif ve radyoprotektif etkili olan ve klinik kullanımı olan Amifostine'in spinal travmadaki sekonder hasardan koruyucu etkisini araştırdık. Bu çalışmamız Amifostine'nin spinal travmadaki etkisini gösteren ilk çalışmadır.

Sonuçta sekonder hasardan koruyucu etkinin biyokimyasal olarak Metilprednisolon'dan daha iyi olduğunu gösterdik (Tablo 8). Amifostine'nin nöronların hücre içi organellerini, tüm membranlarını, miyelin kılıfı ve aksonlarını metilprednisolona göre daha iyi korumuş olduğu elektronmikroskopik olarak da gösterilmiş oldu (Resim 2).

Sonuç olarak, akut spinal kord kontüzyon yaralanması sonrası intraperitoneal olarak verilen 200 mg/kg Amifostine'nin, lipid peroksidasyon aktivitesini belirgin olarak azaltarak, omuriliği sekonder hasardan MPSS'den daha iyi koruyan bir nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.

Amifostine' nin spinal travmadaki etkisini gösteren ilk çalışmamız, umuyoruz ki yakın gelecekteki ileri çalışmalar neticesinde spinal kord travması tedavisinde yerini alacaktır.

9. REFERANSLAR

1. Amar AP, Levy ML: Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurgery 44: 1027–1040,1999.

2. Agrawal SK, Fehling MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci* 17:1055–1063, 1997.
3. Anderson DK, Demediuk P. Spinal cord injury and protection. *Ann Emerg Med* 14: 816–821, 1985.
4. Anthes DL, Theriault E, Tator CH. Ultrastructural evidence for arterial vasospasm after spinal cord trauma. *Neurosurg* 39:804–814, 1996.
5. Banik NL, Hogan EL. Molecular and anatomical correlates of spinal cord injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2:99–107, 1985.
6. Bracken MB, Shepard MJ. Methylprednisolone or naloxone treatment after acute spinal cord injury: 1 year follow-up data. *J Neurosurg* 76: 23–31, 1992.
7. Bracken MB, Shepard MJ. Administration of methylprednisolone for 24–48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. *JAMA* 1997; 277: 1597–1997. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier JM, Sonntag VKH, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W: Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial—National Acute Spinal Cord Injury Study. *JAMA* 277:1597–1604, 1997.
8. Braughler RW, Duncan LA. Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma* 2: 269–283, 1985.
9. Braughler JM and Hall ED. Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effect on Na-K-ATPase, lipid peroxidation and alpha motor neuron functions. *J Neurosurg* 56:838–844, 1982.
10. Braughler JM, Hall ED. Effects of multidose methylprednisolone sodium succinate administration to an injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurg* 61:290–295, 1984.
11. Braughler JM, Hall ED, Means ED, Waters TR, Anderson DK. Evaluation of an intensive methylprednisolone sodium succinate dosing regimen in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg* 67:102–105, 1987.
12. Bracken MB. Treatment of acute spinal cord injury with methylprednisolone: results of a multicenter, randomized clinical trial. *J Neurotrauma* 8:S47–S50, 1991.
13. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, Eisenberg HM, Flamm E, Leo-Summers L, Maroon J, Marshall LF, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VKH, Wagner FC, Wilberger JE, Winn HR. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal cord injury: Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS-2). *N Engl J Med* 322:1405–1411, 1990.
14. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings MG, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier JM, Sonntag VKH, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W: Methylprednisolone or tirilazad mesylate administration after acute spinal cord injury: 1-year follow-up—Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *J Neurosurg* 89:699–706, 1998.
15. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL et al.: Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nature Med* 3:73–76, 1997.
16. Katah K, Ikata T, Katoh S. Et al: Induction and its spread of apoptosis in rat spinal cord after mechanical trauma. *Neuroscience Lett* 216: 9–12, 1996.
17. Choi DW. Calcium specific mediated neurotoxicity: Relationship to channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465–469, 1988.
18. Choi DW: Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261–1276, 1992.
19. Liu XZ, Xu Xm, Hu R et al.: Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 17: 5395–5406, 1997.
20. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3:73–76, 1997.
21. De La Torre JC. Spinal cord injury: review of basic and applied research. *Spine* 6:315–335, 1981.
22. Yong C, Arnold PM, Zoubine MN, et al.: Apoptosis in cellular compartments of rat spinal cord after severe contusion injury. *J Neurotrauma* 15:459–472, 1998.
23. Dihne M, Block F, Korr H, Töpper R. Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury. *Brain Res* 902:178–189, 2001.
24. Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW, Bethea J, Levi ADO. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg* 89:911–920, 1998.
25. Faden AI, Jacops TP. Effect of TRH analogs on neurologic recovery after experimental spinal trauma. *Neurology* 35:1331–1334, 1985.
26. Anderson DK, Demediuk P: Spinal cord injury and protection. *Ann Emerg Med*; 14:816–821, 1985.
27. Giulian D, Robertson C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. *Ann Neurol* 27: 33–42, 1990.

