



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN SPİNAL KORD HASARI MODELİNDE
İZOALANTOLAKTON'UN
NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Basel TARAZİ

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2019**



**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN SPİNAL KORD HASARI MODELİNDE
İZOALANTOLAKTON'UN
NÖROİNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Basel TARAZİ**

**Tez Danışmanı
Prof.Dr. Melike MUT AŞKUN**

**ANKARA
2019**

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli hocam Prof. Dr. Melike Mut Aşkun'a saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilimsel, mesleki ve sosyal deneyimlerini benimle paylaşan, mükemmel bir çalışma ortamı sağlayan, cerrahi prensip ve mesleki özgüvenimin oluşmasında büyük emeği olan, yanında çalışmaktan onur duyduğum Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Servet İnci ve değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Mustafa Berker, Sayın Prof. Dr. Atilla Akbay, Sayın Prof. Dr. Halil Kamil Öge, Sayın Prof. Dr. Burçak Bilginer, Yard. Doç. Dr. Ahmet İlkyay Işıkyay'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, eğitimim boyunca beraber çalıştığım bütün araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışmanın hayata geçirilmesi için gerekli altyapı ve teknik desteği sağlayan Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü öğretim üyelerine, bu çalışmanın uygulanması esnasında benden desteklerini esirgemeyen Bio. Dr. Canan Çakır Aktaş'a , Patoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Figen Söylemezoğlu, Nöroşirurji Araştırma Görevlileri Dr. Alaeddin Acar, Dr. Beyler Beylerov, Dr. Şiyar Bahadır, Dr. M. Enes Gürses, Dr. Can Eker, Dr. Yakup Altuğ ve teknisyen Mesut Fırat'a, değerli Doç. Dr. Ercan Bal'a, Uzman Dr. Şahin Hanalioğlu'ya teşekkür ederim.

Tüm uzmanlık hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, hiçbir desteğini esirgemeyen, yaşadığım tüm zorluklara beraber göğüs gerdiğimiz, hayatımın her anına değer katan, çoğu zaman mesleğim gereği ihmal etmek zorunda kaldığım çok sevgili eşim Rose Marji Tarazi ve biricik kızım Katerina Tarazi'ye, hayatımın ilk öğretmenleri ve yol göstericileri olan, tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, hayattaki en büyük servetin bilim ve eğitim olduğuna inanan değerli babam İsa Tarazi ve annem Ghada Tarazi'ye, uzun eğitim hayatım boyunca, yanlarında olamadığım, dertlerime ve mutluluklarıma ortak olan, ağabeylerim Mohannad ve Hussam Tarazi'ye ve değerli kardeşim Majd Tarazi'ye destekleri için sonsuz teşekkürler ediyorum.

Tezimi değerli biricik kızıma ithaf ediyorum

ÖZET

Tarazi B. Sıçan spinal kord hasarı modelinde İzo-alantolakton'un nöroinflamasyon üzerine etkilerinin incelenmesi , Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, Ankara, Ağustos 2019

Giriş ve amaç: Spinal kord hasarı (SKH) birçok vücut fonksiyonunu etkileyen kompleks ve yıkıcı bir durumdur. Spinal kord travmasından sonra, hasar oluşumunu takiben ilk 24 saatte serbest oksijen radikallerinin üretimi, mitokondri fonksiyonlarının bozulması ve hasarlı hücrelerdeki (mikroglia, astrosit, nöron) potasyum ve genetik materyalin hücre dışına çıkması ile omurilik dokusunun özelleşmiş makrofajları olan mikroglialar aktifleşir. Prostaglandin E2, cyclooxygenase 2 (COX2), nitrooksidase (İNOS) ve aktifleşen mikroglialar tarafından TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır. Özetle, inflamasyon sürecinde görevli moleküler yolaklar aktive olur. Günümüzde temel tedaviler, bu hastaların hastaneye başvurusu, tanı konması ve tedavilerinin başlamasına kadar geçen süreçte, ikincil hasarın azaltılması üzerinedir.

İzoalantolakton (IAL), geniş biyolojik aktiviteye sahip yeni nesil bir ilaçtır. Yapılan çalışmalarda izoalantolakton'un antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca sıçan travmatik beyin hasarı modelinde nöroprotektif etkisi gösterilmesine rağmen, travmatik spinal kord hasarında bu ilacın etki mekanizmasını açıklayan bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, spinal kord travması modelinde intraperitoneal olarak sıçanlara enjekte edilen İzoalantolakton (IAL)'un travmadan 24 saat sonra nöroinflamasyon üzerine etkilerinin incelenmesi ve sık kullanılan bir anti-inflamatuvar ilaç olan metilprednizolon ile etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. 24. saatin sonunda post travmatik nörolojik değerlendirme yapıp sakrifiye edilmiştir. Daha sonra TNF- α , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler spinal kord dokusunda ELİSA yöntemi, IL-6, CD3, Mikroglia (Iba-1) ve Makrofaj (F4/80) antikoları, immünohistokimya yöntemi ile incelenip, kontrol gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Ayrıca inflamatuvar mediatörlerin sentezinden sorumlu olan transkripsiyon faktörü NF- κ B'nin alt birimi olan NF- κ B p65, immünohistokimyasal yöntem ile incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada her grupta 8 adet (n=8) olacak şekilde toplam 32 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Gruplar Sham grubu, travma grubu, travma ve Metilprednizolon uygulanan

grup, travma ve İzalantolakton uygulanan grup olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Sıçanlara ketamin / xylazine anestezisi altında 10 cm yükseklikten 15 gr serbest ağırlık düşürülerek spinal travma modeli oluşturulmuştur. Travmadan yarım saat sonra bir gruba tek doz intraperitoneal 20 mg/kg İzalantolakton , kontrol gruplarına ise intraperitoneal yolla serum fizyolojik veya 60 mg/kg Metilprednizolon intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm grupların sakrifiye edilmesinden önce davranış deneyleri yapılmış, 24. saatin sonunda sıçanlar sakrifiye edilerek gruplar arasında spinal dokularındaki histopatolojik ve immunhistokimyasal bulgular karşılaştırılmıştır.

Bulgular: İzalantolakton (IAL), travmatik spinal kord hasarında inflamasyonu çeşitli yollarla azaltmaktadır, bunlardan birisi NF-κB yolağıdır. IAL kullanarak spinal kord hasarında nörolojik olarak anlamlı bir iyileşme ve düzelme sağlandığı ($p < 0,0001$) saptanmıştır. IAL verilen grupta diğer gruplara göre NF-κB işaretli total hücre sayısı azalmıştır ($p < 0,0001$). IAL, NF-κB yolağı üzerinden gelişen nöro-inflamasyonu inhibe edici etkisi gösterilmiştir. IAL verilen grupta doku TNF-α ve IL-6 düzeyleri travma, ve Sham gruplarına göre azalmıştır ($p < 0,002$), Ancak bu bulgu MPZ alan travma grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($p = 0,068$). Bu durumun örneklem sayısının yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. IAL verilen grupta IL-6 ve TNF-α salınımı anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0,002$). Iba-1 ve F4/80 ile mikroglial ve makrofaj hücreler değerlendirildiğinde, IAL etkisi altında mikroglia aktivasyonu ve makrofaj göçünün anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ($p = 0,0025$), ($p = 0,0363$). IAL'nin travma sonrası gelişen mikroglia aktivasyonunu baskılamak yoluyla nöro-inflamasyonu azaltan etkileri gösterilmiştir ($p < 0,0001$), CD3 + T lenfositler IAL ile anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0,0084$). IAL histopatolojik olarak travma sonrası ödemi belirgin olarak azaltmıştır. Ayrıca nörodejeneratif görünümdeki hücre sayısında travma grubuyla karşılaştırıldığında bir düşüşe sebep olduğu da anlaşılmıştır.

Sonuç: Sonuç olarak IAL orta şiddette spinal travmaya bağlı nöro-inflamasyonda, makrofaj, mikroglia aktivasyonu ve NF-κB yolağını inhibe ederek nörolojik fonksiyonlarda düzelmeye katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Spinal kord hasarı, Metilprednizolon, İzalantolakton, NF-κB, nöroinflamasyon

Bu çalışma THD-2019-18109 nolu proje koduyla Hacettepe BAP birimi tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Tarazi B. Investigation of antiinflammatory effects of isoalantolactone on experimental traumatic spinal cord injury model in rats

Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, Ankara, 2019.

Introduction & Objectives: Spinal cord injury (SCI) is a complex and destructive condition that affects many body functions. After the spinal cord trauma, the production of free oxygen radicals in the first 24 hours following the occurrence of damage, disruption of mitochondrial function, and the release of potassium and genetic material from damaged cells (microglia, astrocytes, neurons). Activation of microglial cells in the damaged spinal cord tissue in which trigger the releasing of Pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6, also secreted prostaglandin E2, cyclooxygenase 2 (COX2), Nitro-oxidase (INOS) and activated microglial cells increase the inflammatory cascade. In summary, the pathways of the molecules involved in the inflammation process are activated. Nowadays, the main treatments are about reducing the secondary damage in the process of admission, diagnosis and treatment of these patients.

Isoalantolactone (IAL), is a new generation drug with broad biological activity. Studies have shown that isoalantolactone has antibacterial, anti-inflammatory and antiapoptotic effect. In addition, although neuroprotective effect has been demonstrated in rat traumatic brain injury model, there is no study explaining the mechanism of action of this drug in traumatic spinal cord injury. The aim of this study was to investigate the effects of isoalantolactone (IAL) injected intraperitoneally into rats in the spinal cord trauma model on neuroinflammation 24 hours after the trauma and to compare its effects with the commonly used anti-inflammatory drug methylprednisolone. At the end of the 24th hour, post-traumatic neurological evaluation was performed and sacrificed. Then, proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 were examined by ELISA method, IL-6, CD3, Microglia (Iba-1) and Macrophage (F4 / 80) antibodies in spinal cord tissue and compared with control groups. In addition, the subunit of the transcription factor NF- κ B, which is responsible for the synthesis of inflammatory mediators, was examined by NF- κ B-p65 immunohistochemistry method. This allowed us to evaluate the course of inflammation.

Material & Methods: A total of 32 male Wistar rats (n = 8) were used in the study. The groups were divided into four groups as sham group, trauma group, trauma and methylprednisolone group, trauma and isoalantolactone (IAL) group. Spinal trauma model was created by dropping 15 gr free weight from 10 cm height under ketamine / xylazine anesthesia to rats. Half an hour

after trauma, a single dose of 20 mg / kg isoalantolactone was administered intraperitoneally, and control groups received intraperitoneal saline or 60 mg / kg methylprednisolone intraperitoneally. Behavioral experiments were performed in all groups before sacrifice. At the end of 24th hour, rats were sacrificed and histopathological and immunohistochemical findings of spinal tissues were compared between groups

Findings: Isoalantolactone (IAL) reduces inflammation in various ways in traumatic spinal cord injury, one of which is the NF- κ B pathway. Using IAL, neurologically significant improvement was achieved in spinal cord injury ($p < 0.0001$). In the IAL group, the total number of NF- κ B-labeled cells decreased compared to the other groups ($p < 0.0001$). According to these findings, the neuroinflammatory pathway developed over the NF- κ B pathway in the rat spinal cord trauma model was shown. IAL has been shown to inhibit neuroinflammation through the NF- κ B pathway. Tissue TNF- α , IL-6 levels were decreased in the IAL group ($p < 0.002$), but not statistically significant ($p = 0.068$). IL-6 and TNF- α secretion were significantly decreased in the IAL group ($p = 0.002$). When microglial and macrophage cells were evaluated with Iba-1 and F4/80, it was seen that microglial and macrophage migration with IAL was significantly less ($p = 0.0025$), ($p = 0.0363$). IAL has been shown to reduce neuroinflammation by suppressing microglia activation after trauma. ($p < 0.0001$), CD3 + T lymphocytes were significantly reduced by IAL ($p = 0.0084$). IAL significantly reduced post-traumatic edema histopathologically. It also reduced the number of neurodegenerative cells compared to the trauma group.

Conclusion: In conclusion, Isoalantolactone (IAL) contributed to improvement of neurological functions in moderate spinal cord injury by inhibiting macrophage, microglial activation and NF- κ B pathway of the neuroinflammation process.

Keywords: Traumatic Spinal Cord injury, methylprednisolone, Isoalantolactone, neuroinflammation, NF- κ B .

İçindekiler

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER LİSTESİ	viii
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Travmatik Spinal kord Hasarı: Tarihçe.....	2
2.2. Spinal kord ile ilgili temel bilgiler.....	4
2.2.1. Spinal kord Embriyolojisi.....	4
2.2.2. Spinal kord Anatomisi.....	5
2.2.3. Spinal kord vasküler yapısı.....	7
2.2.4. Spinal kord iç yapısı ve fizyolojisi.....	8
2.3. Spinal kord Hasarı: Epidemiyoloji ve İnsidans.....	10
2.4. Spinal kord hasarın klinik sınıflanması ve sendromları.....	11
2.4.1. ASIA sınıflanması.....	11
2.4.2. Klinik Sendromlar.....	17
2.4.2.1. Santral kord sendromu.....	17
2.4.2.2. Brown-Sequard sendromu (BSS).....	18
2.4.2.3. Anterior kord sendromu.....	18
2.4.2.4. Kauda ekina sendromu	19
2.4.2.5. Konus medullaris.....	20
2.5. Fonksiyonel Değerlendirme	20
2.6. Travmatik Spinal kord hasarın tanı	20
2.2. Spinal kord ile ilgili temel bilgiler	4
2.2.1. Spinal Kord embriyolojisi	4
2.7. Travmatik Spinal kord hasarının patofizyolojisi ve türleri	21
2.7.1. Primer mekanik zedelenme :	22
2.7.2. Sekonder mekanik zedelenme	24
2.7.3. Sekonder mekanik zedelenmenin mekanizmaları	26

2.7.3.1. Enerji metabolizmasında kayıp Azalmış ATP üretimi	26
2.7.3.2. Serbest radikal formasyonu ve lipid peroksidasyonu	28
2.7.3.3. İyonik Mekanizmalar	30
2.7.3.4. Endojen opioidler	32
2.7.3.5. Spinal şok	33
2.7.3.6. vasküler ve endotel hasarın mekanizmaları	33
2.7.3.7. İnflamasyon	34
2.7.3.8. Nekroz ve Apoptoz	35
2.8. SKH Patolojisi ve Nöroinflamasyon	36
2.8.1. Akut evre	37
2.8.2. Subakut evre	38
2.8.3. Kronik (Geç) evre	38
2.9. SKH'ında NF-κB yolu	39
2.9.1. NF-κB'nin Aktivasyonu	40
2.9.2. Geleneksel (Canonical) Yolak	42
2.9.3. Geleneksel Olmayan (Non-canonical) Yolak	42
2.9.4. DNA Hasarı	42
2.9.5. NF-κB'nin İnhibisyonu	43
2.10. SKH'in tedavisi	43
2.10.1. SKH'nin Cerrahi tedavisi	44
2.10.2. SKH'de Cerrahi olmayan (Medikal) tedavi	44
2.10.2.1. Metilprednizolon (MPZ)	44
2.10.2.2. Naloksan	45
2.10.2.3. Gangliosidler	45
2.10.2.4. Nimodipin	45
2.11. Isoalantolactone (IAL)	46
2.11.1 Genel Bilgi	46
2.11.2 Doğal Kaynaklar	46
2.11.3 Biyolojik aktivite	47
2.12. DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ	48
3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları	49
3.2. Deney Grupları ve Protokol	49
3.3. Anestezi ve Yaşamsal Bulguların Takibi	51
3.4. Spinal kord travmasının oluşturulması	51
3.5 İntraperitoneal MPZ , ALO hazırlanması ve uygulanması	52
3.6. Nörolojik Değerlendirme	53
3.7. Sakrifikasyon, Spinal kordların Çıkarılması ve Fiksasyon	54

3.8. Kesitlerin alınması, immunhistokimya ve histopatolojik değerlendirme	55
3.9 . Serum ve Doku IL-6, TNF-a düzeylerinin ELISA ile belirlenmesi	56
3.10. İstatistiksel Değerlendirme	57
4.1. Travma Şiddetinin Etkisi	58
4.2. Sıçanlarda nörolojik değerlendirilmesi	59
4.2.2. Deney gruplarında motor fonksiyon skorları değerlendirilmesi (Drummond ve Moore Kriterleri)	60
4.3. ELİSA ile doku IL-6, TNFa düzeylerinin incelenmesi	61
4.4. Histopatolojik bulgular	63
4.5. İmmünhistokimyasal bulgular	68
4.5.1. IL-6 Sinyalinin Değerlendirilmesi	69
4.5.2. T lenfosit aktivasyonu CD3 ile işaretlenen hücre sayılarının değerlendirilmesi	70
4.5.3. Mikroglia aktivasyonu İba-1 ile işaretlenen hücre sayılarının değerlendirilmesi	71
4.5.4 F4/80 ile Makrofaj aktivasyon hücre sayılarının değerlendirilmesi	73
4.5.5 NF-κB yolak aktivasyon hücre sayılarının değerlendirilmesi	75
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
7. KAYNAKLAR.....	85

KISALTMALAR LİSTESİ

μ	: mikro
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ALT	: Alantolactone
ASIA	:The American Spinal Injury Association
ATP	: Adenozin trifosfat
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
BSS	:Brown-Sequard sendromu
BT	: Bilgisayarlı tomografi
Ca ²⁺	: Kalsiyum
CO ₂	: Karbondioksit
COX2	: Cyclooxygenase 2
Cu	: Bakır
DAH	: Diffüz aksonal hasar
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DHMEQ	: Dehydroxymethyl-epoxyquinomicin
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ET-3	:Endotelin-3
Fe	: Demir
g	: Gram
HE	: Hematoksileneozin
HO	: Hidroksil radikali
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
IAL	: Izoalantolactone
IL-6	: interleukin 6
iNOS	: İndüklenbilir nitrik oksit

ISNCSCI	:International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury
IP	:intraperitoneal
IV	:intravenöz
KBB	:Kan beyin bariyeri
K+	: Potasyum
LPO	: Lipit peroksidasyonu
mmHg	: Milimetre civa
ml	: mililitre
mm	: milimetre
Mg+2	: Magnezyum
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
Na+	: Sodyum
NB	: Nabız basıncı
MPZ	: Metilprednizolon
MBP	: Miyelin temel proteini
MCP-1	:Makrofaj kemotaktik protein-1
NF-κB	:Nuclear Factor kappa B
NMDA	:N-metil-D-aspartat
NO	: Nitrik oksit
PSS	: Periferik sinir sistemi
RIPA	: <u>Radioimmunoprecipitation assay</u>
ROS	:Reaktif oksijen türlerinin
SCIM	:Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği
SKH	: Spinal kord hasarı
SSS	: Merkezi sinir sistemi
TNF-α	:Tümör nekroz faktörü-α
VCAM.	: Vasküler hücre adhezyon molekülü

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Spinal kord embriyolojisi	4
Şekil. 2.2. Spinal kord Anatomisi	5
Şekil 2.3. Spinal sinirler	6
Şekil 2.4. Spinal kord Aksiyal kesiti	6
Şekil 2.5. Spinal kord zarları	7
Şekil 2.6. Spinal kordun vasküler yapısı	8
Şekil 2.7. Spinal kord yaralanmasında Nörolojik sınıflama ölçek	11
Şekil 2.8. ASIA yeni sınıflanması	17
Şekil 2.9. Santral kord sendromu	18
Şekil 2.10. Brown-Sequard sendromu (BSS)	18
Şekil 2.11. Anterior kord sendromu	19
Şekil 2.12. Kauda ekina sendromu	19
Şekil 2.13. SKH'da görüntüleme (Röntgen , BT, MRG)	21
Şekil 2.14. Spinal kord hasarının Patofizyolojisi	22
Şekil 2.15. Spinal kordun Primer mekanik zedelenmesi	23
Şekil 2.16. Sekonder Spinal kord hasarının mekanizması	25
Şekil 2.17. ATP metabolizması ve hücre hasarı	27
Şekil 2.18. Spinal kord travmasında serbest oksijen radikali oluşumu	30
Şekil 2.19. Hücre hasarında Ca ve Na imbalansı	32
Şekil 2.20. SKH'ında İnflamasyon	34
Şekil 2.21. SKH'ında Apoptoz	36
Şekil 2.22. SKH Nöroinflamasyon ve evreleri	37
Şekil 2.23. NF-κB aktivasyonunun nöron, glia ve endotel üzerine etkilerininin şematik olarak gösterilmesi	40
Şekil 2.2.4. NF-κB yolları	41
Şekil 2.2.5. Inula helenium ve Isoalantolactone kimyasal yapısı	47
Şekil 3.1. Sıçan torakal spinal travma modeli gösteren şematik resimler	51
Şekil 3.2. Ağırlık düşürme sıçan modeli	52
Şekil 3.3. Eğik düzlem (İnclined plane) testi	53
Şekil 3.4. Sıçanların sakrifiye edilmesi ve spinal kordu çıkarılması	55
Şekil 3.5. ELISA yöntemi	57

Şekil 4.1. Travma gruplarının sakrifiye edildikten sonra makroskopik görünümüleri	58
Şekil 4.2. Deney gruplarına göre Eğik düzlem (dereceleri) karşılaştırılması	60
Şekil 4.3. Deney gruplarına göre Motor fonksiyon skoru karşılaştırılması	61
Şekil 4.4. Deney gruplarında ELİSA ile gruplar arası doku TNF- α konsantrasyonu karşılaştırılması.	62
Şekil 4.5. Deney gruplarında ELİSA ile gruplar arası doku IL-6 konsantrasyonu karşılaştırılması	62
Şekil 4.6. Sham grubunun Hematoksilen-eozin boyaması	63
Şekil 4.7. Travma grubunun Hematoksilen-eozin boyaması	64
Şekil 4.8. Travma + MPZ grubu Hematoksilen-eozin boyaması	65
Şekil 4.9. Travma + MPZ grubu Hematoksilen-eozin boyaması (x40)	66
Şekil 4.10. Travma + IAL grubu Hematoksilen-eozin boyaması	68
Şekil 4.11. IL-6 ile immünohistokimyasal işaretleme	69
Şekil 4.12. Gruplar arası IL-6 işaretli hücre sayılarının karşılaştırılması	70
Şekil 4.13. Gruplar arası CD3 işaretli hücre sayılarının karşılaştırılması	70
Şekil 4.14. CD3 immünohistokimyasal işaretlemesi	71
Şekil 4.15. Iba-1 immünohistokimyasal işaretlemesi	72
Şekil 4.16. Gruplar arası Iba-1 işaretli hücre sayılarının karşılaştırılması	73
Şekil 4.17. Gruplar arası F4/80 işaretli hücre sayılarının karşılaştırılması	74
Şekil 4.18. F4/80 immünohistokimyasal işaretlemesi	75
Şekil 4.19. Gruplar arası NF- κ B işaretli hücre sayılarının karşılaştırılması	76
Şekil 4.20. NF κ B immünohistokimyasal işaretlemesi	77

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1. ASIA kas anahtarları	12
Tablo 2.2. ASIA kas gücü değerlendirilmesi	13
Tablo 2.3. Anahtar olmayan Kaslar	14
Tablo 2.4. Anhatar duyu noktaları	15
Tablo 2.5. Hafif dokunma duyusunun puanlanması	16
Tablo 2.6. İğne duyusunun puanlanması	16
Tablo 2.7 Spinal kord sekonder hasar mekanizması	25-26
Tablo 4.1 Deney gruplardaki Inclined Plane (Eğik-Düzlem) derecelerinin değerlendirilmesi	59
Tablo 4.2 Deney gruplarında Motor fonksiyon skorları değerlendirilmesi	60
Tablo 4.3 NF-κB yolak aktivasyonunun gruplar arasında değerlendirilmesi	75

1.GİRİŞ

Spinal kord Hasarı (SKH) birçok vücut fonksiyonunu etkileyen kompleks ve yıkıcı bir durumdur. Yaralanmaya sekonder gelişen tıbbi komplikasyonlar hayatı tehdit eden, ciddi mortalite ve morbiditeye sebep olmaktadır. SKH bireyleri sosyal, ekonomik ve psikolojik yönden olumsuz etkilemekte, yaşam kalitesi ve günlük yaşam aktiviteleri bozmaktadır [1,2]. Spinal kord travmasından sonra, hücrelerin verdiği yanıt ve aktifleşen moleküler yollar hasar oluşumundan sonra geçen süreye bağlı olarak farklılık göstermektedir. Hasar oluşumunu takiben ilk 24 saatte serbest oksijen radikallerinin üretimi, mitokondri fonksiyonlarının bozulması ve hasarlı hücrelerdeki (mikroglia, astrosit, nöron) potasyum ve genetik materyalin hücre dışına çıkması ile omurilik dokusunun özelleşmiş makrofajları olan mikroglialar aktifleşir. Prostaglandin E2, Cyclooxygenase 2 (COX2), Nitrooksidase (İNOS) ve aktifleşen mikroglialar tarafından TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır.

İnflamatuvar yanıt ile hasarın çevre dokuya yayılımı engellenir. Akut dönemin ardından doğal bağışıklık sistemi, birincil hasar sonucu meydana gelen hücre ölümü sonucu, ısı şok proteinleri, ürik asit, ATP, potasyum ve nükleik asitler gibi patojenlere bağlı enfeksiyon kaynaklı olmayan steril inflamasyonda, hasarlı hücreler tarafından salınan ve inflamatuvar yanıtı başlatan NF- κ B sinyal yolağı tarafından aktive edilir.

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) sinyal yolağı, akut nöroinflamasyon ve hücre hasarında önemli rol oynamaktadır. Normal hücre sitoplazmasında bulunan (NF- κ B), inhibitör kappa B (I- κ B) ile bağlı olduğu için inaktif formdadır, hasar ve inflamasyon sonrası sitokinlerin tetiklemesine bağlı olarak I- κ B degrade olup, (NF- κ B) hücre sitoplazmasından nükleusa transloke olur. Hücrenin DNA'sına bağlanıp inflamasyon ve apoptozu uyaran TNF- α , IL-1b, IL-16, iNOS (COX-2) gibi sitokinlerin gen kodlarını transkribe eder [3,4,5].

Spinal kord hasarında en etkin tedavi, kaçınılmaz olarak çarpma etkisiyle başlayan ikincil hasarın önlenmesidir. Bu amaçla pek çok ilaç hayvan çalışmalarında denenmiş ve önemli bir kısmı etkin bulunmuştur. Bu ilaçların bazıları klinik çalışmalarda denenmiş, ancak insanda etkinliği ispatlanamamıştır. Sadece metilprednisolon klinik pratikte uygulanmaya başlanmıştır. Ancak son yıllarda bu ilacın etkinliği konusunda ciddi tartışmalar olmaktadır. Omurilik yaralanmasında

ikincil hasarın önlenmesi için hedefler: glutamaterjik, kolinerjik ve ketakolaminerjik nörotransmisyon sistemleri, serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyon, kalsiyum ve diğer iyon kanalları, büyüme faktörleri, nörotrofik faktörler, inflamasyon prosesi, endojen opioid reseptörleri, enzimler, apoptotik hücre ölümü ve rejenerasyon mekanizmalarıdır.

Son yıllarda, yeni kullanılmaya başlanan izoalantolakton (IAL), yeni nesil güçlü ve selektif bir NF-κB sinyal yolağı antagonistidir. Anula helenium'un köklerinden izole edilen ve geniş biyolojik aktiviteye sahip olan bir ilaçtır, Anti-inflamatuar, antibakteriyel ve antiapoptotik etkileri bulunmuştur. Ayrıca sıçan travmatik beyin hasar modelinde nöroprotektif etkisi gösterilmesine rağmen travmatik spinal kord hasarında bu ilacın etki mekanizmalarını aydınlatmak için başka çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır [6,8].

Önceki yapılan araştırmalara göre izoalantolakton antibakteriyel, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi bulunmuştur, ayrıca sıçan travmatik beyin hasar modelinde nöroprotektif etkisi gösterilmesine rağmen travmatik spinal kord hasarında bu ilacın etki mekanizmalarını aydınlatmak için başka çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada anti-inflamatuar etkisi sepsis, akciğer hasarı, dermatit, travmatik beyin hasarı gibi patolojilerde gösterilmiş olan IAL'nin travmatik spinal kord hasarında antiinflamatuvar ve nöroprotektif etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır [9,10,11].

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Travmatik Spinal kord Hasarı: Tarihçesi

Spinal kord hasarı çağdaş toplumu fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik açıdan derinden etkileyen, ciddi harap edici bir nörolojik sorunu olması ve dünyasal kabul gören bir tedavi protokolünün düzenlenememiş olması nedeniyle halen önemli bir sorundur[13]. Spinal kordun hasarının tanı ve tedavisi hakkında çalışmalar antik döneme kadar uzanmaktadır[14].

Vertebral ve Omurlilik hasarları hakkında ilk yazılan kayıtları 50,000 (beş bin) yıl önce eski mısırlı doktor "İmhotep" tarafından yazıldığı düşünülen "Edwin Smith" cerrahi papirüsüdür. Söz konusu belgede farklı olgular değerlendirilmekte ve hastalar "tedavi edilebilecek olgular",

“tedavi edilmeye çaba gösterilmesi gerekenler” ve “umutsuz olgular” olarak sınıflandırılmaktadır[15].

Tedavisi umutsuz olguların kliniği günümüzde komplet omurilik lezyonu tanımına uymaktadır: “Boynunda bir çıkığı olup kollarını ve bacaklarını fark etmeyen, ereksiyon ve spontan ejakulasyonu olan, idrarını damla damla yapan, gözleri kızarmış, eti rüzgârlanmış olgu umutsuz olgudur, tedavisi başarılmaz”[16]. Hipokrat ve Galen dönemine kadar önemli bir gelişme söz konusu değildir, o dönemde, Hipokrat paraplejiyi tarif etmiştir, ancak omurilik fonksiyonunu açıklamaktan daha çok, travma sonrası omurga deformitelerinin düzeltilmesi amacıyla traksiyon uygulanmasını sağlamıştır. Galen ise deneysel olarak kesilen medulla spinalis segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu söylemiştir.[17,18] Egeli Paulus (625-690) traksiyon ile omurilik hasarının önlenemeyeceğini düşünmüş ve ilk defa dekompresif cerrahi fikrini ortaya koymuştur. 20. yüzyıla kadar spinal hasarına yaygın olarak cerrahi olmayan konservatif yaklaşım tercih edilmesine karşın, Paulus’un dekompresif cerrahi fikrine dayanarak uygulanan cerrahi girişimlerde gelişimini devam ettirmiştir.[19] Bu çağa kadar insan spinal kord hasarını taklit edebilecek, tanı ve tedavide gelişmeler sağlanmasında yardımcı olacak, birçok deneysel spinal kord hasarına modeli geliştirilmiştir. 1911 senesinde Allen; köpeklerde laminektomi sonrası omurilik üzerine ağırlık düşürerek kontüzyon tipi omurilik hasarı oluşturmuştur ve uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin kaldırılmasının nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını ortaya koymuştur, ayrıca sekonder hasar konseptinin de öncülüğünü yapmıştır.[20]

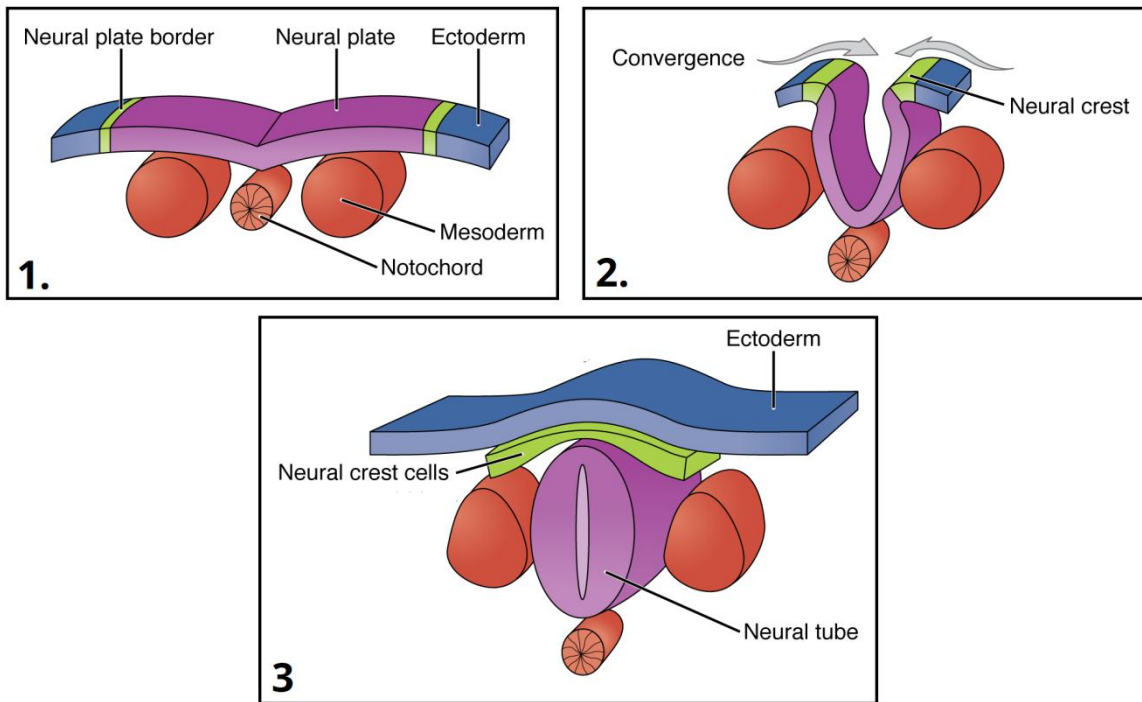
1978 senesinde Tator ve Rivlin tarafından klip kompresyon modeli geliştirilmiştir, omurilik çeşitli zaman aralıklarında anevrizma klipleri ile klibe edilmekte ve bu sayede değişik miktarlarda travma oluşturulabilmektedir. Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı omuriliğin tamamını travmaya maruz bırakması ve aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model olmasını sağlamaktadır. Bu modellerle birlikte birçok deneysel omurilik hasar modeli geliştirilmiştir.[21]

2.2. SPİNAL KORD İLE İLGİLİ TEMEL BİLGİLER

2.2.1. SPİNAL KORD EMBRİYOLOJİSİ

Embriyolojik hayatın 3. haftasında sinir sistemi ektodermin kalınlaşmasıyla gelişir. Ektoderm altında yer alan notokord ve mezodermin indüklenmesiyle nöral plak oluşur. Nöral plaktan da nöral tüp ve nöral krest gelişir (Şekil 2.1).

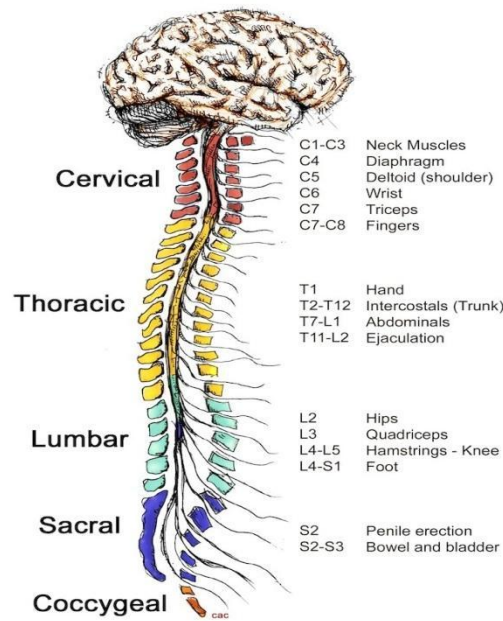
Nöral tüp, santral sinir sistemine yani omurilik ve beyne farklılaşırken, krista nöralis de periferik sinir sistemine yani kranial ve spinal sinir ve otonom ganglionlara farklılaşır. Nöroepitelyal hücrelerden dışta marjinal zon gelişir. Bu zondan medulla spinalisin beyaz cevheri oluşur. Omurilik duvarında uzunlamasına sığ bir oluk oluşur. Bu oluğa sulcus limitans adı verilir. Omuriliği ventral ve dorsal kısımlara ayırır. Dorsal kısma alar plak (alar lamina), ventral kısma ise bazal plak (bazal lamina) denir. Alar plak kornu posteriordaki gri cevheri meydana getirir. Bazal plak kornu anterior ve kornu lateralisteki efferent nukleus gruplarını oluşturur [22].



Şekil 2.1. Spinal kord embriyolojisi

2.2.2. Spinal Kord Anatomisi

Spinal kord (omurilik) foramen magnumdan başlar ve erişkinde lomber 1 vertebranın alt kenarı düzeyinde sonlanır (Şekil 2.2) . Canalis vertebralisin üst 2/3 kısmında yer alır ve dura mater, arachnoidea mater ve pia mater isimli üç zar ile çevrilidir. Spinal kordu çevreleyen spatium subarachnoideumda bulunan beyin omurilik sıvısı (BOS) spinal kordu besleme ve koruma görevini üstlenir [23].



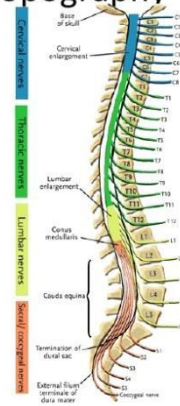
Şekil 2.2. Spinal kord Anatomisi

Spinal kord servikal ve lomber bölgelerde iki adet genişleme gösterir. Bu genişlemeler intumescentia cervicalis ve intumescentia lumbosakralis olarak adlandırılır. Alt seviyelerde spinal kord gittikçe incelerek conus medullaris oluşturur. Conus medullaris' in tepesinden pia materin bir uzantısı aşağıya inerek coccyxin arka yüzüne yapışır ve filum terminale olarak adlandırılır. Spinal kordda tüm uzunluğu boyunca radix anterior (motor) ve posterior (duysal) tarafından oluşturulan 31 adet spinal sinir tutunur (Şekil 2.3).

Spinal Nerve Topography

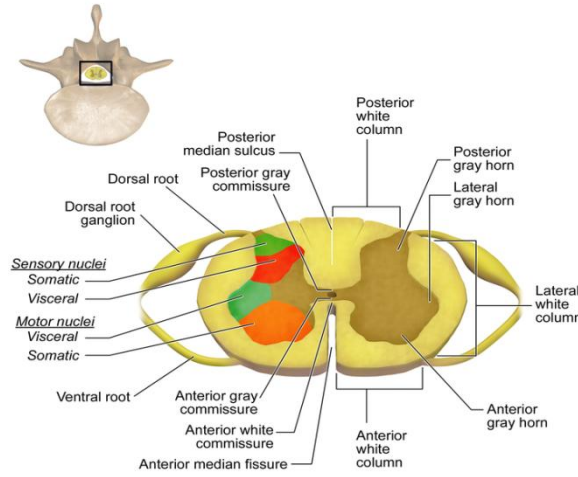
31 pairs of spinal nerves

- 8 cervical
- 12 thoracic
- 5 lumbar
- 6 sacrococcygeal



Şekil 2.3. Spinal sinirler

Spinal kord gri maddeden yapılmış substantia grisea olarak adlandırılan bir iç kısım ile ve bunu çevreleyen substansia alba olarak adlandırılan dış tabakadan oluşmuştur. Substantia grisea sinir hücreleri ve uzantıları, nöroglia ve kan damarlarından oluşurken substansia alba ilaveten miyelinli sinir liflerinin daha fazla olması nedeniyle beyaz olarak görülür [23] (Şekil 2.4).



Sectional Organization of the Spinal Cord

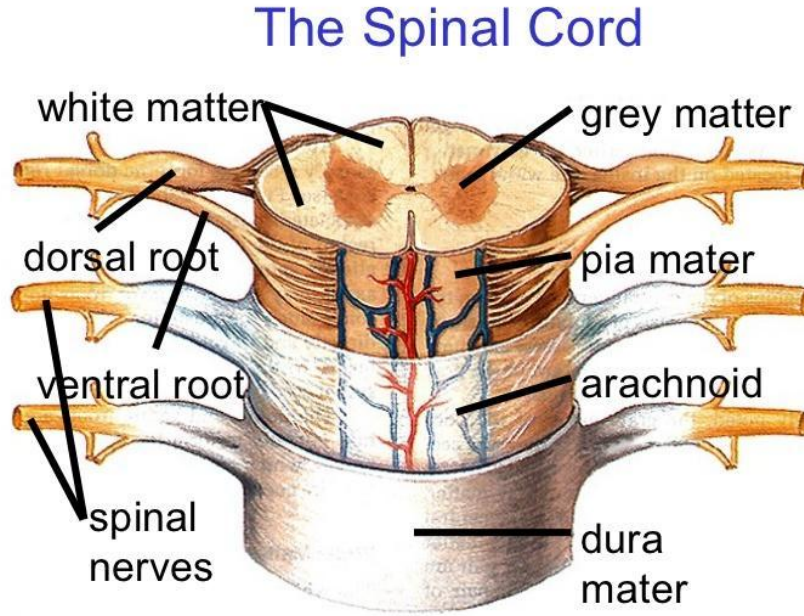
Şekil 2.4. Spinal kord Aksiyal kesit

Spinal kordun zarları üç tanedir, Dura mater, spinal kordu çevreleyen fibröz yapıda sağlam bir zardır. Üst seviyede foramen magnum aracılığıyla devam eder ve sakral 2 vertebranın alt kısmına kadar uzanarak filum terminalede sonlanır.

Arachnoidea mater, spinal kordu saran ince ve geçirgen olmayan bir zardır.

Pia materden BOS ile dolu bir boşluk olan spatium subarachnoideum ile ayrılır. Dura mater gibi filum terminale seviyesinde sonlanır. Pia mater, spinal kordu sıkıca saran vasküler bir zardır. Bilateral sinir kökleri arasında kalınlaşarak ligamentum denticulatumu oluşturur. Bu bağ laterale

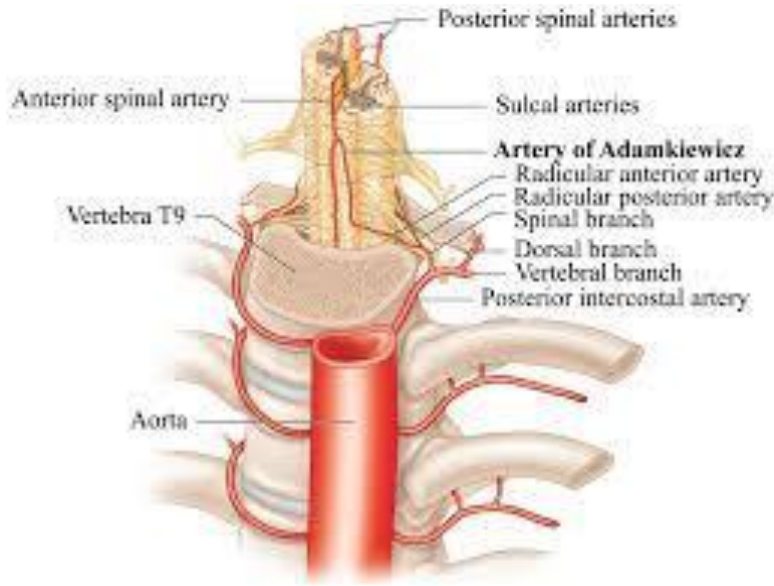
doğru uzanarak arachnoid ve duraya yapışır ve omuriliğin dural kılıfın ortasında asılı kalmasını sağlar [23] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Spinal kord zarları

2.2.3. spinal kordun vasküler yapısı

Spinal kord arteriyel kanını önde bir arteria spinalis anterior ve arkada iki arteria spinalis posterior olmak üzere üç ince arterden alır. Posterior spinal arterler arteria vertebralislerden direkt olarak veya arteria inferior posterior cerebellilerden indirekt olarak çıkarak spinal kordun arka 1/3 kısmını beslerler. Anterior spinal arter kafatası içinde her iki taraftaki arteria vertebralislerden çıkan arterlerin birleşmesi ile oluşur ve spinal kordun ön 2/3 kısmını besler. Longitudinal olarak uzanan anterior ve posterior spinal arterler her bir intervertebral delikte küçük segmental arterlerle desteklenirler. Bir diğer önemli besleyici arter olan arteria radicularis anterior magna (Adamkiewicz arteri) aortadan alt torasik veya üst lomber düzeylerden tek taraflı olarak çıkar ve çoğunlukla spinal korda sol taraftan girer. Spinal kordun T8 ve konus medullaris arasında kalan alt 2/3 kısmını besleyen ana kan kaynağıdır. Orta torakal bölge ‘watershed zone’ olarak adlandırılır ve beslenmesi nispeten azdır. Tek besleyicisi T4 ve T5 seviyesindeki radiküler arterler olduğundan dolayı bu bölge vasküler hasara daha yatkındır. Spinal kordun venleri ise serebral venlere ve dural venöz sinüslere açılan 6 adet kıvrımlı longitudinal kanala drene olurlar [24] (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Spinal kordun vasküler yapısı

2.2.4. Spinal Kordun iç yapısı ve fizyolojisi

Omuriliğin transvers kesiti incelendiğinde gri ve beyaz maddeden oluştuğu görülmektedir. Gri madde (substantia grisea centralis): Gri maddenin her iki yarısı hilal şeklindedir ve laterale yönelen konkavite ve gri komissur ile bütün olarak H şeklini alır. Koronal planda santral kanaldan geçen hayali bir çizgi her iki hilal şeklini bölümlere ayırır; anterior (ventral), posterior (dorsal) kolonlar. Anterior kolon (kolumna anterior): Öne doğru yönelmiş , geniş, dörtgen şeklindedir. Arka kısmı taban, ön kısmı baş olarak adlandırılır. Torasik bölgede anterior kolonun posterolaterali üçgen bir alan oluşturarak lateral kolon adını alır [25]. Posterior kolon (kolumna posterior): Uzun ve silindirikdir, arka tarafa ve laterale doğru yönelir. Posterolateral sulkustan ince bir ak madde tabakası olan Lissauer traktusu ile ayrılır. Taban, boyun, baş ve apeks kısımlarından oluşur. Gri madde lateral funikulusa doğru çıkıntılar yaparak anterior ve posterior kolonlar arasında retikuler formasyon denilen bir ağ sistemi oluşturur [25]. Santral kanal (kanalis santralis): Omurilik boyunca seyreder. Kanal önündeki gri madde anterior gri kommissur, arkası ise posterior gri kommissur olarak adlandırılır. Kanal medulla oblongatanın alt kısmında ilerleyerek 4.ventriküle açılır ve filum terminaleye ulaşır. Konus medullarisin alt bölümünde fuziform bir genişleme ile terminal ventrikülü oluşturur (vertikal uzunluk 8-10 mm dir ve bu ventrikül 40 yaş sonrasında oblitere olur).

Medial kısım-anteromedial kolon: C4,C5 ve C8-L4 te daha belirgindir. L5-S1 de kaybolur fakat S2, S3, S4 te tekrar belirir. Bunun arkasında küçük hücrelerden oluşan dorsomedial

kolon yer alır. Muhtemelen dorsal spinal kasları destekler. Anterolateralde C4, C5, C6 ve L2-S2 de olmak üzere iki grup yer alır. Posterolateral ise son 5 servikal, son 5 lumbar ve üst sakral kısımlardadır. Santral kısım son 4 lumbar ve ilk 2 sakral segmentleri içerir. Bu gruplar kol ve bacak kaslarını inerve eder [25].

Lateral kolon sinir hücreleri: Torasik bölgede en belirgin olmak üzere retikuler formasyonun anteriorunda tüm omurilik boyunca bir hat olarak izlenebilir. Bu kolonun hücreleri fusiform veya yıldız şeklindedir. Sempatik sistemin preganglionik liflerine de katılır. Diğer aksonlar anterior ve lateral funikulusa geçerek longitudinal bir şekil alır.

Posterior kolon sinir hücreleri: Dorsal nucleus posterior kolon tabanının medialinde yer alır. L2-L3 seviyesinde başlayarak T12 sinirinin karşısında maksimum büyüklüğüne ulaşır. T9 seviyesinde ise kaybolur. Dağınık hücreler C3 sinirinin karşısında bir araya gelerek servikal nukleusu ve sakral bölgede sakral nukleusu oluşturur. Oval şekilli hücrelerin aksonları aynı tarafın lateral funikulusundan geçerek yukarı doğru dorsal spinoserebellar fasikulusa uzanır. Soliter hücreler ise posterior kolona saçılmış durumdadır. Bazıları gruplaşarak posterior bazal kolonu oluşturur. Omuriliğin gri madde bölümü, birkaç çeşit hücre topluluğundan oluşmuştur. Nöron tipleri Nissl boyaması ile boyanma özellikleri temel alınarak sınıflandırılmış olup, aynı tip nöronların genellikle gruplar halinde bir arada toplandıkları görülmüştür. Ak madde (substansia alba) Ak madde süngerimsi bir nöroglia ağının içine gömülmüş olan sinir hücrelerinden oluşmuştur ve anterior, lateral ve posterior olmak üzere 3 funikulusa ayrılır. Sinir liflerinin en küçükleri fasikulus gracilis(Lissauer traktusu) te yer alırken daha büyük sinirler anterior funikulustadır.

İki gruba ayrılırlar

1. grup; m.spinalisi beyine bağlayarak impulsları iletenler.

2 grup; m.spinalisin farklı segmentlerini bağlayanlar, intersegmental.

Funikuluslar inen ve çıkan yollar tarafından oluşturulmuştur. Bu yollara fasikulus veya traktus adı verilir. Funikulus anterior ve lateraliste inen (piramidal veya efferent) ve çıkan (afferent) yollar bulunur. Funiculus posteriorda ise yalnız çıkan yollar yer alır. Afferent yolların çaprazlaştığı dekussasyo komissura alba anterior, fissura mediana anteriorun hemen arkasındadır [25].

2.3. Spinal kord Hasarı: Epidemiyoloji ve İnsidansı

Spinal kord hasarı ile ilgili yapılan epidemiyolojik çalışmalar toplum sosyo-ekonomik yapısı ve çalışma yöntemlerindeki farklılıklardan dolayı değişiklik göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde omurilik yaralanması insidansı yaklaşık olarak bir milyonda 40'dır [26].