28. Benzel EC, Tator CH: Contemporary Management of Spinal Cord Injury. İllionis, AANS Press 1995.
29. Greene K. Pharmacological management of spinal cord injury: Current status of drugs designed to augment functional recovery of the injured human spinal cord. *J Spinal Dis* 9:355–366, 1995.
30. Guha A, Tator CH. Acute cardiovascular effects of experimental spinal cord injury. *J Trauma* 28: 481–490, 1988.
31. Hall ED, Wolf DL. A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of post-traumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg* 64; 951–961, 1986.
32. Braughler JM, Hall ED: Correlation of methylprednisolone levels in cat spinal cord with its effect on $(Na^+ + K^+)$ -ATPase, lipid peroxidation, and alpha motor neuron functions. *J Neurosurg*; 56:838–84, 1982.
33. Braughler JM, Hall ED: Effects of multi-dose methylprednisolone sodium succinate administration on injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurgery*; 61:291–295, 1984.
34. Hall ED: The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg*; 76:13–22, 1992.
35. Hall ED, Braughler JM: Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and $(Na^+ + K^+)$ -ATPase activity. *J Neurosurg*; 57:247–253, 1982.
36. Kaptanoğlu E, Tuncel M, Palaoglu S, Konan A, Demirpençe E, Kılınç K. Comparison effect of melatonin and methylprednisolone in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 1)* 93: 77–84, 2000.
37. Kaptanoğlu E, Caner HH, Surucu SH., Akbiyik F. Effect of mexiletine on lipid peroxidation and early ultrastructural findings in experimental spinal cord injury. *J Neurosurg (Spine 2)* 91:200–204, 1999.
38. Kaptanoğlu E, Palaoglu S, Surucu S, Hayran M, Beskonaklı E. Ultrastructural scoring of acute spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg (Spine 1)* 97:49–56, 2002.
39. Hall ED, McCall JM: A non-glucocorticoid steroid analog of methylprednisolone duplicates its high dose pharmacology in models of central nervous system trauma and neuronal membrane damage. *J Pharm Exp Therap*; 242:137–142, 1987.
40. Kato T, Takeda Y, Nakada T. Inhibition by dexamethasone of human neutrophil apoptosis in vitro. *Nat Immunol* 14: 198–208, 1995.
41. Saunders RD, Dugan LL: Effects of methylprednisolone and the combination of alpha tocopherol on selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem*; 49:24–31, 1987.
42. Kehrer JP. Free radicals on mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 23: 21–48, 1993.
43. Tator CH, Fehlings MG: Review of the Secondary Injury Theory of Acute Spinal Cord Trauma with Emphasis on Vascular Mechanisms. *J Neurosurg*; 75:15–26, 1991.
44. Tator CH, Rowed DW: Management of acute spinal cord injuries. *Can J Surg*; 27:289–294, 1984.
45. Koyanagi I, Tator CH. Effect of a single high dose of methylprednisolone on blood flow, evoked potentials, and histology after acute spinal cord injury in the rat. *Neurol Res* 19:289–299, 1997.
46. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurological disorders. *N Engl J Med* 330: 613–622, 1994.
47. Markatos SG, Skiadas PK, Galen. A pioneer of spine research. *Spine* 24:2358–2362, 1999.
48. Perez CA, Brady LW, Roti JLR: Overview; in Perez CA, Brady LW(eds): Principles and Practice of Radiation Oncology(third edition). Philadelphia, New York, Lippincott-Raven, , pp 1–78, 1998.
49. Yeldandi AV, Kaufman DG, Reddy JK: Cell injury and cellular adaptation; in Damjanov I, Linder J(eds): Anderson's Pathology(10th edition). St Louis, Mosby-Year Book Inc, pp.357–386, 1996.
50. Naderi S, Zileli M, Özer AF. Omurga cerrahisinin tarihçesi. Omurga ve Spinal kord Cerrahisi. Editörler: M. Zileli, AF. Özer. Bölüm:1. Sayfa: 1–13, 2002, İzmir.
51. Nashmi R, Fehlings MG. Role of voltage gated K^+ channels in the pathophysiology of spinal cord injury. *Modulator* 14:5–9, 2001.
52. Nemecek S. Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Adv Neurol* 20: 395–405, 1978.
53. Nittoh T, Fujimori H, Kozumi Y. Effects of glucocorticoids on apoptosis of infiltrated neutrophils. *Eur J Pharmacol* 354: 73–81, 1998.
54. Regan FR. The vulnerability of spinal cord neurons to excitotoxic injury: Comparison with cortical neurons. *Neurosci Lett* 213:9–12, 1996.
55. Schuchter LM, Current role of protective agents in cancer treatment. *Oncology*, 11:505–516, 1997.
56. Schanne FA, Kane AB, Young EE. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science* 206:700–702, 1979.
57. Schwab ME, Bratoldi D. Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76: 319–370, 1996.
58. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 50:798–808, 1997.
59. Capizzi RL. Clinical status and optimal use of amifostine. *Oncology*, 13:47–59, 1999.

60. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia-reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Childs Nerv Syst* 19:19-22, 2003.
61. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 56:341–358, 1998.
62. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol* 5:407–413, 1995.
63. Tator CH. Acute management of spinal cord injury. *Br J Surg* 77:485–486, 1990.
64. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with special emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 75:15–26, 1991.
65. Tator CH, Duncan EG, Edmonds VE. Neurological recovery, mortality and length of stay after acute spinal cord injury associated with changes in management. *Paraplegia* 33:254–262, 1995.
66. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53:451–465, 1997.
67. Young W. Secondary CNS injury. *J Neurotrauma* 5:219–221, 1988.
68. Athar M., Abdulla H., Sultana S., Favier A. and Pero R. Free radicals and trace elements. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, ; 6: 65–73, 1993.
69. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* ; 27:1124-29., 1996.
70. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*; 3:465–9,1996.
71. Darley-Usmar V, Hogg N, Kalyanarman B, Moore K. Free radicals in the vasculature: pathological and physiological significance. In: Rice-Evans CA, Bruckdorfer KR. *Oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction*, London, Portland Press, ; pp. 81–99,1995.
72. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal in in situ perfused rat kidney. *J Lipid Res*; 38:1660–5, 1997.
73. Frei B. Molecular and biological mechanisms of antioxidant action *FASEB J*; 13:963–4,1999.
74. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem*; 41(12):1819–28, 1995.
75. Hartmann A, Yatsu F, Kuschinsky W. *Cerebral ischemia and Basic Mechanisms*, Berlin, Springer-Verlag Press, Heidelberg, pp. 405–10, 1994.
76. Hue RT, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun*; 18:1620–24, 1993.
77. Rice-Evans CA Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: Rice-Evans CA, Burdon RH. *Free radical damage and its control*. England, Elsevier Science Press, pp. 131–53, 1994.
78. İşlekel H, İşlekel S, Güner G, Özdamar N. Evaluation of lipid peroxidation cathepsin L and acid phosphatase activities in experimental brain ischemia-reperfusion. *Brain Res*; 843,18–24, 1999.
79. İşlekel S, İşlekel H, Güner G, Özdamar N. Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion *Res Exp Med*; 199 (3):167–76,1999.
80. Kilgore KS, Lucchesi BR. Reperfusion injury after myocardial infarction: The role of free radicals and the inflammatory response. *Clin Biochem*; 26:359–70,1993.
81. Kitagawa K, Matsumoto M, Oda T, Nobe M, Hata R. Free radical generation during brief period of cerebral ischemia may trigger delayed neuronal death. *Neuroscience*; 35 (3):551–8, 1990.
82. Lipton SA Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS. A redox based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*; 364:626–32, 1993.
83. McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem*; 26:351–7, 1993.
84. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Zoppo DGJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*; 25:1847–54, 1994.
85. Tominaga T, Sato S, Ohnishi J, Ohnishi ST. Potentiation of nitric oxide formation following bilateral carotid occlusion and focal cerebral ischemia in the rat: in vivo detection of nitric oxide radical by electron paramagnetic resonance spin trapping. *Brain Res*; 614:342–6, 1993.
86. White BC, Grossman LI, Krause GS. Brain injury by global ischemia and reperfusion: a theoretical perspective on membrane damage and repair. *Neurology*; 43:1656–65, 1993.
87. Witko SV, Friedlander M, Capeillere BC, Nguyen KT, Nguyen AT, Zingraff J, Jungers P, Descamps LB. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*; 49:1304–13, 1996.
88. Capizzi RL, Schein PS. Chemo and radiation protection with amifostine. *Advances in Biosciences*,94:91–101.
89. Kalaycioğlu M, Bukowski R. Clinical status of the new cytoprotective agents, amifostine. *Oncology*,8:15–23, 1994.