Omurilik yaralanması ile ilgili insidans oranları çalışmanın yapıldığı bölgeye göre değişiklikler göstermektedir. Bu durum travma nedenleri ve sıklığı gibi nedenlere, yapılan çalışmalarda kullanılan yöntemlere ve çalışmaya dahil edilen ve edilmeyen hasta popülasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. 2,4:1 ile 4:1 arasında değişkenlik gösteren kadın ve erkeklerde görülme oranı saptanmıştır. Spinal kord hasarı nedenleri farklı coğrafi bölgelere göre de değişkenlik göstermektedir [27]. Omurilik yaralanmalarının en sık sebebi trafik kazaları (%41), düşmelerdir(%36). Nörotravmanın nedenlerinden biri de evde düşmelerdir ve erkekler arasında sık olarak izlenir. Avrupa ve Kuzey Amerika istatistiklerine göre en yüksek yaralanma oranları 16–30 yaşları arasındaki popülasyondadır. Güneydoğu bölgemizde yapılan çalışmada yıllık insidans milyonda 16,9 olup erkek-kadın 5,8:1 olarak bulunmuştur. Yaralanma nedeni olarak ise en sık yüksekte düşme (%37,3) gösterilmiştir[28,29]

Bizim ülkemizde yapılan çalışmalar incelendiğinde Karamehmetoğlu ve ark [30], omurilik yaralanması insidansını bir milyon popülasyonda İstanbul için %21, kırsal alan ve güneydoğudaki şehirler için %16,9 olarak bildirmişlerdir. Spinal kord yaralanmasının cinsiyet ve yaş dağılımı incelendiğinde orta yaşlarda ve erkeklerde daha fazla olduğu görülmektedir.

Ülkemizde Karaca ve ark [31] tarafından yapılan çalışmada erkek/kadın oranı 2,571 ortalama yaş ise 35,5 +- 15,1 olarak bildirilmiştir. Yaş dağılımı göz önüne alındığında 20-29 ve 30-39 yaş arasında yoğunluk mevcuttur. Aynı çalışmanın verilerinde etyolojik faktörler değerlendirildiğinde trafik kazaları %48,8, düşme %36,5, kesici delici alet yaralanması %3,3, ateşli silah ile yaralanma %1,9 oranlarında karşımıza çıkmaktadır. Travma oluş mekanizmasının değişmesi ya da osteoporoz gibi altta yatan nedenlere bağlı olarak ileri yaşlarda düşme sonucu olan omurilik hasarı etyolojide ilk sırayı almakta ve bayanlarda daha sık olarak görülmektedir. Omurilik yaralanmalarında en sık hasar servikal bölgede olmakta, bunu torakolomber ve lumbosakral bölgeler izlemektedir [31].

Lezyon seviyesi ile oluşan hasar ilişkilidir. Üst seviyedeki lezyonlar komplet, alt seviyelerdeki lezyonlar inkomplet hasara neden olurlar. Zileli ve arkadaşlarının 1982-1997 yılları arasında kendi kliniklerine başvuran hastalarda yaptıkları çalışmada, servikal bölge travmasında alt servikalde travma görülme oranı %78.5, üst servikal bölgede travma görülme oranı %21.5 olarak tespit edilmiştir [32]

2.4. Spinal kord hasarının klinik sınıflandırması ve sendromları

2.4.1. ASIA sınıflandırması

En güncel spinal kord hasarlı hastaların nörolojik muayenesinde ve sınıflandırmasında, ASIA (The American Spinal Injury Association) tarafından belirlenen ISNCSCI (International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury – Nörolojik ve Fonksiyonel Klasifikasyon için Uluslararası Standartlar) önerilmektedir.

ASIA tarafından geliştirilen bu ölçek çeşitli revizyonlara uğramış ve en son 2013 yılındaki halini almıştır. Bu versiyon Gündüz ve ark. tarafından Türkçe'ye çevrilmiştir (Şekil 2.7) [33].

Hastanın Adı Soyadı: _____

Formu Dolduran: Dr _____ Tarih / Saat: _____

ASIA AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION

SPİNAL KORD YARALANMASINDA NÖROLOJİK SINIFLAMA İÇİN ULUSLARARASI STANDARTLAR

ISCOS

MOTOR
ANAHTAR KASLAR (skorlama arka sayfa)

R	L	
C5	<input type="checkbox"/>	Dirsek fleksörleri
C6	<input type="checkbox"/>	El bileği ekstansörleri
C7	<input type="checkbox"/>	Dirsek ekstansörleri
C8	<input type="checkbox"/>	Parmak fleksörleri (orta parmak, distal falanks)
T1	<input type="checkbox"/>	Parmak abduktörleri (küçük parmak)

ÜST EKSTREMİTE TOPLAM (MAKSİMUM) + =
(25) (25) (50)

MOTOR
ANAHTAR KASLAR (skorlama arka sayfa)

R	L	
L2	<input type="checkbox"/>	Kalça fleksörleri
L3	<input type="checkbox"/>	Diz ekstansörleri
L4	<input type="checkbox"/>	Ayak bileği dorsifleksörleri
L5	<input type="checkbox"/>	Uzun parmak ekstansörleri
S1	<input type="checkbox"/>	Ayak bileği plantar fleksörleri

Istemli anal kontraksiyon (Evet/Hayır)

ALT EKSTREMİTE TOPLAM (MAKSİMUM) + =
(25) (25) (50)

HAFİF DOKUNMA Sağ Sol

İĞNE BATIRMA Sağ Sol

TOPLAM (MAKSİMUM) + =
(56) (56) (56) (56)

DUYU
ANAHTAR DUYU NOKTALARI

0 = kayıp
1 = bozuk
2 = normal
TE = test edilemiyor

Derin anal duyu (evet/hayır)

İĞNE BATIRMA SKORU (maks: 112)

HAFİF DOKUNMA SKORU (maks: 112)

NÖROLOJİK SEVİYE
Normal fonksiyon gösteren en kaudal segment

TEK NÖROLOJİK SEVİYE

KOMPLET YA DA İNKOMPLET ?
İnkomplet = S4-S5'te herhangi bir duyu veya motor fonksiyon ASIA BOZUKLUK SKALASI (ABS)

(Sadece komplet yaralanmalarda)
PARSİYEL KORUNMUŞ BÖLGE
Herhangi bir inervasyonu olan en kaudal seviye

DUYU Sağ Sol

MOTOR Sağ Sol

REV 04/11

Şekil 2.7. Spinal kord yaralanmasında Nörolojik sınıflama ölçeği

Bu değerlendirme tedavi seçimi, iyileşmenin gözlenmesi, prognozun belirlenmesi ve klinisyenler arasında ortak bir dil oluşturulması açısından önemlidir[34]. Nörolojik muayenenin önde gelen iki komponenti hastanın motor ve duyu muayenesidir. Hastanın muayenesi hasta sırt üstü yatar pozisyonda yapılır. Standartlara göre motor muayene için sağ ve solda 10'ar (beş üst, beş alt ekstremité) adet olmak üzere anahtar kaslar belirlenmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 1. ASIA ISNCSCI'ye göre anahtar kaslar

Seviye	Anahtar Kas
C5	Dirsek fleksörleri
C6	El bileği ekstansörleri
C7	Dirsek ekstansörleri
C8	Parmak fleksörleri
T1	Parmak abduktörleri (5. Parmak)
L2	Kalça fleksörleri
L3	Diz ekstansörleri
L4	Ayak bileği dorsifleksörleri
L5	Başparmak ekstansörleri
S1	Ayak bileği plantar fleksörleri

Tablo 2.1. ASIA kas anahtarları

Anahtar kas gücünün muayenesinde değerlendirilecek eklem ASIA tarafından belirlenmiş standart pozisyonda muayene edilir. Bu kasların gücü manuel olarak değerlendirilir ve 0–5 arasında puanlanır (Tablo 2.2).

Tablo 2. ASIA ISNCSCI’de kullanılan kas gücü evrelemesi

Kas gücü	
0	Total paralizi
1	Palpe edilebilir veya görülebilir kontraksiyon
2	Aktif hareket, yer çekimi elemine edildiğinde tüm eklem hareket açıklığını (EHA) tamamlar
3	Aktif hareket, yer çekimine karşı tüm EHA’yı tamamlar
4	Aktif hareket, yer çekimine ve orta dirence karşı EHA’yı tamamlar
5	(normal) Aktif hareket, tam dirence ve yer çekimine karşı EHA’yı tamamlar
5*	(normal) Aktif hareket, Ağrı vb. inhibe edici faktörler kaldırıldığında yeterli dirence ve yer çekimine karşı EHA’yı tamamlar
NT	Test edilemedi

Tablo 2.2. ASIA kas gücü değerlendirilmesi

ASIA bozukluk skalasının 2013 yılındaki revizyonunda, formda şekil ve içerik yönünden değişiklikler olmuştur. Bu revizyonda nörolojik seviye tanımı önceki versiyonlara göre daha ayrıntılı ve açık biçimde yer almıştır[35]. Ancak, bu son revizyonun önceki versiyonlardan en önemli farkı, bu revizyonda anahtar olmayan kasların tanımlanmış olmasıdır (Tablo 2.3).

Tablo 3. Anahtar olmayan kaslar		
	Hareket	Kök seviyesi
Omuz: Dirsek:	Fleksiyon, ekstansiyon, abduksiyon, iç ve dış rotasyon Supinasyon	C5
Dirsek: El bileği:	Pronasyon Fleksiyon	C6
Parmak: Başparmak:	Proksimal eklemden fleksiyon, ekstansiyon Fleksiyon, ekstansiyon ve başparmak düzleminde abduksiyon	C7
Parmak: Başparmak:	MKP fleksiyon Oppozisyon, avuca dik abduksiyon	C8
Parmak:	5. parmağın abduksiyonu	T1
Kalça:	Adduksiyon	L2
Kalça:	Eksternal rotasyon	L3
Kalça: Diz: Ayak bileği: Ayak parmağı:	Ekstansiyon, abduksiyon, internal rotasyon Fleksiyon İnversiyon ve eversiyon Metatarsofalangeal ve interfalangeal eklemlerin ekstansiyonu	L4
Halluks ve ayak parmağı:	DIP ve PIP fleksiyon ve abduksiyon	L5
Ayak başparmak:	Adduksiyon	S1

Tablo 2.3. Anahtar olmayan Kaslar

Anahtar kaslar dışında, anahtar olmayan kaslar da ASIA seviyesinin belirlenmesinde (ASIA B ve C ayrımı) kullanılmaktadır. Duyu muayenesi için ise iki tarafta 28'er adet anahtar nokta kullanılır (Tablo 2.4).

Tablo 4. Anahtar duyu noktaları

Dermatom	Bulunduğu nokta
C2	Oksipital protuberensin en az 1 cm laterali (veya kulağın 3 cm arkası)
C3	Supraklaviküler fossa, orta klaviküler hatta
C4	Akromiyoklaviküler eklem üzerinde
C5	Antekübital fossa lateral (radyal) kenarı, dirsek çizgisinin hemen proksimali
C6	Başparmak proksimal falanksının dorsal yüzü
C7	Orta parmak proksimal falanksının dorsal yüzü
C8	Küçük parmak proksimal falanksının dorsal yüzü
T1	Antekübital fossa mediyal (ulnar) kenarı, humerus mediyal epikondilinin hemen proksimali
T2	Aksilla apeksi
T3	Midklaviküler hat üzerinde ve 3. interkostal aralıkta (İA)
T4	Midklaviküler hat üzerinde ve 4. İA (meme ucu hizası)
T5	Midklaviküler hat üzerinde ve 5. İA (T4 ve T6'nın orta noktası)
T6	Midklaviküler hat üzerinde ve 6. İA (ksifostemum seviyesi)
T7	Midklaviküler hat üzerinde ve 7. İA (T6 ve T8'in orta noktası)
T8	Midklaviküler hat üzerinde ve 8. İA (T6 ve T10'un orta noktası)
T9	Midklaviküler hat üzerinde ve 9. İA (T8 ve T10'un orta noktası)
T10	Midklaviküler hat üzerinde ve 10. İA (umblikus)

Tablo 2.4. Anahtar duyu noktaları

Duyu muayenesinde hafif dokunma ve pin-prick (iğne batması) duyusu değerlendirilir. Her dermatom ayrı ayrı standart noktalar üzerinden değerlendirilir. Duyu muayenesi sırasında hastadan gözlerini kapaması istenir. Hafif dokunma duyusu bir parça pamuğun, değerlendirilecek bölgede ve yanakta 1 cm'lik bir alana değdirilmesi ile muayene edilir. Keskin/künt ayrımı (iğne duyusu), çengelli iğne yardımı ile muayene edilir. Çengelli iğnenin, iğne bulunan ucu ve yuvarlak ucu cildin muayene edilecek noktalarına dokundurulur. Hastanın dokunulduğunu hissedip hissetmediği ve sivri/künt ayrımını yapıp yapamadığı değerlendirilir. Şüpheli durumlarda bu değerlendirme 10 kez yapılır ve verilen sekiz doğru cevap yeterli kabul edilir. Duyu muayeneleri Tablo 5 ve Tablo 6'daki gibi puanlanır[36].

Tablo 5. Hafif dokunma duyusunun puanlanması

0	Yok	Hasta doğru veya güvenilir biçimde dokunmayı tarif edemiyor.
1	Bozulmuş	Hasta doğru bir şekilde dokunulduğunu ifade ediyor, fakat yanağa dokunulduğundan farklı olduğunu vurguluyor (daha fazla, daha az gibi)
2	Normal	Hasta doğru bir şekilde dokunmayı ifade ediyor ve yanak ile aynı olduğunu söylüyor
TE	Test edilemeyen	Herhangi bir nedenle tam olarak değerlendirilemiyor.

Tablo 2.5. Hafif dokunma duyusunun puanlanması

Tablo 6. İğne duyusunun puanlanması

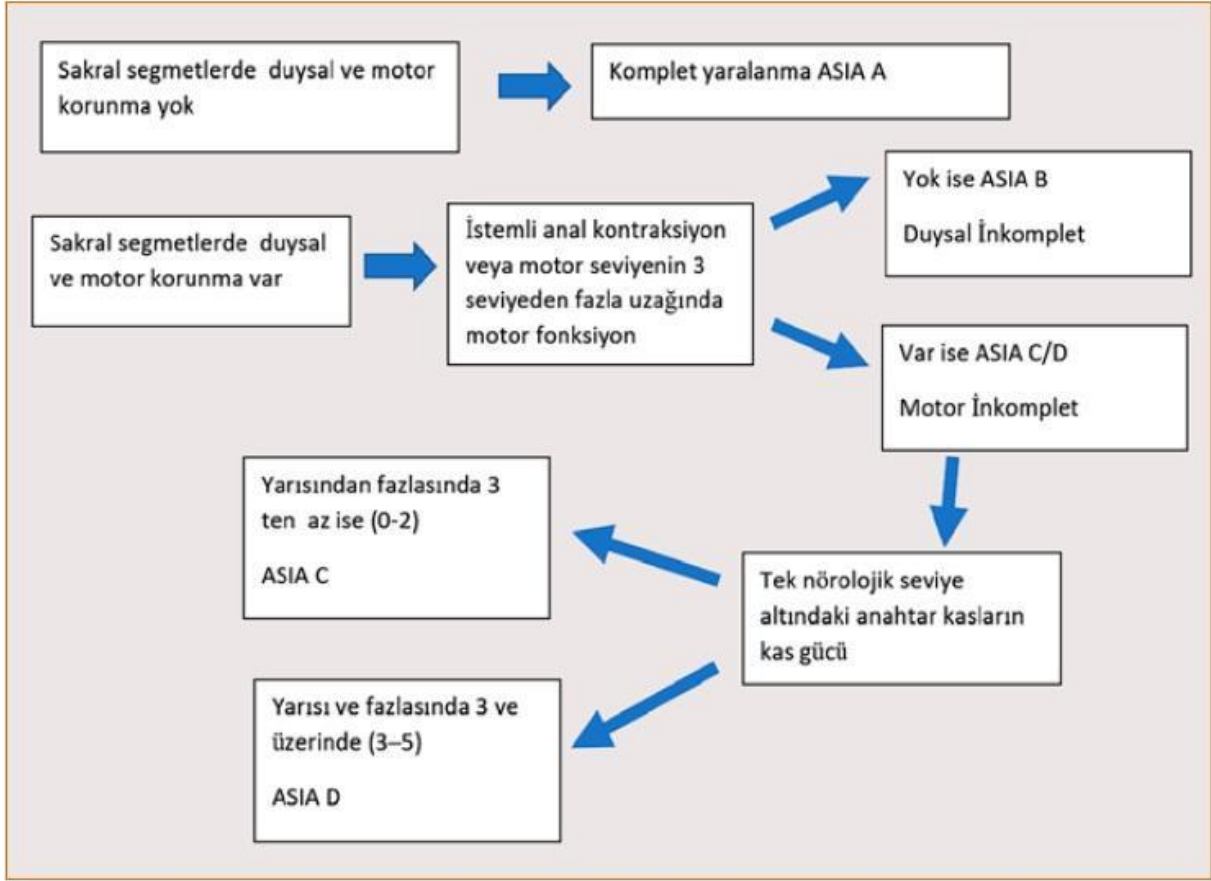
0	Yok	Hasta keskin ve künt dokunma duyularını ayırt edememiştir.
1	Bozulmuş	Hasta çengelli iğnenin künt ve sivri uçlarını ayırt etmiştir, ancak yüzündeki duyu ile test edilen bölge arasında duyuda fark (az veya çok hissetme) olduğunu belirtmiştir.
2	Normal	Hasta çengelli iğnenin künt ve sivri uçlarını doğru biçimde ayırt etmiştir, test edilen nokta ile yüz arasında fark olmadığını belirtmiştir.
TE	Test edilemeyen	Herhangi bir nedenle tam olarak değerlendirilemiyor.

Tablo 2.6. İğne duyusunun puanlanması

Nörolojik muayenenin tamamlanması için, bu değerlendirmeler dışında istemli anal kontraksiyon ve derin anal basınç olup olmadığı da muayene edilmelidir. Hastalar duyu ve motor muayeneler yapıp nörolojik seviye belirlendikten sonra ASIA (A, B, C, D ve E) olmak üzere beş sınıfta incelenir. Sakral 4. ve 5. seviyede duysal veya motor hiçbir fonksiyon korunmadıysa hasta ASIA A olarak sınıflanır.

S4-5 seviyesinde hafif dokunma, pin-prick veya derin anal basınç duyularından biri korunmuş ve motor seviyenin üç seviye altında motor korunum olmamışsa, hasta duysal inkomplet olarak isimlendirilir ve ASIA B olarak sınıflandırılır. Motor inkomplet olan hastalar ise en kaudal seviyede motor korunum olan veya duysal inkomplet olma kriterini karşılayıp ipsilateral motor seviyenin üçten daha fazla seviye altında motor korunumu olan hastalara denir (motor inkompletin belirlenmesinde anahtar olmayan kaslar da kullanılabilir).

Nörolojik seviyenin altındaki anahtar kasların yarısından azının kas gücü üç veya üstünde ise o hastalar ASIA C, bu anahtar kasların yarısı veya yarısından fazlasının kas gücü üç veya üzerinde ise ASIA D olarak sınıflandırılır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. ASIA yeni sınıflanması

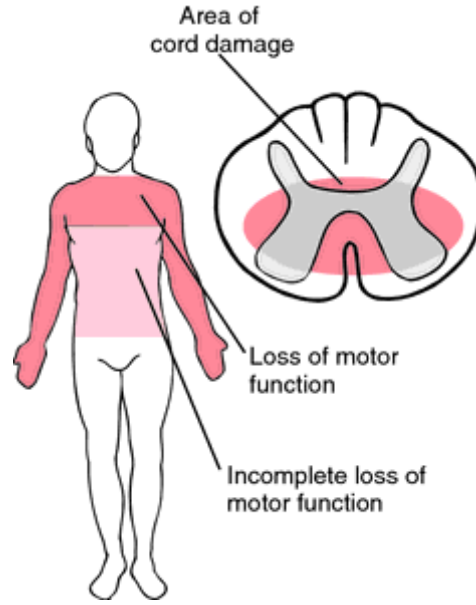
Daha önce defisiti olan ancak duyu ve motor muayenesinde ISNCSCI'ya göre normal olan hastalar ASIA E olarak sınıflandırılır. Sınıflamada kullanılan standart form ASIA'nın resmi sitesinde mevcuttur[37].

2.4.2. Klinik Sendromlar

ASIA sınıflamasında yer almasa da bazı klinik sendromların bilinmesi inkomplet yaralanmanın değerlendirilmesinde önemlidir. Bu sendromlar International standards for neurological classification of spinal cord injury 2011 versiyonunda yer almaktadır.

2.4.2.1. Santral kord sendromu

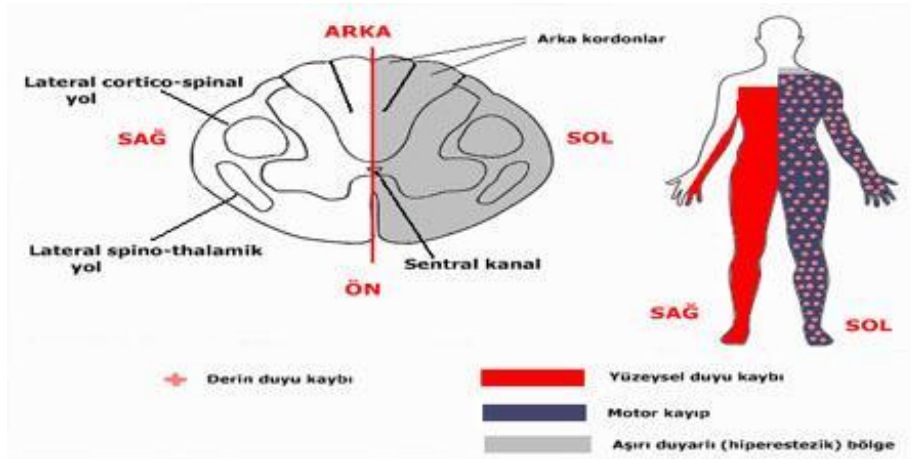
En sık karşılaşılan inkomplet SKH tipidir. Sıklıkla spondilozisi olan yaşlı hastalarda meydana gelir. Genellikle hiperekstansiyon yaralanmaları sonrasında gelişir. Üst ekstremiteler alt ekstremitelerden, motor fonksiyonlar duysal fonksiyonlardan daha fazla etkilenir[38]. (Şekil 2.9)



Şekil 2.9. Santral kord sendromu

2.4.2.2. Brown-Sequard sendromu (BSS)

Spinal kordun bir yarısının anatomik bütünlüğünün bozulması ile karakterize bir sendromdur. Yaralanma seviyesi altında, lateral kortikospinal traktus ve çıkan yollardan dorsal kolon ve spinotalamik traktus etkilenmesi nedeniyle, yaralanma seviyesi altında ipsilateral propriyosepsiyon, vibrasyon duyusu ve motor kayıp, karşı tarafta ise ağrı ve ısı duyusu kaybı vardır [39]. Tüm omurilik yaralanma sendromları içinde BSS en yüksek iyileşme şansına sahip olandır. (Şekil 2.10).

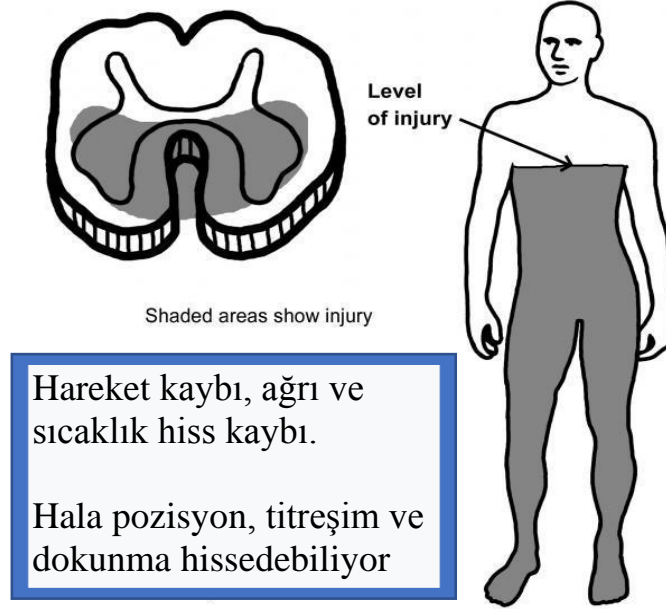


Şekil 2.10. Brown-Sequard sendromu (BSS)

2.4.2.3. Anterior kord sendromu

Spinal kordun anterior 2/3'lük kısmının etkilenmesi sonucunda oluşur. Lezyon seviyesinin altında motor etkilenme ile ağrı ve ısı duyusu kaybı vardır. Posterior kolon korunduğu için ise

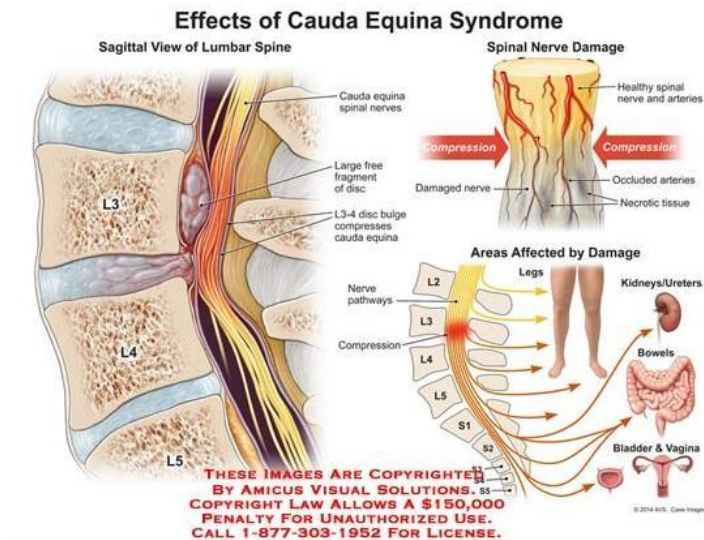
dokunma, pozisyon, iki-nokta ayırımı ve vibrasyon duygusu korunmuştur. Fleksiyon yaralanmaları, kemik parçalarına veya disk kompresyonuna bağlı direkt travma veya anterior spinal arter etkilenmesine bağlı vasküler yetmezlik sonucunda oluşur[40]. Kötü prognozludur, olguların %10–20'si arasında motor iyileşme görülür[41]. (şekil 2.11).



Şekil 2.11. Anterior kord sendromu

2.4.2.4. Kauda ekina sendromu

Kauda ekina sendromu L1-S5 periferik sinirlerini içeren kauda ekina isimli yapının etkilendiği klinik durumdur. Alt motor nöron etkilenmesi sonrası flasid paralizi, arefleks mesane, barsak ve duyu etkilenme görülür. Sakral refleksler (bulbokavernöz refleks) ve anal refleks kaybı vardır. (şekil 2.12)



Şekil 2.12. Kauda ekina sendromu

2.4.2.5. Konus medullaris

Kauda ekina sendromuna göre konus medullaris sendromunda etkilenme daha rostraldir. T12-L2 arası vertebral travmalar sonrasında oluşabilir[42]. Yaralanma seviyesine bağlı olarak konus medullaris yaralanmalarında alt ve üst motor nöron etkilenimi gözlemlenebilir. Kauda ekina sendromuna göre daha fazla sıklıkta simetrik tutulum gözlenir. Yüksek seviyedeki konus medullaris tutulumunda refleksler (bulbokavernöz, anal refleks) korunmuş olabilir[43].

2.5. Fonksiyonel Değerlendirme

SKH'de fonksiyonel durumun değerlendirilmesi için çeşitli ölçekler mevcuttur. Bu ölçeklerin bir kısmı SKH hastalarına spesifik iken, diğerleri genel fonksiyonel değerlendirme ölçekleridir. Fonksiyonel Bağımsızlık Ölçeği ve Modifiye Barthel indeksi bu hastalarda sıklıkla kullanılmaktadır[44]. SKH hasta grubuna özgü olarak ise Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği (SCIM), Kuadripleji Fonksiyonel İndeksi, SKH için Yürüme İndeksi, SKH Fonksiyonel Ambulasyon Envanteri geliştirilmiştir [45–46]. Hadley ve ark., yaptıkları derlemede SKH'li hastaların fonksiyonel değerlendirmesinde SCIM III (Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği III)'ü önermektedirler [47].

SCIM III;

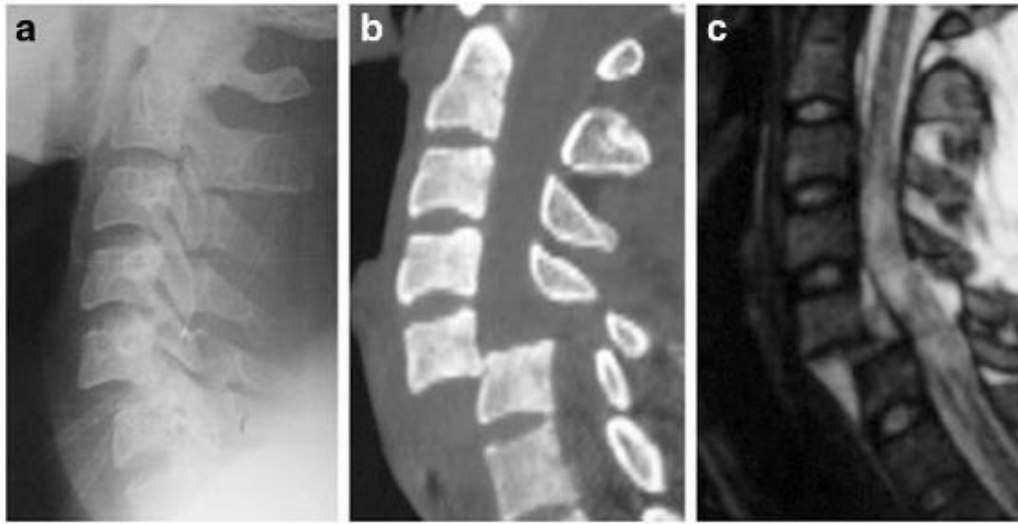
- 1) kendine bakım,
- 2) mobilizasyon,
- 3) respirasyon ve sfinkter kontrolü olmak üzere

üç alt başlıktan ve toplam 17 sorudan oluşan bir ölçektir. Bluvstein ve ark., 261 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, SCIM III'ün spinal kord yaralanmalı hastalarda duyarlı, geçerli ve güvenilir olduğunu yüksek kanıt düzeyi ile göstermişlerdir [48,49].

2.6. Travmatik Spinal kord hasarın tanı

Spinal kord travması veya şüphesi olan olguların tanı ve lezyon seviyesinin tespiti için radyolojik incelemeler yapılmalıdır. İlk aşama direkt grafilerdir. Özellikle bilinci kapalı her hastanın tüm

spinal aksı taranmalıdır. Direkt grafilerde patoloji saptanan veya şüphelenilen bölgeleri detaylı olarak taramak amacıyla bilgisayarlı tomografi (BT) çekilmelidir. Vertebra fraktürü gibi kemik patolojileri en iyi BT ile gösterilir. Ciddi SKH olan hastalarda ligament hasarı, disk hernisi, hematoma ve nöronal hasarlanma gibi yumuşak doku patolojilerini görmek amacıyla manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çekilmelidir [50]. (Şekil 2.13)

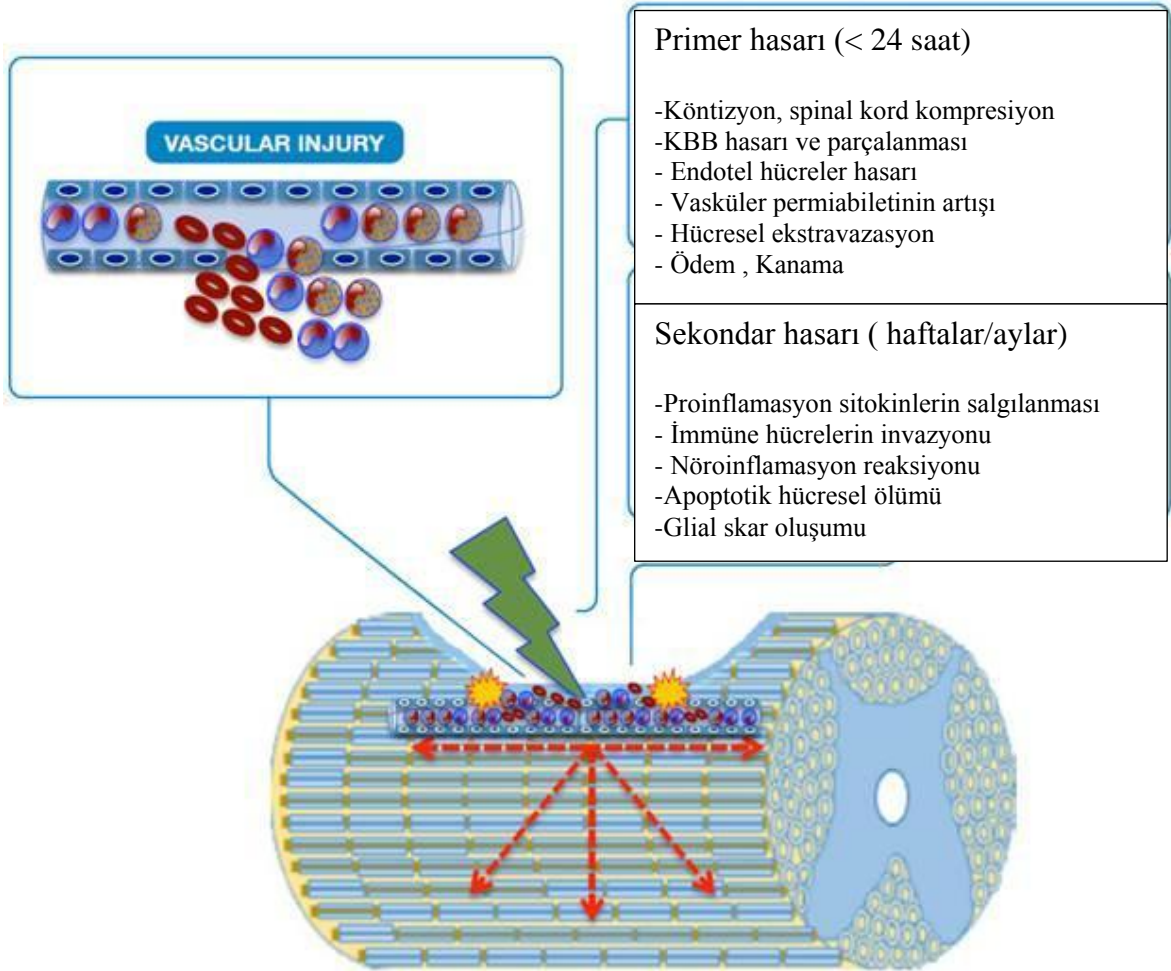


Şekil 2.13. SKH görüntüleme (Röntgen , BT, MRG)

2.7. TRAVMATİK SPİNAL KORD HASARININ PATOFİZYOLOJİSİ VE TÜRLERİ

Spinal kord travması sonrası uzun yolaklarda ilerleyici ve geri dönüşsüz harabiyete bağlı olarak nörolojik defisit geliştiğinin düşünüldüğü ilk çalışmalardan sonra 1950 yılında spinal korddaki kan akımının azalmasına bağlı olarak hasarın oluştuğu bulunmuştur ve günümüzde de travma sonrası doku yıkımının iskemiye bağlı olduğu düşünülmektedir[51]. Yıllardır nörolojik bilimsel araştırmaların en önemli konularından biri olan spinal kordda meydana gelen hasarın fizyopatolojik olarak gelişim sürecini ve mekanizmasını anlamak tedavi çözümü için önemli fayda sağlar. Spinal kord hasarının patofizyolojisi en iyi ‘bifazik yaralanma’ olarak tanımlanmıştır. Bifazik yaralanma primer (direkt) ve sekonder (indirekt) olmak üzere iki mekanizma ile ortaya çıkmaktadır [52,53]. Akut spinal kord yaralanması sonrası gelişen nörolojik hasar, birincil mekanik yaralanma ile birlikte yaralanma sonrasında gelişen ikincil yaralanmayı izleyen nekroz ve daha geç görülmeye başlayan apoptozise bağlıdır [54]. Primer hasar mekanik

etki ile ortaya çıkarken, sekonder hasar bir dizi biyokimyasal ve hücrel reaksiyonların primer hasar üzerine eklenmesiyle ortaya çıkar [55] (Şekil 2.14)



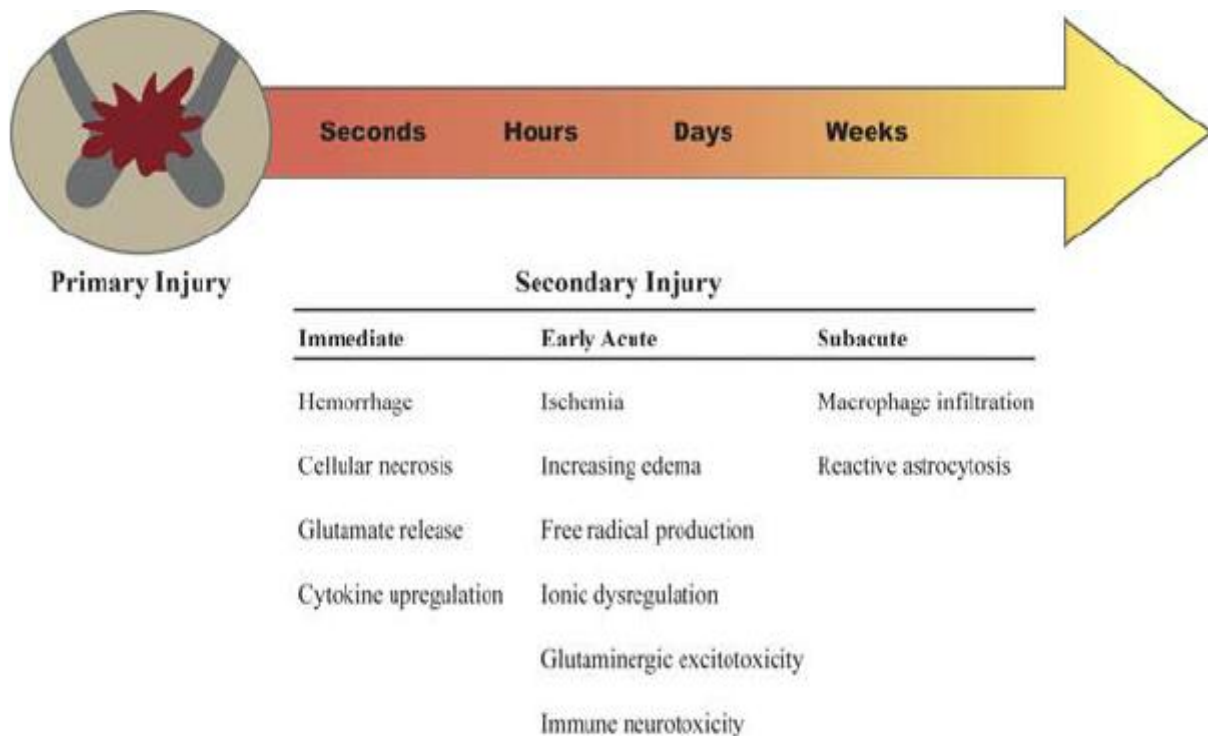
Şekil 2.14. Spinal kord hasarın Patofizyolojisi

2.7.1. PRİMER MEKANİK ZEDELLENME :

Travmanın kuvvetine bağlı olarak dokulara uygulanan mekanik şiddet, aksonları harabiyet, dokunun bütünlüğünü bozar, vasküler yapılarının yaralar ödeme sebep olur ve hücre membranlarını parçalar. Bunların hepsine primer hasarı denir. Direkt olarak travma sonrasında spinal kord etrafındaki dokular tarafından medulla spinalise bası oluşabileceği gibi, travmanın

direkt etkisi de bası oluşturmadan spinal kord hasarına yol açabilir. Bu spinal kord hasarlarının küçük kanamalardan komplet kesilere kadar olabildiği bilinmektedir.

Hasar genellikle fleksiyon, ekstansiyon, rotasyon, distraksiyon ve aksiyel yüklenme sonucu ortaya çıkar. Spinal kordda gelişen bir çok biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri sekonder hasar olarak adlandırılır ve spinal kordun daha fazla zarar görmesine dolayısıyla travma sonrası hücre ölümünün devam etmesine neden olmaktadır [56,57]. Primer hasarın medikal veya cerrahi tedavisi olmadığından dolayı yapılan tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yöneliktir. Primer yaralanmanın derecesi, yaralanmaya neden olan gücün genliğine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına göre değişir [58]. Spinal kordun uzun süre bası altında kalması, nörolojik hasarın artmasına ve prognozunun daha kötü olmasına neden olur. Şekil (2.15)

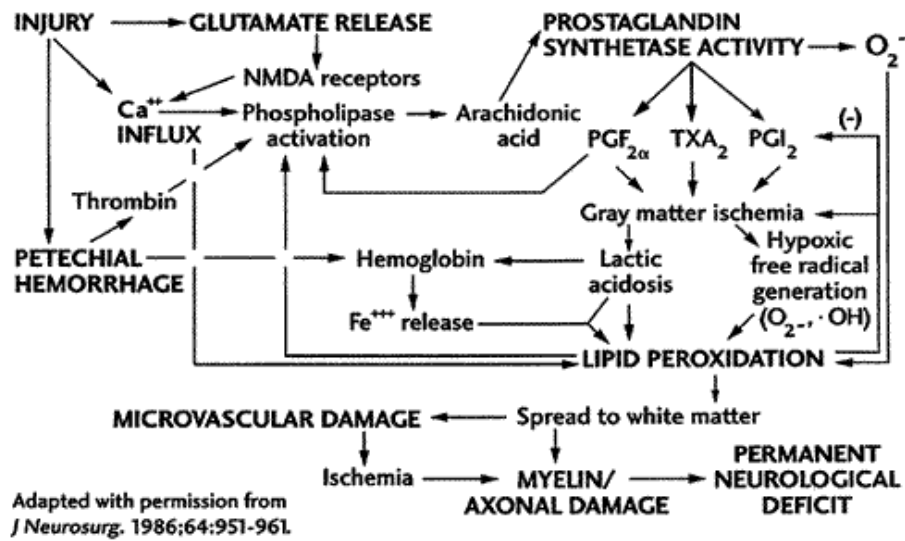


Şekil 2.15. Spinal kordun Primer mekanik zedelenme

2.7.2. SEKONDER MEKANİK ZEDELLENME

Spinal kord zedelenmesi sonrası oluşan patolojik hadiseler yalnızca primer travmaya bağlı değildir. Primer zedelenme sonrası gelişen fizyopatolojik olaylar uzun süreçte sekonder yaralanmayı oluşturur. Sekonder patolojik hadiseler iskemiye içeren önemli zedelenmelere neden olur. Bunlar eksitotoksisite, hücre içi nöronal Ca^{++} artışı, serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonunda artmadır. Spinal kord hasarı sonrası ortaya çıkan iskemi, direkt olarak sekonder patofizyolojik sürece katılır [59,60].

Bu mekanizmaların yöntemi, sekonder yaralanmanın ortadan kaldırılmasını ve asgari düzeye indirilmesini sağlayabilir. Mekanizmaların tümünün altında yatan patoloji, bozulmuş kord perfüzyonu ve hücresel düzeyde enerji azalmasıdır. İskeminin travmatik omurilik yaralanmasından hemen sonra başladığı, tedavi edemez ise ilk 3 saat içinde kötüleştiği ve en az 24 saat boyunca devam ettiği bildirilmiştir [61]. İskemi gri cevherde en şiddetli seviyede olup, kranyale ve kaudale doğru uzanır [62]. Primer yaralanma bir çok sekonder etkilere de neden olur. Bunlar hücre içi Ca^{++} konsantrasyonunda artış, hücre ölümü, akson ve myelin birimlerinin destrüksiyonu ve inflamasyondur [63,64,65,66,67]. Glutamat nöronlardaki NMDA reseptörlerine bağlanır ve hücreler için toksik olan yüksek Ca^{++} akımına neden olur [68]. Hücre içi serbest Ca^{++} , lipaz aktivitesini, kaskad olaylarını ve proteinaz aktivasyonunu içerir [69]. Mitokondri normal şartlarda ATP oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumu söz konusu olduğunda serbestlenen sitokrom-c, apoptotik hücre ölümünde, kaspaz 3 aktivasyonu için önemli rol üstlenir [70,71,72]. Ca^{++} bağımlı bir sistein proteaz olan kalpain de omurilik hasarı, travmatik beyin hasarı ve diğer nörodejenaratif durumlarda doku haraplanması ve hücre ölümünde etkilidir [73]. Spinal kord lezyonlarında, yaralanmayı takiben kaspaz aracılı apoptozis, sitozolik sitokrom-c salınımı ve bax/bcl-2 oranında artış görülür [74]. Spinal kord hasarının medikal tedavisinde yüksek doz metil prednizolon verilmektedir. Ancak bu tedavinin etkinliği sınırlıdır [75,76,77]. Bu tedavinin fonksiyonel tedaviden daha ziyade palyatif bir etkisi bulunmaktadır [78]. Yaralanma sonrasında nöronal hasara sebep olan sekonder yaralanma mekanizmalarının anlaşılması, gelişmiş tedavi şekillerinin uygulanmasında en önemli faktörlerden biridir. Sekonder yaralanmada rol alan pek çok fizyopatolojik mekanizma tanımlanmıştır.[79,80] Bu mekanizmalar Şekil (2.16)'da açıklanır. Ve Tablo (7)'de özetlenir.



Şekil 2.16. Sekonder Spinal kord hasarın mekanizması

Sistemik Etkiler (Nörojenik şok)	Kalp hızında kısa süreli artış, daha sonra uzun süreli bradikardi Kan basıncında kısa süreli artış, sonra uzun süreli hipotansiyon Periferik dirençte azalma Kardiyak debide azalma
Omurilik Dolaşımında Lokal Vasküler Hasar	Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma Özellikle gri cevherde hemoraji Mikrodolaşımda kayıp-mekanik, tromboz, vazospazm
Biyokimyasal Değişiklikler	Eksitotoksitite-glutamat Nörotransmitter birikimi Ketakolaminler-noradrenalin,dopamin Araşidonik asit salınması Serbest radikal üretimi Eikosonoid üretimi Prostoglandinler Lipid peroksidasyonu Endojen opioidler sitokinler

Elektrolit Kaymaları	İntasellüler kalsiyumda artış Ekstrasellüler potasyumda artış İntrasellüler sodyumda artış
Yangısal Yanıt	Serbest radikal üretimi Makrofajlar aksonal yıkım Miyelin artıklarının salınımı Sitokinlerin salınması Glial hücre aktivasyonu Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler Wallerian dejenerasyon
Ödem	
Apoptozis	

Tablo 2.7. Spinal kord sekonder hasar mekanizması

2.7.3. SEKONDER MEKANİK ZEDELLENMENİN MEKANİZMALARI

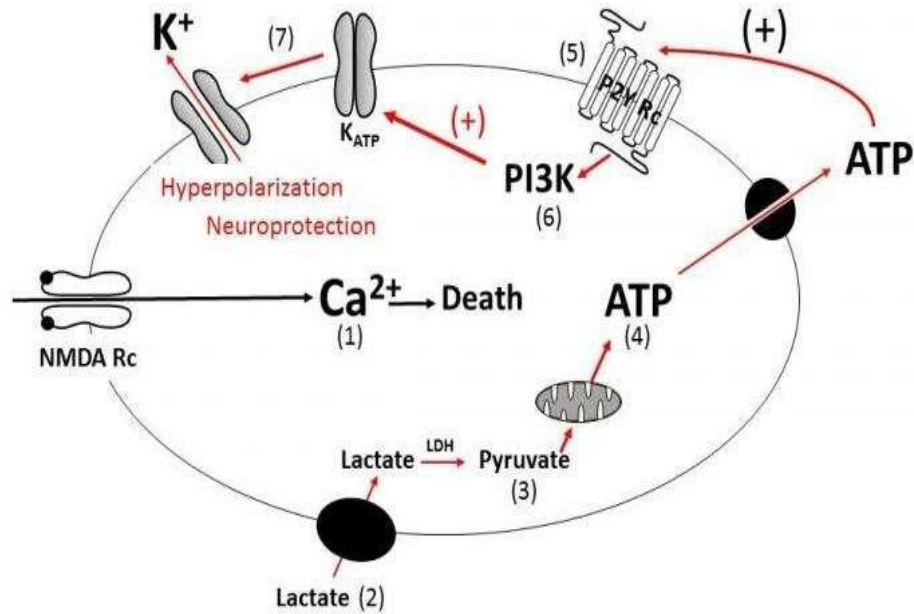
2.7.3.1. ENERJİ METABOLİZMASINDA KAYIP AZALMIŞ ATP ÜRETİMİ

Akut hasardan sonra kordda kanama, ödem, aksonal ve nöronal nekroz kist formasyonu ve enfarktın takip ettiği demiyelinizasyon gibi patolojik değişiklikler oluşur. Akut hasarın sonrası ilk on beş dakikada gri cevher peteşiyal kanamalar, beyaz cevherde ödem gelişir.

İlk iki saatte gri cevherdeki kanamalar artar. Dört saatte çok sayıda şişmiş silindir eksenleri bulunur. Zaman gittikçe patolojik değişiklikler kötüleşir, bu şekilde yaralanmadan altı gün sonra ileri derecede nekroz gelişir ki bu işlem otodestrüksiyon olarak adlandırılır.

Yaralanmadan sonra beş dakika içinde gri cevherin musküler venüllerinin eritrositlerle şiştiği fakat aksonların değişmemiş olduğu görülür. Travma sonrası on beş ve otuz dakika arası eritrositlerin postkapiller perivasküler boşluğa ve musküler venlere ekstrasvasyonu ile birlikte küçük kanamalar oluşur ve aksonal değişiklikler görünür hale gelir. Dört saat sonra bozulmuş myelin kılıflar, aksonal bozulma ve iskemik endotelial hasar saptanır, ilk birkaç gün içinde progresif aksonal değişiklikler ve nekrotik bölgeler gelişir. Yaralanma bölgesinde ödem gelişir ve komşu segmentlere yayılır. Majör travmadan 24-48 saat sonra özellikle daha önce kanla kaplı olan santral bölge olmak üzere yaralanma alanı nekrotiktir.

Birkaç gün sonra hemorajik bölge kavitasyon gösterir ve komşu alanlarda sıklıkla keskin sınırları olan yamasal nekrozlar görülür. Bu ilerleyici değişiklikler, kavitasyon oluşumu, enfarktlerin patolojik özellikleridir. Bu işleme posttravmatik enfarkt denmektedir [80,81,82,83]. Şekil(2.17)



Şekil 2.17. ATP metabolizması ve hücrenin hasarı

2.7.3.2. SERBEST RADİKAL FORMASYONU VE LİPİD PEROKSİDASYONU

Serbest radikal dış yörüngesinde çiftlenmemiş serbest elektron bulunduran kimyasal bileşiktir. Bu elektron başka biyolojik moleküllere aktarılarak oksidasyona yol açar. Serbest radikallerin aşırı artışı hücre ölümüne neden olur Normal hücrelerde doğal olarak oluşan antioksidan bileşikler bu zararlı etkileri kontrol etmesine rağmen omurilik yaralanması gibi patolojik durumlarda aşırı serbest radikal üretimi antioksidan kapasiteyi aşar. Serbest radikaller lipid peroksidasyonuna ve bunun sonucunda hücre membranlarının çözülmesine yol açar. Santral sinir sistemindeki antioksidanlar askorbat, glutatyon ve alfatokoferoldur. Bu antioksidanlar serbest radikalleri nötralize ederler. Travma ise bu maddeleri azaltır. Yoğun serbest radikal oluşumunun önlenmesi hücre yaşamı için önemli bir ilk hayati adımdır. Çünkü normal hücresel solunum işlemlerinde devamlı olarak potansiyel oksijen toksik metabolitleri oluşturulur. Antioksidanların görevi bu serbest radikallerin azaltılması ve oluşumunu engeller [83,84].