90. Capizzi RL. Amifostine: The preclinical basis for broad-spectrum selective cytoprotection of normal tissues from cytotoxic therapy. *Semin Oncol*, 23: 2–17, 1996.
91. Korst AE, Eeltink CM, Vermorken JB, et al. Pharmacokinetics of amifostine and its metabolites in patients. *Eur J Cancer*, 33: 1425–1429, 1997.
92. Listz AF. Use of amifostine in hematologic malignancies, myelodysplastic syndrome, and acute leukemia. *Semin Oncol*, 2: 61–65, 1999.
93. Listz AF, Heaton R, Glinsman-Gibson B, et al. Amifostine protects primitive hematopoietic progenitors against chemotherapy cytotoxicity. *Semin Oncol*, 23: 58–63, 1996.
94. Wesserman TH, Philips TL, Ross G, et al. Differential protection against cytotoxic chemotherapeutic effects on bone marrow CFU's by WR-2721. *Cancer Clin Trials*. 4: 3–6, 1981(abs).
95. Alberts DS. Protection by amifostine of cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Semin Oncol*. 26: 37–40, 1999.
96. Fulda S, Oster W, Berthold F. Effects of WR-2721(amifostine) and its metabolite WR-1065 on the antiproliferative activity of chemotherapeutic agents on neuroblastoma cells in vitro. *Anticancer Drugs*, 8: 34–41, 1997(abs).
97. Dorr RT, Holmes BC. Dosing considerations with amifostine: a review of the literature and clinical experiences. *Semin Oncol*, 2: 108–119, 1999.
98. Aviles A, Diaz-Maqueo JC, Talavera A, et al. Bone marrow protection with amifostine in the treatment of high-risk malignant lymphoma. *Eur J Cancer*, 33: 1323–1325, 1997.
99. Wasserman T. Radioprotective effects of amifostine. *Semin Oncol*. 26: 89–94, 1999.
100. Werner-Wasik M. Future development of amifostine as a radioprotectant. *Semin Oncol*. 26: 129–134, 1999.
101. Shpall EJ, Stemmer SM, Hami L, et al. Amifostine(WR-2721) shortens the engraftment period of 4-hydroperoxycyclophosphamide-purged bone marrow in breast cancer patients receiving high dose chemotherapy with autologous bone marrow support. *Blood*, 83: 3132–3137, 1994.
102. Douay L, Hu C, Giarratana MC, et al. Amifostine improves the antileukemic index of mafosfamide: Implications for bone marrow purging. *Blood*, 86: 2849–2855, 1995.
103. Patchen ML, Mac Vittie TJ. Granulocyte colony stimulating factor and amifostine (Ethyol) synergize to enhance hematopoietic reconstitution and increase survival in irradiated animals. *Semin Oncol*, 21: 26–32, 1994.
104. Liu T, Liu Y, He S, et al. Use of radiation with or without WR-2721 in advanced rectal cancer. *Cancer*, 69: 2820–2825, 1992.
105. Douay L, Hu C, Giarratana MC, et al. Comparative effects of amifostine(Ethyol) on normal hematopoietic stem cells versus human leukemic cells during ex vivo purging in autologous bone marrow transplants. *Semin Oncol*, 21: 16–20, 1994.
106. Poloni A, Leoni P, Curzi L, et al. Ex vivo pharmacological purging of leukapheresis collections with nitrogen mustard: amifostine pretreatment improves both early and late peripheral blood progenitor cell recovery. *Exp Hematol*, 27: 1548–1556, 1999(abs).
107. Cagnoni PJ, Jones RB, Berman SI, et al. Use of amifostine in bone marrow purging. *Semin Oncol*, 23: 44–48, 1996.
108. Stemmer SM, Shpall EJ, Jones RB, et al. Amifostine(WR-2721) shortens the engraftment time of 4-hydroperoxycyclophosphamide(4-HC) purged bone marrow in lymphoma patients receiving high dose chemotherapy(HDC) with autologous bone marrow support(ABMS). *Blood*, 80: 70, 1992(abs).
109. Allen AR: Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column. Preliminary report. *JAMA* 57: 877–880, 1911.
110. Amar AP, Levy ML: Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 44: 1027–1040, 1999.
111. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Gren ES: Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg* 56: 106–113, 1982.
112. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, et al: Methylprednisolone in acute spinal cord injury. *JAMA* 251; 1: 45–52, 1984.
113. Buege JA, Aust SD: Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 12: 302–310, 1978.
114. Collins WF: A review and update of experimental and clinical studies of spinal cord injury. *Paraplegia*. 21: 204–219, 1983.
115. Çolak A, Nurlu G, Açıkgöz B, Özcan OE, Aydın E: A new experimental model: For further investigation of secondary changes following spinal cord injury. *J Neurosurg Sci* 38: 11–116, 1994.
116. Demediuk P, Saunders RD, Clendenon NR, Means ED, Anderson DK, Horrocks LA: Changes in lipid metabolism in traumatized spinal cord. *Prog Brain Res* 63: 211–226, 1985.
117. Dohrmann GJ: Experimental spinal cord trauma. *Arc Neurol*, 27: 468–473, 1972.
118. Faden AI: Pharmacotherapy in spinal cord injury: A critical review of recent developments. *Clin Neuropharm* 10; 3: 193–204, 1987.