O₂ molekülünün elektron atlatması, univalan oksijen redüksiyonu üzerinden gerçekleşen bir çok reaksiyonda reaktif ara metabolitlerin oluşturulmasını gerektirir. Bu, normal hücresel oksidatif fosforilasyon sırasında ciddi serbest radikal oluşumunun gerçekleştiğini düşündürür. Fakat mitokondride, solunum zincirinde metabolize edilen oksijenin büyük kısmı belirgin bir ara serbest radikal oluşumu olmadan suya indirgenir. Bu antioksidan strateji; oksijenin suya, sitokrom oksidaz ile “bir adım dört elektron” redüksiyonu diye tanımlanır. Hipoksi gibi sitokrom C 29 düzeyini azaltan durumlar; mitokondrial elektron transport zincirinden artmış oksijen radikal düzeyi ile sonuçlanır. Diğer hücresel toksik oksidan kaynakları; peroksizomlar, mikrozoimler, çekirdek ve hücre membranına bağlı enzimler (siklooksijenaz, lipoksijenaz) ve çözülebilen enzimlerdir. Bu kaynaklar belirli aralıklarla ciddi sellüler oksidan stres oluşumuna katkıda bulunurlar. Normoksik durumda bu oksidanların bazal seviyeleri, lokal substratların varlığına, Fe²⁺ iyonunun bulunurluğuna ve antioksidanların konsantrasyonlarına bağlıdır. Bu faktörlerin relatif dengesi oluşturulan oksidanların yaşamsal hücresel potansiyel hedeflerden uzak tutulma derecesine bağlıdır. Fe ve Cu gibi transizyonel metal iyonları, oksidan kaynaklı doku hasarı üzerinde majör rol oynarlar. Bunlar,

1.Sitotoksik aldehitleri oluşturan lipid peroksidasyonu.

2.Hidrojen peroksit (H₂O₂) ve O₂ den OH oluşturan Haber-Weiss kimyasal reaksiyonunda etkili olurlar.

Katalaz, SOD ve glutatyon redoks siklusundaki enzimler artmış oksidan stresıyla başa çıkacak primer antioksidan defans mekanizmasıdır. Hücresel substratları okside edebilecek oksijen ve

H_2O_2 yi elimine ederler. Önleyici antioksidanlar olarak düşünülürler. Bunlar serbest radikal konsantrasyonlarını azaltarak serbest radikal zincir reaksiyonlarını önlerler. Bu antioksidanlar, çeşitli organlarda özel spesifik subseleler lokalizasyonlarda bulunurlar.

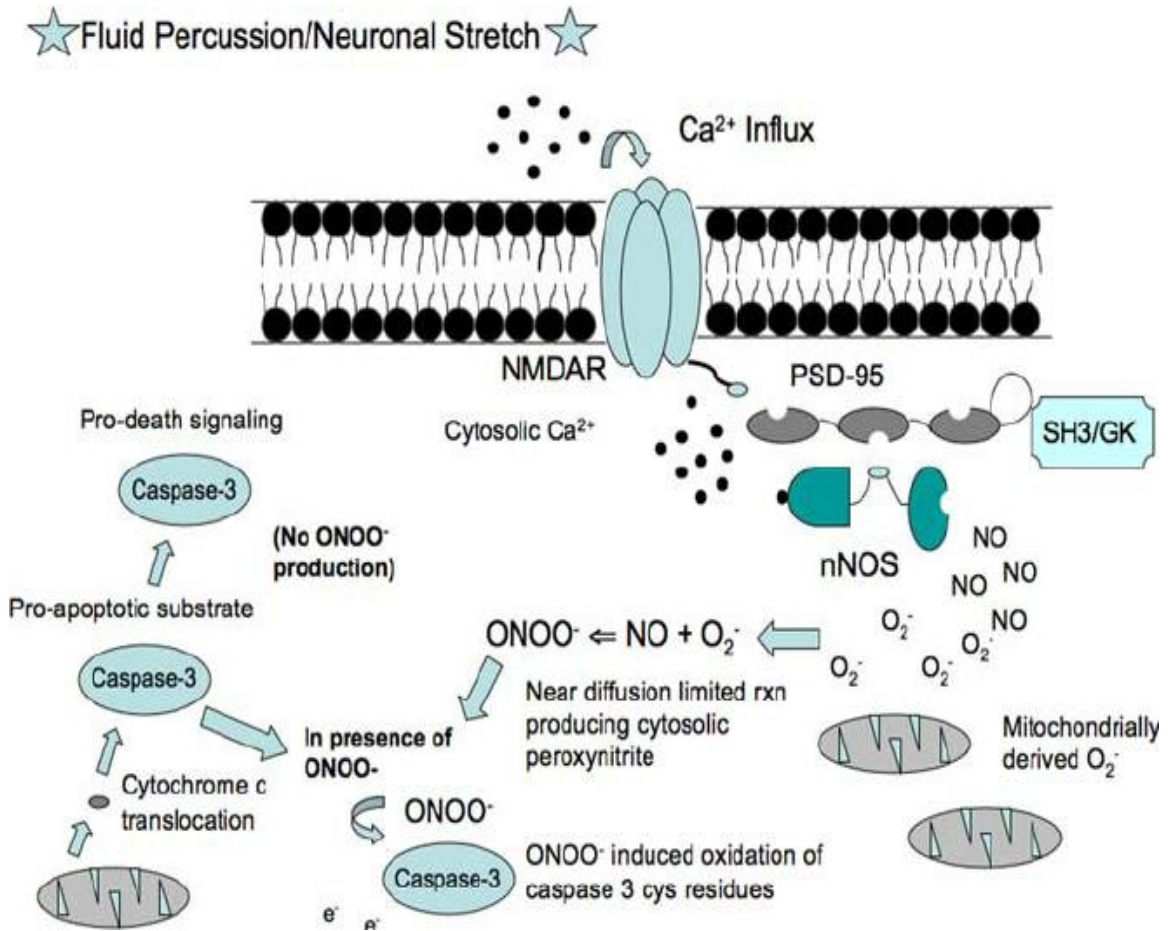
Katalaz tetramerik hemoproteindir. H_2O_2 varlığında $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ reaksiyonunu katalizler. Redoks siklusunun hidroperoksitlerin redüksiyonundan sorumlu ana enzimi glutatyon peroksidazdır. Dört selenyum atomu bağlı tetramerik bir proteindir. Travmadan sonra hasara uğramış sinir sisteminde oksijen molekülünün bir elektron alarak redükte olması sonucu superoksid radikali (O_2^-) oluşur. Süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile H_2O_2 'ye (Hidrojen peroksit) çevrilir, bu ise katalaz yardımı ile H_2O ve O_2 'ye dönüştürülür. Hidrojen peroksit (H_2O_2) genellikle iki süperoksit radikalinin birbiriyle reaksiyona girmesi sonucu oluşur. Zayıf oksidan ve zayıf redüktandır. Elektronları çiftlenmiş olduğu için serbest radikal olarak kabul edilmez. Fe^{3+} varlığında hidroksil radikalinin oluştuğu reaksiyona prekürsörlük etmesi nedeniyle önemlidir. İskemi takiben reperfüzyon sırasındaki serbest oksijen radikali artışı karşısında, endojen antioksidanlar, serbest oksijen radikal temizleyicileri ve peroksidazlar yetersiz kalmaktadır. Hidroksil radikali (OH) bilinen en güçlü oksidan radikaldir, hidrojen peroksit bir elektron ilavesi veya oksijen molekülüne 3 elektron verilmesiyle oluşur. Aktive nötrofillerce oluşturulan hipoklorik asit (HOCl) güçlü bir oksidandır ve demir bağımlı veya bağımsız reaksiyonlarla hidroksil radikalini oluşturulabilir

.Endotel hücreler, nötrofiller, makrofajlar ve mikroglialar süperoksit ve nitrik oksit olmak üzere iki şekilde radikal oluştururlar [85] (Şekil 2.18)

Lipid, nükleikasit, karbonhidrat veya protein gibi biyolojik moleküllere okside edici bir radikalın etki etmesiyle karbon merkezli radikaller oluşur ve O_2 ile birleşerek peroksil radikalini (ROO.) oluşturur ki bu radikal lipid peroksidasyonun başlamasına neden olur. Serbest demir veya demir şelatları iki seviyede serbest radikal oluşumunda etkili olur. Bunlardan birincisi süperoksit iyonu oluşumunda Fe^{2+} 'nin otooksidasyonu olup, ikincisi ise Fe^{2+} 'nin H_2O_2 varlığında okside olup hidroksil iyonu oluşumuna sebep olmasıdır [85]. Serbest radikaller hücreyi oluşturan tüm yapılarla reaksiyona girebilirler ancak bu etkileşime en hassas yapılar lipidlerdir. Yüksek oranda poliansatüre yağ asitleri içeren hücre membranının yıkılması, serbest radikallere bağlı nöronal hasar oluşmasının en önemli aşamasıdır. Serbest yağ asitlerinin serbest radikal ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Lipid peroksidasyon düzeyi lipid peroksidasyonu sırasında oluşan malondialdehit (MDA) gibi ara ürünler aracılığı ile tayin edilmektedir [84].

Vücutta aşırı serbest radikali oluşumunu engelleyen ya da oluşmuş serbest radikalleri yok edebilen antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Bunlar;

süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi reaktif O_2 radikallerini daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri, Alfa tokoferol, askorbat, ürik asid, glutatyon, betakaroten gibi radikal nötralizatörleri ve ferritin, transferin, serüloplazmin gibi reaktif O_2 radikallerinin oluşumunu ve yayılmasını engelleyen, ayrıca mitokondride oluşan radikalleri suya indirgeyen sitokrom oksidaz gibi antioksidan sistemlerdir. Hücre membranında meydana gelen lipid peroksidasyonu membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ve yapısal bütünlüğün bozulmasına yol açarak, anormal iyon girişiyle birlikte hücre ölümüne neden olur. Bu olayın kontrol edilememesi halinde oluşan zincir reaksiyon ile hücre ölümünün yayılması ortaya çıkar. Ayrıca oluşan lipid peroksidasyonu ile birlikte mikrovasküler endotel hasarı oluşarak kan beyin bariyerinin bozulduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir [85].



Şekil 2.18. Spinal kord travmasında serbest oksijen radikal oluşumu

2.7.3.3. İYONİK MEKANİZMALAR

a) İntraselüler kalsiyum (Ca⁺⁺)

Spinal kord beyaz cevher hasarında Ca kanallarının Görevi :

Santral sinir sisteminde yaralanmayı takiben nöronal dejenerasyonun patogenezinde kalsiyuma karşı oluşan membran geçirgenliğindeki değişiklikler önemli yer alır. Mesela nöronal kültürlerde glutamat sitotoksitesisi çalışmaları, beyaz cevher hasarında hipoksi çalışmaları, spinal kord travması sonrası aksonlarda Ca akümüasyonu ultrastrüktürel çalışmaları, optik sinir ve spinal kordda aksonal ve glial Ca seviye değişikliklerini görüntüleme çalışmaları ve posttravmatik spinal kord kan akımı çalışmaları nöronal yaralanmanın Ca hipotezini kuvvetle desteklemektedir [86]. Voltaj bağımlı Kalsiyum kanalları, uyarılabilir hücrelerde kalsiyum girişi için önemli bir reaksiyon oluştururlar. Voltaj bağımlılığı kinetik ve farmakolojik duyarlılık gibi birtakım özelliklerle karakterize heterojen bir grup oluştururlar. Kalsiyum kanallarının fonksiyonel heterojenitesi esas olarak a-1 subünitindeki farklılıklardan çıkarır. Son zamanlarda 33 a-1 subünitinin 6 majör subtipi tarif edilmiştir. Fizyolojik özelliklerinin esasında ve farmakolojik özelliklerine göre bu kanallar düşük voltaj aktivasyonlu ya da T tip kanallar ve birkaç yüksek voltaj aktivasyonlu kanal olarak L, N, P, Q ve R tipleri şeklinde sınıflandırılabilirler [86]. Beyaz cevher hasarında kalsiyum'a bağlı mekanizma çok net değildir. Hipoksi iskemi ya da travmatik hasara maruz kalan nöronlarda iyonotropik glutamat reseptörlerinin aşırı aktivasyonundan kalsiyum aşırı yüklenmesi bildirilmiştir. Gliada AMPA/KA reseptörlerinin aktivasyonu merkezi sinir sistemi beyaz cevherinde toksik hasara ile ilişkilendirilmiştir. Bu AMPA/KA reseptörleri Ca akışını yönlendirirler. Hücre içi Ca artışı proteazların, endonükleazların aktivasyonuna apoptoz, nekroz, mitokondrial hasar ve asidoza öncülük eder ve artmış serbest radikal üretimi aksonal yaralanma ile sonlandırır. Periaksonal gliada voltaj bağımlı Ca kanalları boyunca Ca akışı posttravmatik aksonal iletim azalmasını hızlandırır. Oligodendrositlerde Ca kanallarının yoğun aktivasyonu bu hücreleri destrükte eder. Böylece myelini hasarlar. Bu kanalların blokajı oligodendrosit ve myelinlerini koruyabilir. Böylece travmatik yaralanmayı takiben aksonal iletim korunması yükselir[86].

b) Potasyum (K⁺)

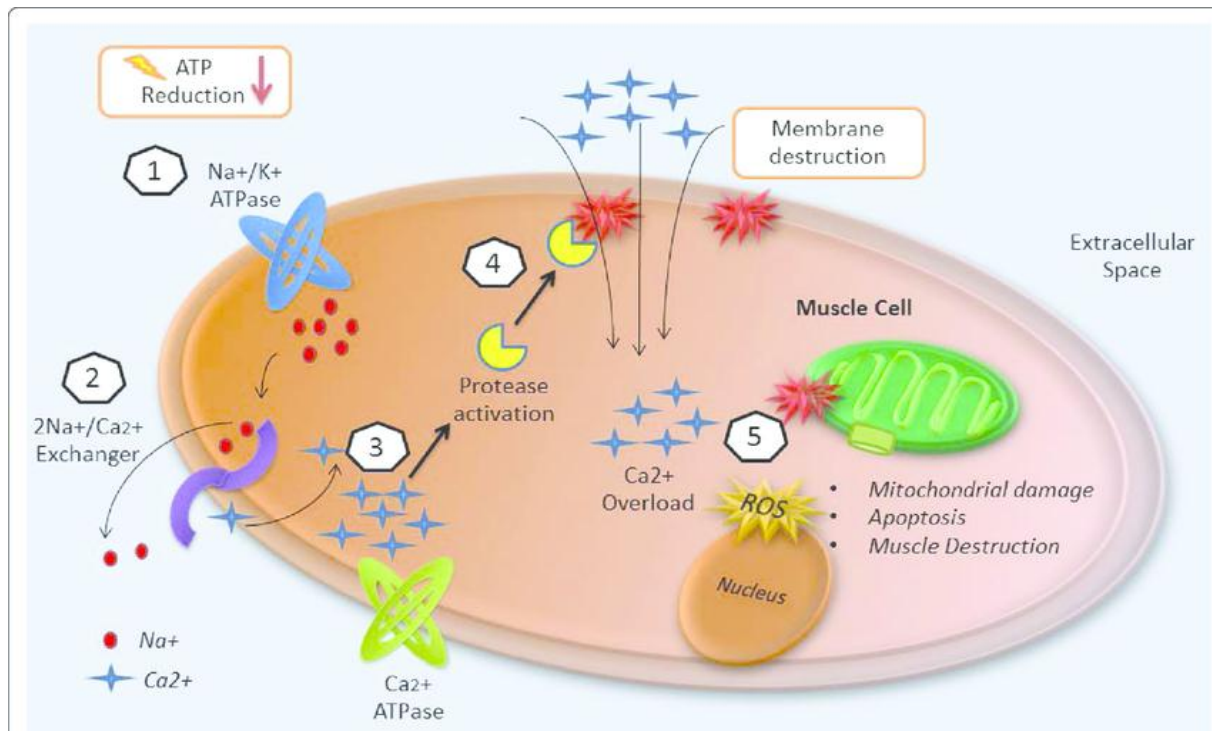
SKH'ndan sonra subpial bölgesindeki kalan aksonlarda fonksiyonel görevi ve ileti bozulur. Bu aksonlarda refraktör zamanı uzar, yüksek frekanslı ileti bozulur, aktivasyon eşiği yükselir, ısı bağımlı ileti bloğu olur ve ileti hızı düşer. Hızlı aktive olan potasyum (K⁺) kanalları miyelin tarafından sarılmış olarak paranodal ya da nodal içindeki bölgelerde yerleşmiştir. Miyelin yaralandığında hızlı potasyum (K⁺) kanallarının aktivitesi yükselir, membran potansiyeli potasyum (K⁺) denge potansiyeline yakın olur ve aksonal ileti bloğu gerçekleşir[87].

c) Sodyum (Na⁺)

Sodyuma bağlı hücre hasarının potansiyel mekanizmaları,

1. Sitotoksik ödem induksiyonu.
2. Hücre içi fosfolipaz aktivitesinin simülasyonu.
3. Na/H kapısı yolu ile intraselüler asidoz.
4. Na/Ca değiştiricisinin ters çalışması ile hücre içi Ca artışı.

Travmatik aksonal hasara voltaj bağlımlı kanallar yolu ile Sodyum girişi sonrası sodyumda bir yükselme ile ilişkilidir ve membran bağlımlı Na/K ATP az disfonksiyonu ile Na⁺ ıkışı azalır. Na artışı Na/H değişimi yoluyla intraselüler asidoza neden olur. Na/H değişimi hücre içi pH'ın regülasyonunda primer role sahiptir [87]. (şekil 1.19)



şekil 2.19. Hücre hasarında Ca ve Na imbalansı

2.7.3.4. ENDOJEN OPIOİDLER

Deneyisel modeller SKH sonrasında fazla endojen opioid peptid lokal salınımı olduğunu göstermiştir. Dinorfin kappa reseptörleri üzerinden etkilidir. Mikrosirkülatuar kan akımını düşürür, sekonder hasarı arttırır. Naloksan ve tiotropin releasing hormon gibi endojen

antagonistler bazı sıçan modellerinde spinal kord kan akımını artırıp nörolojik defisitleri azaltmışlardır. Bazı yapılan çalışmalarda ise nörolojik düzelmeye katkıları olmamıştır. NASCİS grade II çalışmasında naloksan plasebodan daha iyi klinik sonuçlanmamıştır. Fakat toplanan verinin tekrar analizi yaralanma sonrası ilk sekiz saatte fonksiyonel düzelmeye katkısını göstermiştir [88].

2.7.3.5. SPİNAL ŞOK

SKH sonrası yaralanmanın şiddeti ve seviyesine bağlı olarak sempatik tonus azalması, periferik rezistans ve kardiyak debi azalmasına bağlı ağır hipotansiyon ve bradikardi gelişmesidir. Spinal şok nedeniyle spinal kord vasküler yatağında otoregülasyonun bozulması ve perfüzyon basıncının düşmesine bağlı olarak dokulara yeterli oksijen ulaşmasını engellenir. Spinal şoktaki bir hastada sistemik tansiyonun düşmesi mutlaka kontrol altına alınmalıdır. Çünkü perfüzyon basıncı, sistemik kan basıncına dogrudan bağlıdır.

Perfüzyon basıncı = Sistemik kan basıncı- lokal doku basıncı şeklinde formüle edilebilir [89].

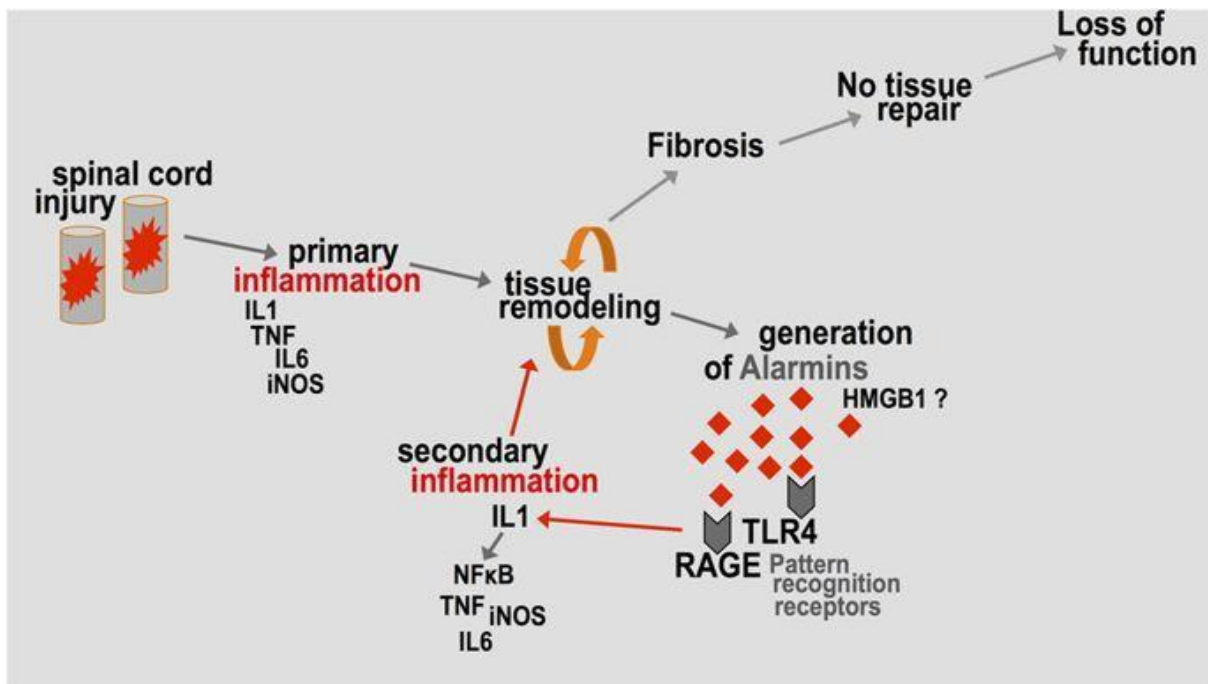
2.7.3.6. VASKÜLER VE ENDOTEL HASARIN MEKANİZMALARI

SKH'lı hastalarda primer ya da mekanik travma fonksiyonel hasarı tam olmasına rağmen nadiren tam transseksiyon nedenidir. Ek olarak kordtaki biyokimyasal ve patolojik değişiklikler hasar sonrası kötüleşebilir. Akut SKH sistemik etkileri hipotansiyon ve azalmış kardiyak outputu içerir. Lokal etkiler hasarlı spinal kord segmentinde otoregülasyon kaybı, hem gri, hem de beyaz cevherde özellikle hemorajik ve yakın bölgelerde mikrosirkülasyonda belirgin azalmadır. Mikrosirkülatuvar otuz iki kayıp yaralanma bölgesinin proksimaline ve distaline yayılır. Spinal kord kan akımında yaralanmadan sonra zamanla kötüleşen bir spinal kord kan sirkülasyonunun azalması gerçekleşir. Akut SKH'a bağlı fonksiyonel defisitler motor ve somatosensoriyel uyarılmış potansiyeller ile elektrofizyolojik olarak ölçülmüş ve posttravmatik iskeminin derecesine göre orantılı olarak bulunmuştur [90]. Histolojik etkiler yaralanma bölgesinde erken hemorajik nekrozdan majör enfarkta kadar görülür. Bu posttravmatik vasküler etkiler tedavi edilebilir. Sistemik normotansiyon, volüm ekspansiyonu ya da vazopressörlerle sağlanır. Ve spinal kord kan akımı dopamin, steroidler, nimodipin yada volüm ekspansiyonu ile düzeltilebilir. Bu sonuçlar posttravmatik iskeminin önemli bir sekonder hasar mekanizması olduğunun kanıtıdır. Deneysel kord travmasından sonra mikrovaskülarizasyonu göstermek için çeşitli anjiyografik yöntemler kullanılmıştır. Bunların hepsi mikrosirkülasyonda majör redüksiyonu ve

perfüzyon kaybını göstermektedir. Bu yöntemlerden birisi kolloidal karbon anyografişidir. Kordun anterior spinal arter, anterior sulkal arter gibi büyük damarları neredeyse ağır kord yaralanmalarından sonra bile her zaman açık kalmıştır. Neredeyse bütün araştırmacılar ağır yaralanmadan sonra kan akımında azalma saptamışlardır. İlk birkaç saatte posttravmatik iskemide progresif kötüleşme eğer erken tedavi edilirse iskeminin önlenabilirliğini göstermesi açısından en ilginç bulgulardan biridir [90].

2.7.3.7. İNFLAMASYON

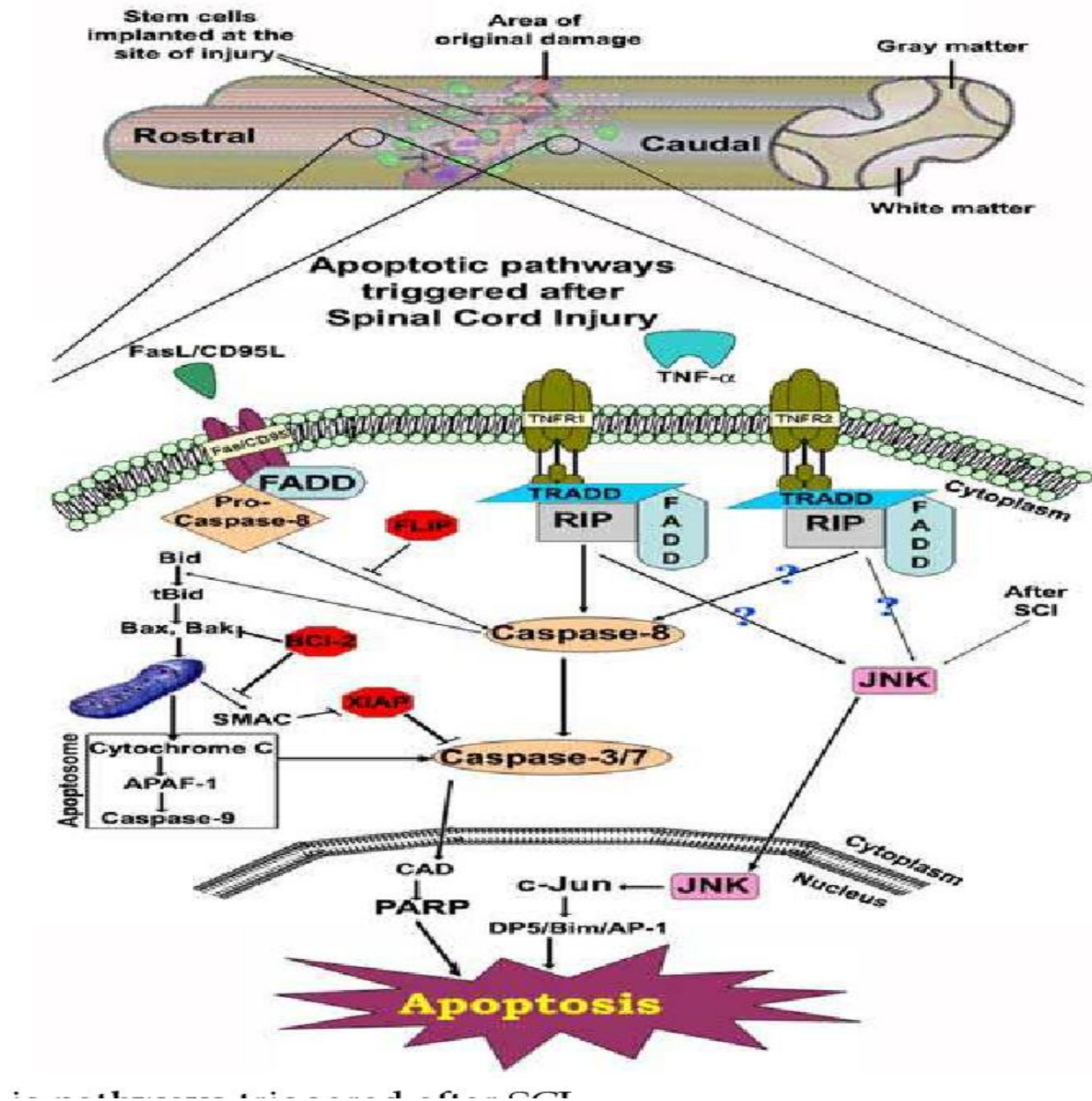
SKH sonrası MSS enflamatuvar yanıtları periferik immün hücreler tarafından başlatılır. (Makrofaj, nötrofil, T hücreleri). Yaralanmayı takiben lezyonun içine aktive astrositler ve mikroglial hücreler göç ederler. T hücreleri makrofaj aktivasyonu için ve hücrel immün cevabı oluşturmak için önemli görev almaktadır. Makrofajlar ve nötrofiller doku harabiyeti ve lezyonun büyümesinde sebep olurlar. Makrofaj ve mikroglia sitokinlerin salınımıyla (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10) sekonder patolojik ve inflamatuvar yanıtta rol alırlar. Sitokinler inflamatuvar yanıtı ek sitokinlerin, kemokinlerin, nitrik oksidin (NO) relatif oksijen ve nitrojen türevlerinin ekspresyonunu indükleyerek santral sinir sistemi enflamatuvar cevabını hızlandırırlar. Aktive lökositler yara iyileşmesi için önemli olan büyüme faktörleri ve proteolitik enzimleri de salgırlar. Enflamasyonun spinal kord yaralanması sonrası hem nörokonstrüktif hem de nörodestriktif işlemlere yardımcı olduğuna inanılır. Erişkin MSS’i enflamatuvar yanıtının diğer dokulara göre daha yavaş hızda işlediği bildirilmiştir [91]. (Şekil 2.20)



Şekil 2.20. SKH’ında İnflamasyon

2.7.3.8. NEKROZ VE APOPTOZ

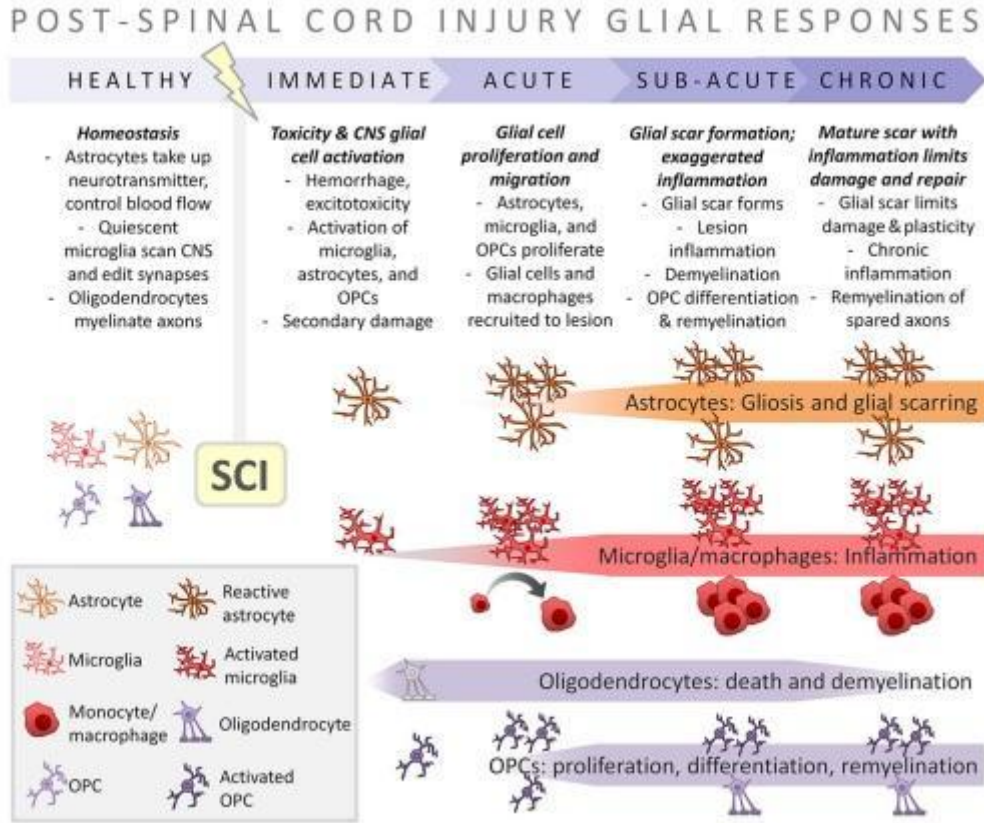
SKH apopitotik hücre ölümü indüklenebilir hücreler tarafından spesifik indükleyici bir sinyal ile aktif olarak regüle fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümüdür. Akut SKH'ı takiben apopitotik hücre ölümü bilgisi nöronal hücre ölümünü sınırlamak ve nörolojik fonksiyonu iyileştirmek için yeni ek yöntemler sağlayabilir. Birçok anti-apopitotik ajan gösterilmiştir ki bunlar SKH bölgesinde nöral doku ölümünü sınırlar. Bcl-2 onkogeninin akut SKH'ı sonrasında histolojik sağ kalımı artırdığı gösterilmiştir. Bcl-2 radikal jenerasyonunu, radikal düzenlenmesini sınırlayan antioksidan yolağı regüle ederek apopitotik hücre ölümünü inhibe eder görünmektedir. Apopitotik hücre ölümü SKH'ı takiben 3 haftaya kadar saptanmaktadır. Apoptoz kesin olarak regüle bir işlem olduğundan bu bulgular apopitotik yolları manüple ederek SKH'nda tedavi fırsatı sağlamaktadır. Kaspazların buradaki önemli rolü iyi bilinmektedir. Kaspaz-1 (İL-1 beta konverting enzim)'in akut MSS hasarında (iskemi ve travma) olduğu gibi kronik nörodejenerasyon (ALS, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı) modellerinde de kritik bir apoptoz mediyatörüdür. Bu hayvan modellerinde kaspaz-1 aktivasyonu gösterilmiştir ve kaspaz inhibisyonunun doku hasarını azaltmakla kalmayıp nörolojik fonksiyonları düzelttiği de görülmüştür. Kaspas-3 aktivasyonunun da spinal kord yaralanması sonrası iskemi ve travmada rol aldığı gösterilmiştir. Bütün spinal kord hücresel komponentlerinde (nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve mikroglia) apopitotik hücre ölümü gerçekleşir. Küçülmüş lezyon boyutu iyileşen motor fonksiyon gibi bütün farklı hücre türlerinde hücre ölümü inhibisyonundan kaynaklanır. Nöronal koruma çok açık olarak önemlidir, çünkü spinal korddaki nöronların rejenerasyon yeteneği yoktur. Glialın rejenerasyon olabileceğine rağmen glial ölümü engellemek nöronal korunmayı en azından iki benzer mekanizma ile destekler. Birincisi glia hasarlı nöronlara aksonal yolların ölmek üzere olan yaralı hücrelerin iyileşmesi için gerekli olduğu gibi nörotrofik yirmi sekiz ve metabolik destek sağlar. İkincisi apoptoz sırasında ölen hücreler; sitokinler, serbest radikaller gibi ek apoptoz mediyatörleri salgılar ki bunlar diğer komşu hücrelere fazladan toksik etkilidir [92] (Şekil 2.21).



Şekil 2.21. SKH'ında Apoptoz

2.8. SKH PATOLOJİSİ VE NÖROİFLAMASYON

SKH'ı takiben başlayan sekonder hasar süreci akut, subakut ve kronik evre olarak sınıflanabilir. Hemoraji ve hızlı nekrozu takiben, astrositler ve mikroglia aktif hale gelir, lezyon bölgesine inflamatuvar hücreler göç eder. Hasardan haftalar sonra skar dokusu oluşur, beyaz cevherde Wallerian dejenerasyonun değişik evreleri gözlenir [93] (Şekil2.22)'de özetlenir.



Şekil 2.22. SKH Nöroinflamasyon ve evreleri

2.8.1. AKUT EVRE

SKH'dan sonraki ilk değişiklikler, spinal kord gri cevher mikrovaskularitesindeki değişikliklerdir. Santral kanal çevresi ve ön boynuzdaki multifokal peteşial hemorajiler saatler içinde akut olarak yayılma eğilimindedirler. Mikrotrombüslerin gözlenmesi ve kanın ekstravaze olması ilk 24 saatte belirgin olur. Hasardan dakikalar sonra endotel bileşikleri açılmaya başlar. Santral peteşiler genişledikçe glial reaksiyon ve nöronal dejenerasyon belirginleşir. Nöronlarda nekrozun ilk göstergeleri birinci saatte ortaya çıkar. Sitoplazmik eozinofili, hayalet hücreler, Nissl cisimciğinin kaybolması, küçülmüş nöronlar, hiperkromatizasyon, irregüler şekil nekrotik değişiklik göstergeleridir. Gri cevherdeki nekrotik değişiklikler ilk saatlerde artar, 8. saatten sonra beyaz cevhere yayılmaya başlar. Ön boynuz hücrelerinde arka boynuz hücrelerine göre nekroz daha erken fark edilir. Hem nöronlar hem de glial hücrelerde aynı zaman aralığında hücre ölümü görülür. İntraselüler Ca^{++} artışı sonucu nukleazlar, proteazlar, kinazlar, lipazlar ve Nitrik oksit (NO) sentetazın aktivasyonu ile hücre hasarı artar ve hücre ölümü nekroz ya da apoptoz şeklinde olur. Travma sonrası saatler içinde akson ve miyelin kılıfı arasında oluşan ayrılma, ödem

ve intramiyelik vakuoller nedeniyledir. Bu tip miyelin değişikliğinin yayılması ışık mikroskopisinde beyaz cevhere sünger görüntüsü verir. Bu aksonal değişiklikler yaralanma merkezinden radial olarak yayılıp birkaç günde pial yüzeye ulaşır [94].

2.8.2. SUBAKUT EVRE

SKH sonrası aktive olmuş mikroglia ve astrositler reaktif gliosis oluşturmaya başlarlar. Mikroglia, nöronal dejenerasyon varlığında, kimyasal uyarılar altında sitotoksik makrofajlara dönüşür. Bu hücreler lezyon santralinde çalışırlar ve nadiren yayılırlar. Sağlam ya da az yaralanmış hücreleri öldürüp öldürmediği henüz anlaşılamamıştır. Yaralanmaya cevap olarak astrositler hipertrofi ve proliferasyon gösterirler. Astrositlerde glial fibrillary acidic protein ile boyanan ara filamanlarda yaralanmamış spinal kord dokusuna göre daha büyük ve fazla proses görülür. Oksidatif ve lizozomal enzimler yükselir. Reaktif astrositler 1. haftada lezyon yanında birikmeye başlar. Astrositik yanıtı 14. günde en fazla iken, 28. güne kadar ortaya çıkar. Yaralanmış kan beyin bariyerine (KBB) bağlı ödem oluşumu hasardan sonra erken saatlerde başlar, radial ve longitudinal olarak ilerler, ilk 24 saatte belirginleşir. Sekizinci güne kadar süren ödem hidrostatik veya filtrasyona bağlıdır. Ödem, pia elastisitesi olmadığı için vasküler rezistansın artmasına ve dolayısı ile omurilik kan akımının azalmasına neden olur. İnflamatuvar hücrelerin hasarlı spinal kordun dokusuna göçünde iki faz vardır. Birincisinde, polimorfonuklear granulositler hasardan saatler sonra lezyon bölgesine gelerek sitotoksik etkileri ile nöronofaji yapabilirler, 24 saatte maksimum düzeye ulaşırlar, 3. günde kaybolurlar. İkinci fazda, lezyon bölgesine monosit ve makrofajlar gelir ve hücre debrisini fagosite ederler. Schwann hücreleri, meningeal hücreler ve fibroblastlar lezyon bölgesine göç eden diğer periferel hücrelerdir. Schwann hücrelerinin hasarlı akson miyelinini tamir ederek ve nörotrofik faktörleri salgılayarak aksonal rejenerasyonda rol aldıkları gösterilmiştir. Meningeal hücrelerin görevleri tam anlaşılamamakla birlikte glia limitansı kurmak olabilir. Fibroblastlar meninks kaynaklı olabilir. Travma sonrası bazik fibroblast büyüme faktörü salınımının artması fibroblast proliferasyonu ve neoanjiogenez ile ilişkili olabilir [94,95].

2.8.3. KRONİK (GEÇ) EVRE

SKH'den haftalar ve aylar sonrası, akut ve subakut evre olaylarının çözülmeye başlaması ile santral kanala yayılmış olur, beyin-omurilik sıvısı (BOS) ile dolu kistik kaviteler oluşur. Spinal

kordda yara iyileşmesi kistik kavite oluşması ile sonuçlanır. Guizar-Shagun ve arkadaşları SKH sonrası kist gelişmesinde üç faz olduğunu bildirmişlerdir.

Nekroz fazı: ilk 24 saatte başlar ve travmadan sonraki 1-2. haftaya kadar sürer;

Tamir fazı: travmadan sonraki 2. ve 8. haftalar arasındadır;

Stabilizasyon fazı: lezyondan sonraki 8. haftadan 1. yıla kadar değişir.

Travmadan sonraki 3. günde parankimatoz hemorajiler, vasküler trombozis, ödem, aksonal segmentasyon ve enflamatuvar infiltrasyon ile birlikte mikrokistik kaviteler görülmeye başlar. Kontüzyondan 2-3 hafta sonra nekrotik dokuyu rezorbe eden makrofajlar lezyon bölgesini terk ederken değişik hacimde kaviteler oluşturmuştur. Travmadan 4-5 hafta sonra trabeküler sistem içindeki kistlerin sınırları gözlenir. Geç lezyonun önemli bir komponenti de miyelin kaybıdır. Orta şiddetteki travmalarda akson devamlılığının korunduğu, ancak selektif demiyelinizasyon olduğu gösterilmiştir. Demiyelinizasyon ilk günde başlar, 2. haftada maksimum seviyesine ulaşır. Üçüncü haftada remiyelinizasyon başlar. Remiyelinizasyonda oligodendrositlerin rolü olabileceği gibi, lezyon sahasına dorsal root giriş zone bölgesinden Schwann hücrelerin göçü, bu hücrelerin de remiyelinizasyonda rol aldıklarını düşündürmektedir [95,96].

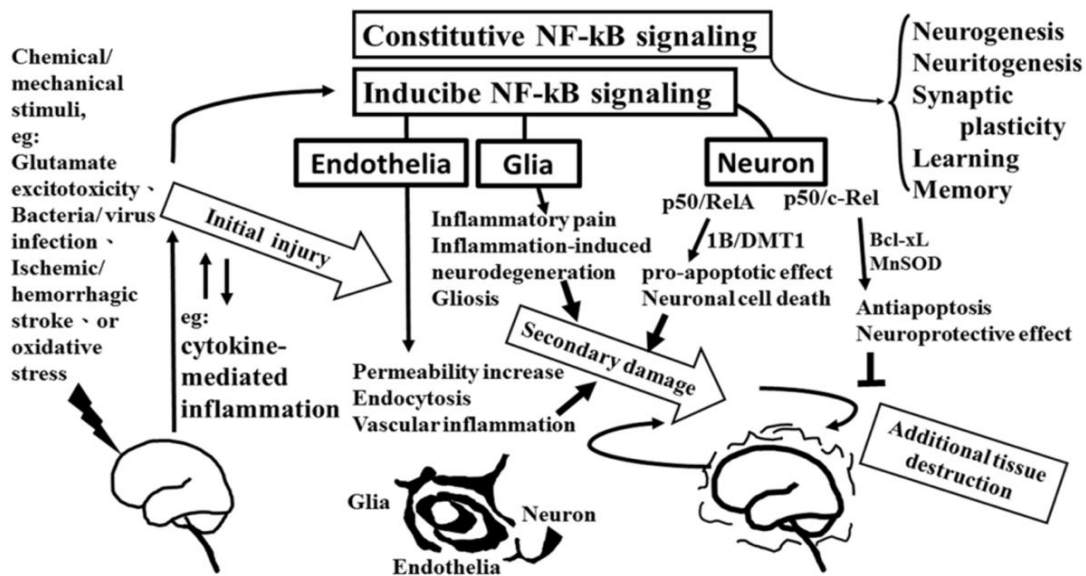
2.9. SKH'INDA NF-κB YOLU

Günümüzdeki son araştırmalarda ortaya çıkan NF-κB kompleksi pek çok canlıda bulunmaktadır [97] ve ilk olarak Sen ve Baltimore adlı bilim insanlarının yaptıkları çalışma ile tarif edilmiştir. İmmünoglobülin μ ve κ güçlendirici dizilere bağlanan proteinleri bulmak amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda O ve B olmak üzere iki farklı zinciri bulunmuştur. NF-κB'nin bu dizilerden B dizisine bağlandığı ve κ hafif zincirinin ekspresyonunu sağlayan proteinlerden biri olduğu gösterilmiştir [98]. NF-κB, DNA'ya doğrudan bağlanarak gen ekspresyonu kontrolünde rol oynadığı için bir transkripsiyon faktörüdür. Ayrıca NF-κB hormonlar gibi çeşitli uyarıcı moleküller tarafından aktive olan ve çok sayıda genin transkripsiyonunu düzenleyen sinyal yolağı olarak görev almaktadır [99].

NF-κB, B ve T lenfositleri, büyüme faktörleri, monositler, makrofajlar, keratinosit ve fibroblastlar tarafından eksprese edilip [100]; sitokinler kemokinler, sitokin reseptörleri, stres proteinleri, büyüme faktörleri, lökosit adezyon molekülleri, immün düzenleyiciler gibi bağışıklıkta etkin olan çok sayıda genin uyarılabilir ekspresyonu için önemli bir düzenleyici proteindir [100,101]. Yapılan ve yapılmakta olan pek çok çalışma ile NF-κB'yi bağlayan bölgeler bulunduran ve

dolayısıyla NF- κ B ile ilişkilendirilen yüzlerce gen bulunmuştur. Bu bölgelerin varlığı NF- κ B'nin olası görevlerini aydınlatmak için önemlidir. Bu bölgelerin varlığı NF- κ B'nin hematopoez, transformasyon, hücre proliferasyonu, immünite, hücre sağkalımı, metastaz, anjiogenez ve invazyon gibi görevleri olduğunu göstermektedir [102].

Santral sinir sisteminde de NF- κ B'nin varlığı ve önemi tespit edilmiştir. Spinal kordda, beyinde serebral kortekste, hipokampusta (granül ve piramidal hücrelerde), serebellumda ve hipotalamusta bulunur. Beyinde bulunan NF- κ B'nin nöronal plastisitede, öğrenmede, ve bellek oluşumunda görev aldığı bilinmektedir. Ayrıca nöronların proapoptotik ya da antiapoptotik etkilerine aracılık eder [103]. NF- κ B'nin olağan dışı aktivasyonu ve inhibisyonu metabolik, inflamatuvar ve nörodejeneratif ve kanser gibi pek çok hastalığın patofizyolojik süreçlerinde rol oynar [101,102,103]. (Şekil 2.23)

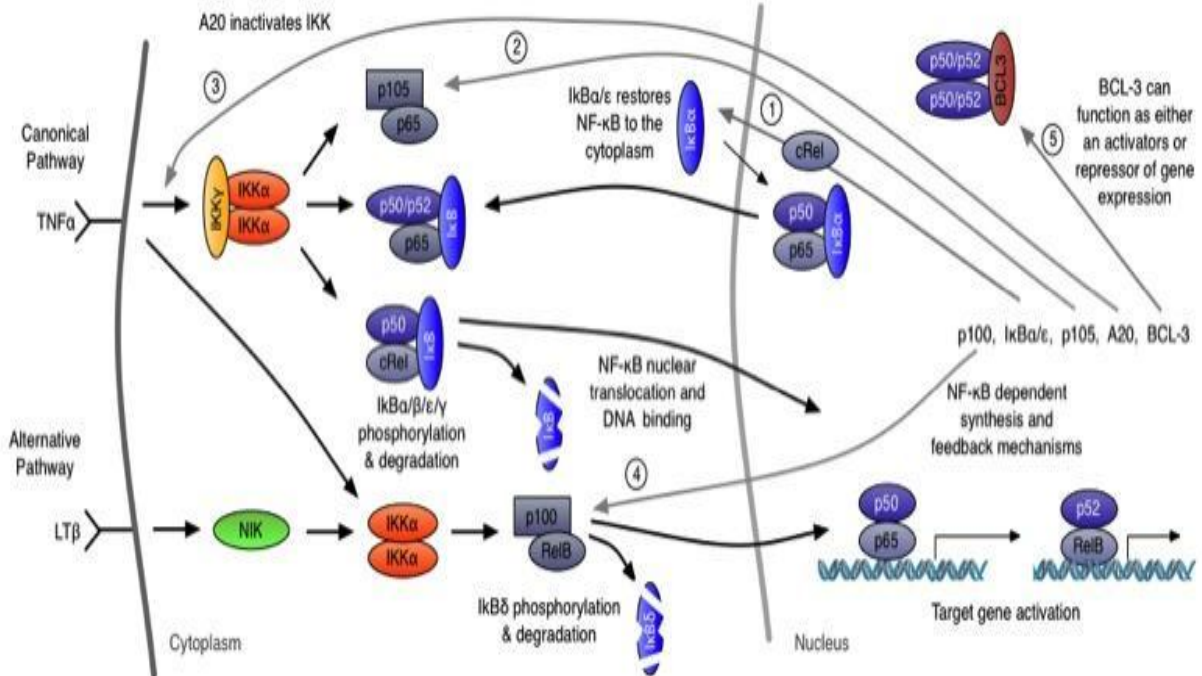


Şekil 2.23. NF- κ B aktivasyonunun nöron, glia ve endotel üzerine etkilerinin şematik olarak gösterilmesi

2.9.1. NF- κ B'NİN AKTİVASYONU

NF- κ B, Rel domaini içeren ve memeli genomunda 5 alt birimden (p52, p50, RelA, RelB, c-Rel) oluşan bir protein ailesidir [101, 104]. Normal koşullarda hücrede inaktif halde bulunan NF- κ B'nin aktive olabilmesi için bu alt birimlerin homodimer ya da heterodimer oluşturması gerekir [104].