119. Hall ED: Neuroprotective actions of glucocorticoid and nonglucocorticoid steroids in acute neuronal injury. *Cell Mol Neurobiol* 13; 4: 415–432, 1993.
120. Iwasita Y, Kawaguchi S, Murata M: Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature* 367: 167–173, 1994.
121. Liao LM, Bergsneider M, Becker DP in: Youmans JR(ed): *Neurological Surgery*. W.B. Saunders Co. 4.th edition, 1997.pp.
122. Osterholm JL: The pathophysiological response to spinal cord injury. The current status of related research. *J Neurosurg* 40: 5*33, 1974.
123. Rivlin AS, Tator CH: Effects of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 9: 39–43, 1978.
124. Schwab ME, Bartholdi D: Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. *Physiol Rev* 76; 2: 319–370, 1996.
125. Tator CH: Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 37: 291–302, 1991.
126. Ang KK, Van Der Kogel Aj, Van Dam J et al: The kinetics of repair of sublethal damage in the rat cervical spinal cord during fractionated irradiations. *Radioter Oncol* 1: 247–253, 1984.
127. Guelman LR, Zorrilla Zubilete MA, Rios H et al: WR–2721(amifostine, ethiol) prevents motor and morphological changes induced by neonatal X-irradiation. *Neurochem Int* 42: 385–391, 2003.
128. Alaoui F, Pratt J, Tracherie S et al: Acute effects of irradiation on the rat brain: protection by glutamate blockade. *Eur J Pharmacol* 276: 55–60, 1995.
129. Lamproglou I, Djazouli K, Boissarie G et al: Radiation-induced cognitive dysfunction: the protective effect of ethiol in young rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 1109–1115, 2003.
130. Spence AM, Krohn KA, Edmondson SW et al: Radioprotection in rat spinal cord with WR–2721 following cerebral lateral intraventricular injection. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 12: 1479–1482, 1986.
131. Carsten Nieder, Nicolaus H. Andratschke, Nicole Wiedenmann and Michael Molls: Prevention of radiation-induced central nervous system toxicity: A role for amifostine? *Anticancer Research* 24,3803–3810, 2004.
132. Barut Ş, Canbolat A, Bilge T, Aydın Y, Çokneşeli B, Kaya U: Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 16: 1; 53–59, 1993
133. Giannopoulou E, Katsoris P, Parthymou A et al: Amifostine protects blood vessels from the effects of ionizing radiation. *Anticancer Res* 22: 2821–2826, 2002.
134. Kruse JJ, Strootman EG and Wondergem J: Effects of Amifostine on radiation-induced cardiac damage. *Acta Oncol* 42: 4–9, 2003.
135. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*. 2004 Apr;27(2):113–20. Epub 2003 Aug 14.
136. Fujimoto T, Nakamura T, Ikeda T, Taoka Y, Takagi K. Effects of EPC-K1 on lipid peroxidation in experimental spinal cord injury. *Spine*. 2000 Jan;25(1):24–9.