NF- κ B ailesi üyelerinin ortak bulundurduğu bölge, immünglobülin benzeri tekrar bölgeleri içeren ve NF- κ B'nin DNA'ya bağlanmasını, alt birimlerle dimerizasyonunu ve çekirdeğe taşınımını sağlayan Rel-domain bölgesidir. Beş farklı alt birimden yalnızca iki alt birim (p50 ve p52) prekürsörler şeklinde sentezlenir ve işlemlenmeler sonucunda aktive olurlar. P50 alt birimi, prekürsörü olan p105'in devamlı proteolitik işlenmesi sonucu oluşurken; p52 alt birimi ise prekürsörü olan p100'ün fosforilasyon ve ubiquitinasyon basamakları sonucu oluşur. Her iki alt birim de TA bölgesi içermediği için transkripsiyonel açıdan inaktiftir. Bunun tersine RelA, RelB ve cRel alt birimleri hücrede prekürsörü olmadan sentezlenirler ve TA bölgesi içerdikleri için hedef genlerin transkripsiyonunu başlatırlar [104]. NF- κ B ailesi üyelerinin homo ve heterodimerizasyonu ile 15 farklı transkripsiyon faktörü oluşturabilmektedir. p50-RelA; p52-RelA; RelA-RelA; cRel-RelA; cRel-cRel; p50-cRel; p52-cRel; p50-RelB; p52-RelB dimerleri hücrede transkripsiyonel aktivatördür [105]. TA bölgesi içermeyen p50 ve p52'nin homo ve heterodimer formları ise transkripsiyonel açıdan inaktiftir [104, 105]. RelA-RelB; cRel-RelB; RelB-RelB dimerleri ise DNA'ya bağlanamaz [105]. NF- κ B aktive olabilmesi için alt birimlerin dimerizasyonu 3 farklı yolakla gerçekleşir. Bu yollar; geleneksel (canonical), alternatif (non-canonical) ve DNA hasarı durumunda devreye giren yollarlardır. (Şekil 2.24)'te özetlenir.



Şekil 2.24. NF- κ B yolları

2.9.2. GELENEKSEL (CANONICAL) YOLAK

Bu yolak ile NF- κ B aktivasyonu, immün yanıtta inflamasyonun düzenlenmesi için lenfoid hücrelerin çoğalmasından ve yıkımından sorumludur [105]. En sık görülen aktif formlardan biri olan p50/RelA dimeri bu yolakla oluşur. NF- κ B dimerleri (p50/RelA) dinlenme durumundayken I κ B adı verilen inhibitör proteinlere bağlı olduğu için inaktif formdadır ve DNA'ya bağlanamaz. İnaktif formdaki bu dimerler, pro-inflamatuar sitokinlerce (TNF- α , IL-1 β vb.) veya LPS ile uyarılarak inflamatuvar stimülasyon sağlanır. Ardından dimerleri inaktif formda tutan I κ B proteinleri inhibitör kappa B kinaz (IKK) enzimi tarafından fosforillenir [105, 106]. Bu olay I κ B'yi ubiquitinasyona hazır hale getirir ve ubiquitinasyondan sonra I κ B'nin ubiquitin-proteozom sistemi aracılığı ile degradasyonu gerçekleşir. Sitoplazmada I κ B/NF- κ B kompleksinde serbest kalan NF- κ B(p50/RelA dimeri) nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe geçer [104].

2.9.3. GELENEKSEL OLMAYAN (NON-CANONICAL) YOLAK

Bu yolak ile NF- κ B aktivasyonu, immün yanıtta görevli olan lenfoid organların gelişiminden sorumludur.

En sık görülen diğer bir aktif form olan p52/RelB dimeri bu yolakla aktive olur. Geleneksel olmayan yolak geleneksel yolağa göre daha yavaş bir kinetiğe sahiptir. Bu yüzden bu yolakta görülen p52/RelB dimer aktivitesi geç gerçekleşir, ancak daha uzun süreli aktivasyon sağlanır. Sitoplazmada dinlenme durumunda inaktif form şeklinde bulunan p100/RelB dimeri, lenfotoksin β , B-hücre aktive edici faktör (BAFF) ve CD40 ligandları varlığında stimüle olur [104,105]. Ayrıca yapılan çalışmalarla bu uyarıcıların geleneksel yolağı da aktive ettiği gösterilmiştir [107]. p52 monomerinin öncülü olan p100, IKK homodimeri tarafından fosforile edilir. Bu fosforilasyon sonucunda p100'ün p52'ye dönüşümü gerçekleşir, transkripsiyonel açıdan aktif olan p52/RelB dimeri serbest hale gelir ve nükleer lokalizasyon sinyali ile çekirdeğe geçer [104, 105, 107].

2.9.4. DNA HASARI

Bu yolak ile NF- κ B aktivasyonu DNA hasarına karşı oluşan cevaptan sorumludur [97]. Bu yolakta, geleneksel ve geleneksel olmayan yolaktan farklı olarak IKK aktivitesine gerek yoktur. Özellikle DNA'nın çift zincir kırık hasarıyla devreye giren bu yolağın iki paralel süreci vardır. İlk

olarak PIDD adı verilen ve ‘ölüm (death)’ bölgesi içeren p53 ile uyarılan protein aktive olur ve çekirdeğe geçer. Çekirdekte bulunan IKK/NEMO’nun, bir çeşit kinaz olan RIP1 (Reseptörler etkileşen protein 1) ile birleşip kompleks oluşturması ve SUMO ve ubikitin yoluyla modifikasyonu bu yolaktaki ilk süreci oluşturur. İkinci süreçte ise SUMO ve ubikitin yoluyla modifiye edilen IKK/NEMO kompleksi sitozole geçer ve IKK’yi aktive ederek NF- κ B aktivasyonunu sağlar [104].

2.9.5. NF- κ B’NİN İNHİBİSYONU

Aktive olup çekirdeğe geçen NF- κ B, transkripsiyon faktörü olarak görevini yaptıktan sonra tekrar sitozole geçer. Sitozolda dinlenim durumundayken NF- κ B ile etkileşen ve onun inhibe hale gelmesini sağlayan inhibitör, kappa B (I κ B) proteinleridir. I κ B proteinlerinin NF- κ B ile protein-protein etkileşimleri, I κ B’nin yapısında bulunan ankrin tekrarları sayesinde olur. I κ B’nin ankrin tekrarları, NF- κ B’nin yapısında bulunan RHD’ye bağlanarak NF- κ B’nin çekirdek lokalizasyon sinyalini tanıyan bölgenin maskelenmesini sağlar [97,105,107] Doğal süreçte inhibisyonun yanısıra çeşitli ilaçlar, dışardan alınan doğal maddeler ve bazı hastalıklar sonucunda da NF- κ B inhibisyonu gerçekleşir. NF- κ B aktivasyonunun inhibisyonu kanser, koroner kaynaklı kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Örneğin kırmızı şaraptaki resveratrol maddesi NF- κ B aktivitesini inhibe eder. Bu özelliği sayesinde koroner kalp hastalıkları ve bazı kanser türlerinde ölüm oranlarını düşürebileceği düşünülmektedir [108]. Ayrıca Umezawa ve arkadaşları tarafından dizayn edilen antibiyotik kökenli DHMEQ (dehidroxymethyl-epxyquinomicin) maddesi kanser hücrelerinde aktive olmuş NF- κ B’yi inhibe etmektedir [109].

2.10. SKH’İN TEDAVİSİ

SKH sonrası tedavinin asıl amacı, oluşabilecek ikincil hasarı engellemektir. Hem cerrahi hem de medikal tedavi ile travmatize olmuş spinal kordda koruyucu nöroprotektif ajanların kullanılması bilinen tedavi yöntemleridir. SKH sonrası ilaçlar, tek veya etkilerini potansiyelize edip etmediklerini saptamak amacıyla kombine şekilde deneysel çalışmalarda denenmiştir [54]. Günümüzde tedavi yaklaşımı ise hasarlı olmuş spinal korddaki -özellikle- aksonların yeniden

görevlerini yapabileceği rejenerasyon çalışmalarıdır. Ayrıca kafa travması, kardiyak arrest ve serebral iskemi tedavisinde kullanılan hipotermi de güncel tedavi yöntemleri arasındadır [110].

2.10.1. SKH’NİN CERRAHİ TEDAVİSİ

Yaralanma sonrası primer hasara neden olan kanama, hematoma, kemik ve disk fragmanları gibi yer kaplayan oluşumların çıkarılmasını içeren dekompresif yaklaşımlar erken dönemde fayda sağlayabilir. Yaralanma sonrası ilk 24 saat içinde acil dekompresyon, yapılmaması durumunda kötüleşecek olan nörolojik durumu iyileştirebilir. Ayrıca yapılacak olan stabilizasyon anatomik pozisyonda düzelmeye ikincil hasarın şiddetlenmesini engelleyebilir [111].

2.10.2. SKH’DE CERRAHİ OLMAYAN (MEDİKAL) TEDAVİ

SKH üzerine yapılan deneysel çalışmalarda birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır. Bazı ilaç gruplarının etkinliği deneysel olarak gösterilse de bu ilaçların klinik kullanımı gerçekleştirilmemiştir. Metilprednizolon başta olmak üzere gangliozidler, opiyat reseptör antagonistleri ve nimodipin insanlarda faz 3 çalışmaları tamamlanmış ve onaylanmış, güncel kullanımı olan ilaçlardır [112].

2.10.2.1. METİLPREDNİZOLON (MPZ)

SKH sonrası travmanın ilk 8 saati içinde uygulanmasının 6 hafta, 6 ay veya 1 sene içinde faydalı (motor ve duyu fonksiyonlarında) etkilerini gösteren çalışmalar vardır [57,113]. Ulusal akut SKH çalışmaları (NASCIS I, II, III), hasar sonrası ilk 8 saat içerisinde uygulanan yüksek doz MPZ’nin nörolojik düzelmeye sağladığını desteklemektedir. Antiödem, antioksidan ve lizozomal membran stabilizatörü olarak görev yapan MPZ bu etkiyi membrandaki Na-K ATPaz enzimini koruyarak, lipid peroksidasyonuna (LPO) bağlı membran harabiyetini engelleyerek yapmaktadır [114,115,116]. MPZ tedavisi, belirgin yan etkileri nedeniyle uzmanlar arasında tartışmalı olmasına rağmen güncel ve etkili tek medikal tedavi yöntemidir [113].

Tedavi protokolü şu şekildedir; İlaç konsantrasyonu: Tüm solüsyonlar 62.5 mg/ml olacak şekilde karıştırılır. 17 bolus: 30 mg/kg başlangıçta 15 dakika içerisinde iv bolus şeklinde verilir. İdame:

45 dakika beklendikten sonra idame tedavisine geçilir. 5.4 mg/kg/saat'ten en fazla 48 saat sürekli infüzyon tedavisi uygulanır. Eğer cerrahi tedavi gerekiyorsa cerrahi sırasında da infüzyona devam edilir [113,117].

2.10.2.2. NALOKSAN

Opiat reseptör antagonisti ilaçtır, SKH'yi önlemede etkin olduğu NASCIS II çalışmasında gösterilmiştir. Opiat reseptör antagonistlerinin nörolojik travma üzerindeki olumlu etkilerini, spinal kord kan akımını arttırarak yaptıkları bilinmektedir [118]. Tedavi dozu olarak 5,4 mg/kg yükleme sonrasında 24 saat boyunca 4 mg/kg idame dozunda denenmiş ve başarılı sonuçlar vermiştir [52].

2.10.2.3. GANGLİOSİDLER

Glikosfingolipid yapısında ilaçtır. Deneysel çalışmalarda nöron gelişimi üzerine olumlu etkileri ve apoptozisi önleyici etkisi gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda 600 mg yükleme dozu sonrasında 56 gün boyunca 200 mg/gün idame dozu uygulandığında ilk 6 saat sonrasında belirgin nörolojik düzelme olduğu gösterilmiştir [119].

2.10.2.4. NİMODİPİN

Akut SKH sonrasında, hücre membranının hasara uğraması ile Ca kanalları depolarize olur ve kalsiyumun hücre içine akışı gerçekleşir. Ca doğrudan nörotoksik etkisi haricinde vasküler düz kas hücreleri üzerinde de kasılmaya yol açarak vazospazma neden olur. Bu şekilde Ca hem doğrudan hücreyi etkileyerek hücre apoptozuna yol açmakta, hem de kan akımını azaltıp enerji metabolizmasını etkileyerek diğer hücrelerde ikincil hasarlanmaya neden olmaktadır [120]. Merkezi sinir sistemine yüksek selektif olduğundan dolayı Ca kanal blokörleri arasında nimodipinle yapılan deneysel çalışmalarda, nöroprotektif etkiden çok posttravmatik kan akımını arttırdığı ve bu sayede spinal kord iskemiden koruduğu saptanmıştır. Nimodipinin spinal kord üzerindeki etkilerinin kısıtlı olması ve farklı görüşler olmasından dolayı klinik kullanımı yoktur [120].

2.11. ISOALANTOLACTONE (IAL)

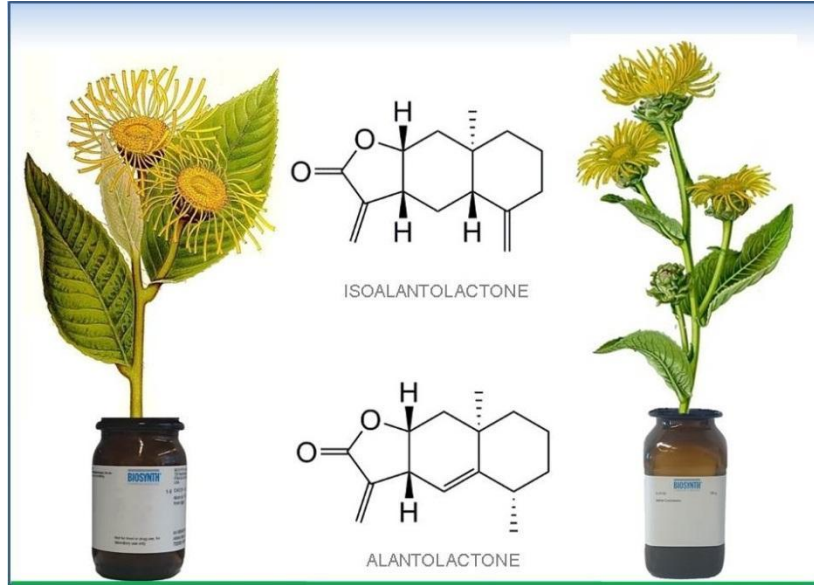
2.11.1 GENEL BİLGİ

Doğal bir ekstrat lakton olan Izoalantolakton (IAL), tıbbi bitki Asteraceae familyasının *Inula helenium* (elecampane) türü de dahil olmak üzere birçok bitki türünde bulunan fitokimyasal bir karışımdır. İki izomerik ekstrat lakton, alantolakton (ALT) ve İzoalantolakton (IAL) karışımıdır.

1895 yılında Alman bilim adamları Julius Brecht ve Wilhelm Posch *Inula helenium*'den çıkardı ve fiziksel ve kimyasal özelliklerini belirledi [121]. Çin Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi kayıtlarına göre ATL ve IAL'nin hızlı bir başlangıcı vardır ve normal hayvan doku ve organlarına önemli zarar vermez [122, 123]. ATL ve IAL'nin antitümör özellikleri, akciğer kanseri, karaciğer kanseri, kolon kanseri ve lösemi dahil periferik tümörlerde gösterilmiştir [124]. Bununla birlikte, bugüne kadar, ATL ve türlerinin etkilerini uyguladığı ayrıntılı anti-kanser ve anti-enflamatuar mekanizmalar karakterize edilmemiştir. Ayrıca, uçucu yağ bileşiklerinin küçük bir molekülü olan IAL, geleneksel Çin Tıbbı “yukarı doğru-beyne doğru” teorisi ile tutarlıdır ve KBB'ye nüfuz etme potansiyeline sahiptir.

2.11.2 DOĞAL KAYNAKLAR

Izoalantolaktone (IAL) ve (ATL), *Inula helenium* ve diğer *Inula* türlerinin köklerinde oluşur. Helenin, yaklaşık %40 alantolakton ve %60 izoalantolakton içeren bir karışım elde etmek için alkol veya diğer polar olmayan çözücüler kullanılarak *Inula helenium*'un köklerinden elde edilebilir [125] (Şekil 2.25).



Şekil 2.25. Inula helenium ve Isoalantolactone kimyasal yapısı

2.11.3 BİYOLOJİK AKTİVİTE

Izoalantolakton ve Alantolakton dahil olmak üzere çeşitli in vitro biyokimyasal özelliklere sahiptir.

Akciğer skuamöz kanser hücrelerinde apoptozis ve hücre siklusunun durmasına neden olur, IAL ve türleri insan skuamöz akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe ederek apoptoz ve G1/G0 hücre döngüsü durmasına sebep olmuştur. IAL ile indüklenen apoptoz aşağı regülasyon yoluyla Bcl-2'nin ve Bax'in regülasyonunun ardından aktivasyonu kaspaz-9, -8 -3 ve PARP. ALT ve IAL aracılı hücre döngüsü durması belirgin bir azalma ile ilişkiliydi. Siklin D1, siklin D3, CDK4'ün protein ekspresyonunda, ve CDK6. Bu nedenle, IAL ve türlerinin akciğer SCC için terapötik etkisi gösterilmiştir [10].

Kemokin üretimini ve STAT1 fosforilasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etkilere sahiptir, antiinflamatuvar S. lappa ve alantolactone türleri, STAT1'i inhibe ederek TNF- α ve IFN-gamma sekresyonu azalttığı için dermatit tedavisi için kullanılmıştır [126].

Antifungal, antimikrobiyal etkiye sahiptir, yeni sentez edilen lakton türleri analize edilmiştir. *Cunningham* mantarı ve *Cunninghamella echinulata*'ya karşı aktivitelerin değerlendirilmesinde. İn vitro mantar kültürlerde antifungal aktivitesi pozitif olduğu görülmüştür [127].

Yapılan araştırmalarda lakton türleri Gram pozitif bakteri karşısında MurA enzimini inhibe edip sitoplazmadaki peptidoglikan biosentezini durdurarak bakterinin çoğalmasını engellemiştir. Bu in vitro çalışmada, I. helenium'un önemli antistafilokokal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir [128].

Son yapılan çalışmada, NF-κB ve MAPK sinyal yollarının bastırılmasıyla Alantolakton ve Izoalantolaktonun anti-nöroinflamatuvar etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda ALT ve türlerinin aktif B hücrelerinin (NF-κB) ve mitojenle aktif olan protein kinazın (MAPK) sinyal yollarının nükleer faktör kappa hafif zincir geliştiricisini baskılayarak proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu düşürdüğünü gösterilmiştir. Orta serebral arter tıkanması ve reperfüzyon (MCAO / R) sıçan modeli kullanılarak yapılan ileri değerlendirme, ALT'nin serebral iskemi-reperfüzyon hasarını hafifletebileceği sonucunu desteklenmiştir. Nörolojik defisitleri, beyin enfarktüs hacmini, beyin ödemi, nöronların apoptozunu ve nekrozu azaltmıştır. ALT ve türleri, MSS hasarının iyileşmesine katkıda bulunan anti-nöroinflamatuvar özellikler göstermiş ve MSS yaralanmasında daha ileri uygulamalar için umut verici bir aday olarak düşünölmüştür [129].

2.12. DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ

SKH oluşturmak amacıyla birçok deneysel model geliştirilmiştir. Güncel kullanımı olan modeller yüksekten ağırlık düşürme ve klips ile spinal kord kompresyonudur [56,130].

İlk olarak Allen tarafından ortaya konan yöntemde; bilinen bir ağırlık, belirli bir yükseklikten laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kord üzerine düşürölür [130]. Genellikle hazırlanan bir düzenek yardımıyla açığa çıkarılan spinal kord üzerine 5 cm yüksekten 10 g ağırlık (50 g/cm) bir boru içerisinde vertikal olarak serbest düşüşe bırakılır ve travma modeli oluşturulur.

İkinci yöntemde, anevrizma klips kullanılarak spinal kord hasarı oluşturulur. 24 g gücünde Yaşargil anevrizma klipi, laminektomi sonrası spinal kordun ekstradural kompresyonu amacıyla 1 dakika kapalı tutulur ve travma oluşturulur [131].

Bu çalışmada spinal kord travması oluşturmak amacıyla ağırlık düşürme yöntemi kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARI VE BARINMA KOŞULLARI

Bu araştırma, Hacettepe Üniversitesi Nörolojik Bilimler ve Psikiyatri Enstitüsü Sınır Sistemi Araştırmaları Laboratuvarları'nda yürütülmüştür. Çalışmada, ağırlığı 250 – 350 gram arasında olan toplam 32 adet erişkin Wistar Albino erkek sıçan kullanılmıştır. Standart barınak koşullarında, polikarbon kafeslerde, 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık döngüsünde $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklık, % 30-55 nem oranı ve su ile yiyeceğe sınırsız erişim (ad libitum) sağlanmıştır. Sıçanlar üzerinde uygulanan tüm deney paradigmaları, ulusal ve uluslararası hayvan deneyleri mevzuatına ve kılavuzlarına uygun olup; **Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu** tarafından 30.04.2019 tarih ve **2019/04-01** karar numaralı izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.2. DENEY GRUPLARI VE PROTOKOL

Çalışmada toplam 32 adet sıçan kullanılmıştır. 4 ayrı grup ve her grupta 8 sıçan (n=8) olacak şekilde gruplandırılmıştır. Sıçanlara 10 cm yükseklikten 15 gr serbest ağırlık düşürülerek spinal kord travması modeli oluşturulmuştur. Travma sonrası 22. ve 23.saatte nörolojik muayene yapıldıktan sonra 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifiyon sırasında önce atriumdan serum örneği alınmış, sonra doku perfüzyonu yapılmıştır. Sıçanların gruplara göre dağılımı şu şekildedir:

- 1) **Grup 1: Sham grubu (Torakal insizyonu + Torakal laminektomi) (n=8):** Ketamin + Xylazine anestezisi altında, sıçanlarda sadece alt torakal orta hat insizyonu ve T10 - T11 laminektomi yapılarak, medulla spinalis ekspozé edilmiştir. Ardından paravertebral adaleler ve cilt insizyon sırayla 3.0 ipek ipele dikilmiştir. 23. saatte nörolojik muayene yapıldıktan sonra 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilmiştir.
- 2) **Grup 2: Spinal kord travması sonrası kontrol: (n=8):** Ketamin + Xylazine anestezisi altında, sıçanlarda alt torakal orta hat insizyonu ve T10-T11 torakal laminektomi yapılarak medulla spinalis ortaya konulmuştur. Sıçanlar ağırlık düşürme düzeneğine yerleştirilerek 10 cm yükseklikten 15 gr ağırlığında, çarpma alanı yaklaşık 10 mm^2 olan silindirik serbest ağırlık medulla spinalis üzerine düşürülmüştür.

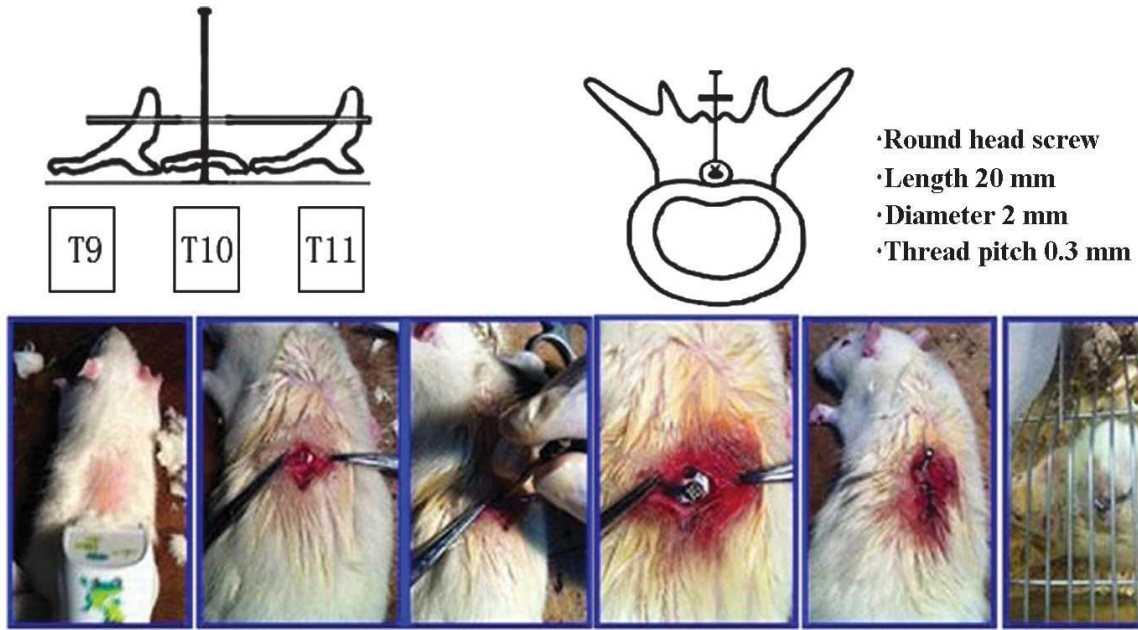
Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile paravertebral adaleler ve insizyon sırayla suture edilen sıçanlar kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra sıçanlara intraperitoneal (İP) serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmıştır. 23. saatte nörolojik muayene yapıldıktan sonra 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

3) Grup 3: Spinal kord travması sonrası intraperitoneal MPZ (60 mg/kg) (n=8):

Ketamin + Xylazine anestezisi altında, sıçanlarda alt torakal orta hat insizyonu ve T10-T11 torakal laminektomi yapılarak medulla spinalis ortaya konulmuştur. Sıçanlar ağırlık düşürme düzeneğine yerleştirilerek 10 cm yükseklikten 15 gr ağırlığında, çarpma alanı yaklaşık 10 mm² olan silindirik serbest ağırlık medulla spinalis üzerine düşürülmüştür. Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile paravertebral adaleler ve insizyon sırayla suture edilen sıçanlar kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra sıçanlara intraperitoneal (İP) MPZ (60 mg/kg) enjeksiyonu yapılmıştır. 23. saatte nörolojik muayene yapıldıktan sonra 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilmiştir.

4) Grup 4: Spinal kord travması sonrası intraperitoneal ALO (20 mg/kg) (n=8):

Ketamin + Xylazine anestezisi altında, sıçanlarda alt torakal orta hat insizyonu ve T10-T11 torakal laminektomi yapılarak medulla spinalis ortaya konulmuştur. Sıçanlar ağırlık düşürme düzeneğine yerleştirilerek 10 cm yükseklikten 15 gr ağırlığında, çarpma alanı yaklaşık 10 mm² olan silindirik serbest ağırlık medulla spinalis üzerine düşürülmüştür. Sedasyon altında 4.0 ipek dikiş ile paravertebral adaleler ve insizyon sırayla suture edilen sıçanlar kafeslerine alınmıştır. Travmadan 30 dakika sonra sıçanlara intraperitoneal (İP) ALO (20 mg/kg) enjeksiyonu yapılmıştır. 23. saatte nörolojik muayene yapıldıktan sonra 24. saatte sıçanlar sakrifiye edilmiştir.



Şekil 3.1. Sıçan torakal spinal travma modeli gösteren şematik resimler

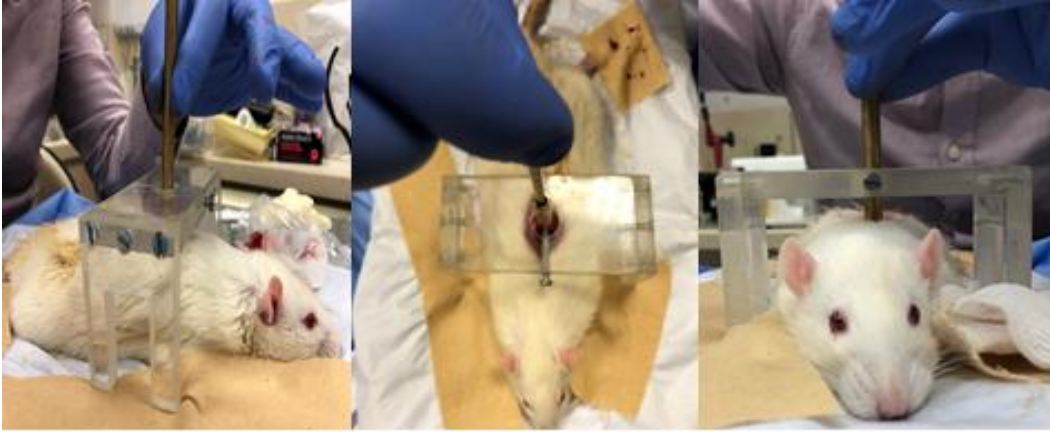
3.3. ANESTEZİ VE YAŞAMSAL BULGULARIN TAKİBİ

Deney başlangıcında ağırlık ölçümünü takiben, genel anestezi induksiyonu intraperitoneal (İP) Ketamin (90mg/kg) + Xylazine (10 mg/kg) ile gerçekleştirilmiş, anestezi derinliği parmak kıstırma yöntemi ile kontrol edilmiştir. Sıçanlar anestezi altında ağırlığın düşürüleceği düzeneğe yerleştirilmiştir. Tüm işlemler süresince genel anestezi sağlanmıştır. Deney esnasında sürekli olarak kalp atım sayısı ve kan oksijen saturasyonu pulse oksimetre ile (V3304 Digital Table-Top Pulse Oximeter, SurgiVet, ABD) monitörize edilmiştir. Tüm işlemler boyunca ortalama 3 L/dk oksijen desteği sağlanmış ve sıçanlar kendiliğinden solunum devam eder vaziyette takip edilmiş, bu süre içinde homeotermik battaniye yardımı ile (Harvard Apparatus Limited, İngiltere) vücut sıcaklığı $37.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 'de tutulmuştur.

3.4. SPİNAL KORD TRAVMASININ OLUŞTURULMASI

Ketamin + Xylazine anestezisi altında sıçan torakal bölgenin cildi orta hat insizyonu ile açılarak paravertebral adaleler disseke ederek T10-T11 laminalar görünecek şekilde ortaya konmuştur. T10-T11 laminektomi yapıldıktan ve medula spinalis ekspozisyonu sağlandıktan sonra hayvanlar travma düzeneğine alınmıştır. (Şekil 3.2.) de görülen ağırlık düşürme

düzenine altına sıçan, medula spinalisi tam olarak silindirik ağırlığın teması yüzeyine denk gelecek şekilde yerleştirilmiş, sedasyon ve O₂ desteği altında silindir biçimindeki 15 gram'lık çelik ağırlık 10 cm yükseklikten düşürülmüştür. Travmanın hemen sonrasında ağırlık kaldırılmış, adaleler ve cilt insizyonu 3.0 ipek ipele dikilmiş, sıçanın ayılması beklenmiştir. Ayılma esnasında O₂ desteğine devam edilmiştir.



Şekil 3.2. Ağırlık düşürme düzeneği ile spinal kord travmasının oluşturulması. Silindirik tüp 10 cm uzunluğunda 15 gram ağırlığında metal ağırlık uygun yükseklikten bırakılmaktadır.

3.5 İNTRAPERİTONEAL MPZ , ALO HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

0,02 gr/2 ml' lik flakon şeklinde bulunan Metilprednizolon, 10 mcg/2ml'lik ampulde bulunan Izoalantolakton, % 0,09' luk sodyum klorür ile seyreltilerek travma grup 3'e ve travma grup 4'e işlem sonrası 30. dakikada intraperitoneal olarak uygulanmıştır.

3.6. NÖROLOJİK DEĞERLENDİRME

3.6.1. EĞİK DÜZLEM (İNCLINED PLANE) TESTİ: Sıçanların fonksiyonel iyileşmeleri, Rivliv ve Tator tarafından tanımlanan ve deneysel akut omurilik yaralanmalarında sıkça kullanılan eğimli alan (eğik düzlem) yöntemi ile değerlendirildi [132]. Sıçan, düzgün zemin üzerinde yere paralel olarak yerleştirilmiş bir tabla üzerine kondu. Daha sonra tabla sabit olmayan kaldıraç tarafından kaldırılarak eğimi arttırıldı. Hayvanın, tabla üzerinde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı, eğik düzlem açısı olarak kabul edildi. Test esnasında sıçanlara besin motivasyonu yapılabilir. Bu çalışmamızda bütün gruptaki sıçanlara cerrahi öncesi ve sonrası 23. Saatte eğik düzlem (inclined plane) testi uygulandı (Şekil 3.3).

3.6.2. KLİNİK MOTOR MUAYENE :-

Çalışmamızda sıçanların fonksiyonel iyileşmelerini değerlendirmek için düzenli olarak motor muayeneleri yapıldı. Sıçanların motor fonksiyonları cerrahi işlem öncesi ve sonrası 23. saatte Drummond ve Moore kriterleri ile değerlendirildi [133].

Drummond ve Moore Kriterleri

- 0: Paraplejik, alt ekstremitelerde motor fonksiyon yok.
- 1: Alt ekstremitede motor fonksiyon zayıf, sadece yer çekimine karşı zayıf hareket.
- 2: Orta derecede alt ekstremitde motor fonksiyonu, yerçekimine karşı güç iyi fakat bacaklarını vücudun altına çekemiyor.
- 3: Motor fonksiyon çok iyi, bacaklarını vücudun altına çekip zıplayabiliyor, fakat tam normal motor fonksiyon değil.
- 4: Normal motor fonksiyon.



Şekil 3.3. Eğik düzlem (İnclined plane) testi

3.7. SAKRİFİKASYON, SPİNAL KORDLARIN ÇIKARILMASI VE FİKSASYON

Sıçanlar 24 saat izlem sonrası immunhistokimyasal ve histopatolojik çalışma için örneklerin alınması amacı ile sakrifiye edildi. Bunun için yüksek doz kloralhidrat anestezisi altındaki sıçanlara torakotomi yapılarak kalp ortaya konuldu. Önce sağ ventrikülden serum örneği alındıktan sonra sol ventrikülden hayvanın karaciğeri beyazlaşınca kadar heparinli solüsyon verildi, sonrasında ise hayvanın vücudu sertleşinceye kadar sabit hızda %4 paraformaldehit (0,1 mol/L sodyum fosfat tamponu içinde, pH: 7,4) ile damarlar perfüze edilerek doku fiksasyonu yapıldı. Ardından sıçanlar dekapite edilerek omurgaları çıkarıldı ve spinal kordu izole edildi, %4'lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde fikse edildi. Fikse edilmiş spinal kordlar +4°C'de muhafaza edildi. Alınan serum örnekleri hemen EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit)'lı tüplere alındı. Oda ısısında 1 saat bekletildikten sonra santrifüj edilerek plazma örnekleri alındı ve – 80 derecede saklandı.



Şekil 3.4. Sakrifiye etmek ve spinal kordu çıkarılması

3.8. KESİTLERİN ALINMASI, İMMUNHİSTOKİMYA VE HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Sıçan spinal kordlarının tümü sakrifikasyon sonrası alındı. Dokular %10 tamponlu formaldehit içinde 48 saat tespit edildi. Doku örnekleri takip cihazına alındı. Takip cihazında dehidratasyonu sağlamak için sırayla %70, %80, %90 ve %100'lük alkollerden geçirildi. Şeffaflaştırma için doku örnekleri birer saatten 2 kere ksilolden geçirildikten sonra parafine alıştırma için 2,5 saat saf parafinde bekletildi. Doku takip cihazından alınan örnekler Leica Eg1150H parafin istasyonunda saf parafine gömülerek parafin bloklar elde edildi. Elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitler 30 dakika 70 C etüvde bırakıldıktan sonra 2 saat ksilende tutularak deparafinize edildi. Örnekler dereceli alkol serilerinden (%100, %95, %75 ve %50) geçirilerek rehidrate edildi. Doku kesitlerinin bir kısmı Hematoksilen & eozin (H-E) ve NeuN (noronal nukleer antijen) ile boyandıktan sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

İmmunhistokimyasal boyama için hazırlandı. IL-6, Iba-1, CD3, F4/80 ve NF- κ B P65 için 10 mM pH 6 sodyum sitrat tampon 80°C su banyosuna konulup ısıtıldıktan sonra ısıtılmış tamponun içine deparafinize lamlar yerleştirilerek ısıya maruz bırakıldı. Böylece ısı aracılığıyla antijenler açığa çıkarıldı (antigen retrieval). Lamlar oda sıcaklığında 25-30 dakika bekletildi. NLRP3

boyaması için ise doku kesitleri 1:20 oranında distile su ile dilüe edilmiş proteinaz K ile oda sıcaklığında 15 dakika tutuldu. Tüm örnekler distile su ile yıkanıp 1 saat bloklama solüsyonu ile inkübe edildi.

IL-6, Iba-1, F4/80, CD3 ve NF- κ B P65 için fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) içinde %1'lik sığır serum albümini (BSA) ve %10'luk normal goat serum (NGS) ile, NLRP3 için ise %1'lik BSA, %0.02'lik Triton X, %0.05'lik sodyum asit, %0.4'luk EDTA ve %10'luk normal donkey serum (NDS) karıştırılarak bloklama solüsyonu hazırlandı. Sonrasında kesitler bir gece +4°C'de, NLRP3 ise oda sıcaklığında primer antikor ile inkübe edilip yıkandı. NLRP3 dışındaki kesitler 1 saat oda sıcaklığında 1:200 oranında sekonder antikor (Cy3 goat anti rabbit) ile, NLRP3 ise 2 saat sekonder antikor (donkey anti goat) ile oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak lamalar yıkandıktan sonra DNA'yı boyayan dolayısıyla hücre çekirdekleri görünür hale getiren, bir mavi floresan boyası olan Hoechst 33342 damlatılarak lameller kapatıldı.

Kesitler Leica DM 6000B mikroskobu ile 20X ve 40X büyütmede incelendi ve hasarın net görüldüğü travma ve travmanın distal bölge bileşkesinden DC 500 model Leica dijital kamera ile fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı. Sağ ve sol spinal kordun alınan kesitler için ilgilenilen belirteç ile pozitif boyanan hücreler, toplam hücre sayısına oranlandı.

3.9 . SERUM VE DOKU IL-6, TNF-A DÜZEYLERİNİN ELİSA İLE BELİRLENMESİ

Kardiyak perfüzyon sonrası EDTA'lı tüpe alınan serum örnekleri, 2 ml protein LoBind tüpe (Eppendorf) konulduktan sonra, (15 dk, 1200 rpm) santrifüj edildi ve -80 C° de muhafaza edildi.

ELİSA öncesi örnekler 1200g de 15 dk + 4 santigrad derecede santrifüj edildi. Ardından süpernatantlardan 100'er ml ayrıldı. RIPA tamponlu (Radioimmunoprecipitation assay buffer) ve RIPA'sız olacak şekilde örnekler ayrıldı. RIPA'sız örnekler için 25 μ l serum 75 μ l dilüsyon tampon ile 3 kat dilüe edildi. RIPA lizis tamponu uygulanacak örnekler için 75 mcl serum örneğine 8 mcl RIPA eklenerek 150 ml dilüsyon tampon ile 3 kat dilüe edilerek hazırlandı.

TNF- α ve IL-6 rat ELISA kitinde bulunan solüsyonlar kullanım öncesi oda sıcaklığına alındı. Örnekler iki tekrar şeklinde kuyulara yüklendi. Serum örnekleri çözündükten sonra 1200 rpm' de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar kuyulara yüklenmek üzere Eppendorf tüplerine alındı.

Standart 1 ml örnek dilüsyon tampon ile sulandırıldı. Stok standart çözeltisinin son konsantrasyonu 200 – 100 – 50 – 25 - 12.5 - 6.25 - 3.12 pg/ ml olacak şekilde standartlar seri olarak dilüe edildi ve kuyulara 100'er µl olacak şekilde yüklendi. Serum örnekleri de kuyulara 100'er µl olarak yüklenip plate 37 C° de 2 saat inkübe edildi. Kuyulardaki sıvılar çekildikten sonra her kuyuya 100' er µl Biotin-antikor solüsyonu konuldu ve 1 saat 37 C° de inkübe edildi. Kuyulardaki solüsyon aspire edildikten sonra 3 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra kuyulara 100'er µl HRP-avidin solüsyonu eklenip, 1 saat 37 C° de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvı aspire edilerek 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı. Ardından her kuyuya 90' ar µl TMB substratı konulup, yaklaşık 30 dk 37 C° de inkübe edildi. Bu basamak karanlık ortamda gerçekleştirildi.

Kuyularda renk değişimi olduktan sonra 50' şer µl stop solüsyonu eklenip, 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Elde edilen standart eğri grafiğine göre örneklerdeki TNF-α ve IL-6 konsantrasyonları belirlendi. (Şekil 3.5.).



Şekil 3.5. ELISA yöntemi

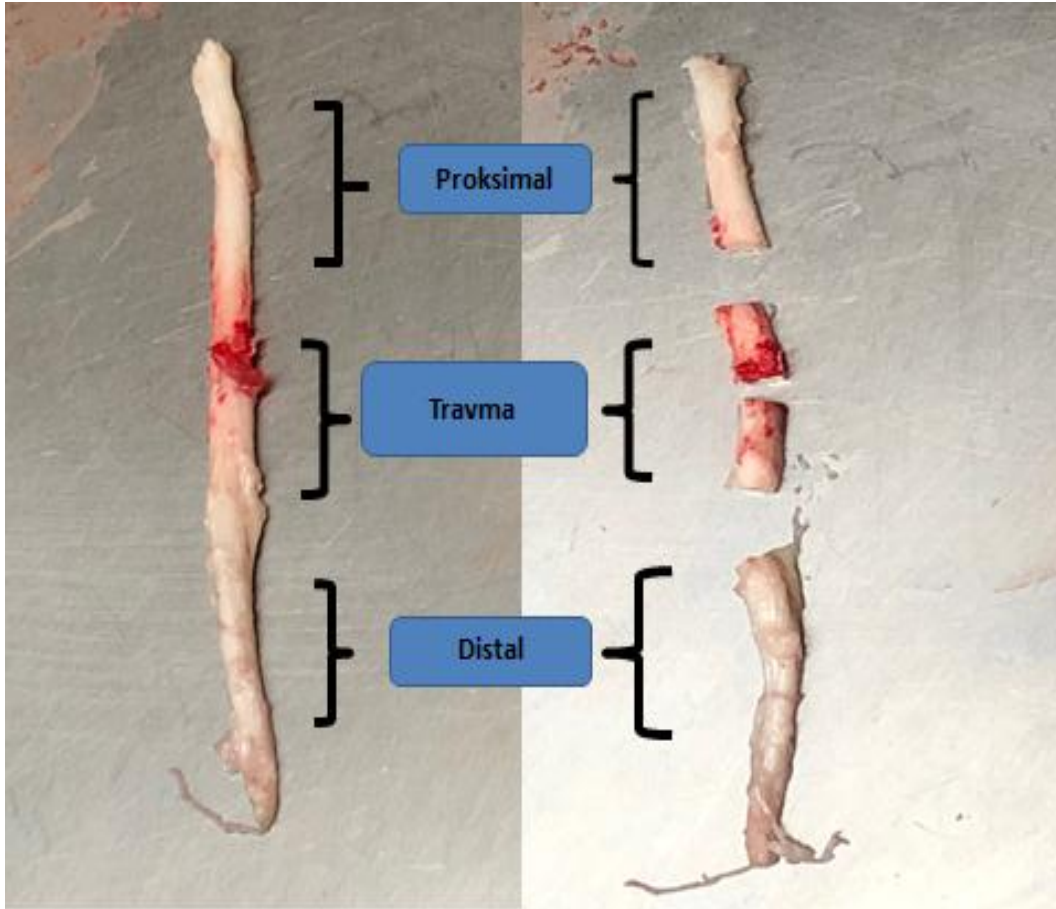
3.10. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesi için GraphPad Prism 7 for Mac programı kullanıldı. İki'den fazla sayıda bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında tek yonlu varyans analizi, iki bağımsız grubun ortalamalarının karşılaştırılmasında ise Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. TRAVMA ŞİDDETİNİN ETKİSİ

Sıçanlara orta şiddette spinal kord travması oluşturulmuştur. Travma gruplarında travma bölgesinde minimal kanama, kontüzyon görünümü oluşturulmuştur. Travma gruplarının sakrifikasyon öncesi muayenelerinde paraparezi görülmüştür. Spinal kord travma modelinde mortalite hiç izlenmemiştir.



Şekil 4.1. Travma gruplarının sakrifikasyon sonrası makroskopik görünüşleri: Orta şiddetli spinal kord travmaya bağlı bulgular: Travma bölgesinde minimal kanama ve kontüzyon görülmektedir. Travmanın proksimalinde ve distalinde spinal kord sağlam görülmektedir

4.2. SIÇANLARDA NÖROLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1 EĞİK DÜZLEM (INCLINED PLANE) TESTİ:

Eğik düzlem testi	Mean	95% CI of diff,	Anlamlı	P değeri
SHAM vs. TRAVMA	60	45,62±53,13	Evet	< 0,0001
SHAM vs. MPZ	60	22,08±36,67	Evet	< 0,0001
SHAM vs. IAL	60	20,62±36,88	Evet	< 0,0001
TRAVMA vs. MPZ	10,63	-27,66±12,34	Evet	0,0002
TRAVMA vs. IAL	10,63	-28,56±12,69	Evet	0,0003
MPZ vs. IAL	30,63	-15,11±13,86	Hayır	0,9989

Tablo 4.1. Deney gruplardaki Inclined Plane (Eğik-Düzlem) derecelerinin değerlendirilmesi

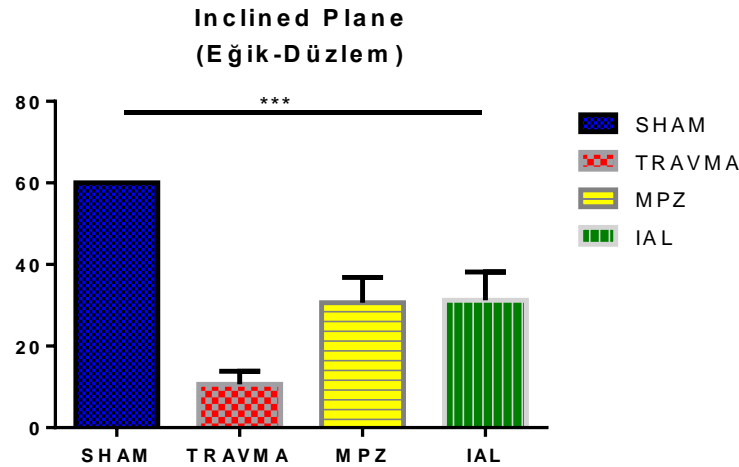
Siçanlara eğik düzlem testi travma öncesi ve travmadan sonraki 23. saatte yapılmıştır. Bütün grupların travma öncesi ve sham grubunda herhangi bir parazesi gelişmediği için eğik düzlem derecesi 60 derece olarak ölçülmüştür.

Travmanın 23. Saatinde hesaplanan eğik düzlem derecelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.1).

Sham grubu diğer gruplarla istatistiksel olarak çok anlamlı fark göstermiştir (Tablo 4.1.) ($p < 0,0001$).

MPZ ve IAL alan travma gruplarında, travma grubuna göre nörolojik düzeyinde artış farkedilmiştir. Bu iki grup, travma + MPZ ($p=0,002$), travma + IAL ($p=0,003$), travma grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı istatistiksel fark görülmüştür. (Tablo 4.1).

Travma + MPZ, Travma + IAL gruplarında nörolojik düzleme olmasına rağmen, iki grup arasında ise fark izlenmemiştir ($p=0.9$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Deney gruplarına göre Eğik düzlem (dereceleri) karşılaştırılması

4.2.2. DENEY GRUPLARINDA MOTOR FONKSİYON SKORLARI DEĞERLENDİRİLMESİ (DRUMMOND VE MOORE KRİTERLERİ)

Motor Fonksiyonu	Mean	95% CI of diff,	Anlamlı	Özet	P değeri
SHAM vs. TRAVMA	2,5	1,902±3,098	Evet	****	< 0,0001
SHAM vs. MPZ	1,625	1,027±2,223	Evet	****	< 0,0001
SHAM vs. IAL	1,25	0,6519±1,848	Evet	****	< 0,0001
TRAVMA vs. MPZ	-0,875	-1,473±-0,2769	Evet	**	0,0023
TRAVMA vs. IAL	-1,25	-1,848±-0,6519	Evet	****	< 0,0001
MPZ vs. IAL	-0,375	-0,9731±0,2231	Hayır	Ns	0,3367

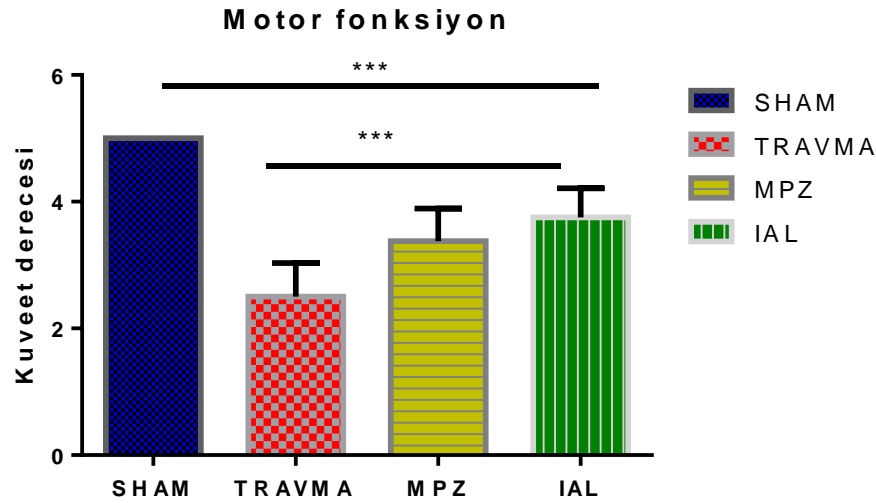
Tablo 4.2. Deney gruplarında Motor fonksiyon skorları değerlendirilmesi

Bütün sıçanlar, travma öncesi yapılan muayenelerde, motor kayıp olmadığı için 5 skoru almıştır. Sham grubunda spinal kord hasarı olmadığı için bu gruptaki sıçanların motor kuvveti sağlam kalmıştır ve 5 skoru verilmiştir. Travmanın 23. saatinde yapılan nörolojik ve motor fonksiyon değerlendirme sonucuna göre, sham grubunda nörolojik defisit olmayıp, diğer gruplarda defisit olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak Sham grubu ile diğer gruplar arasında ileri düzeyde anlamlı fark izlenmiştir. ($p < 0,0001$) (Tablo 4.2).

Travma grubunun, travma + MPZ ve Travma + IAL gruplarına göre nörolojik olarak daha geri olduğu görülmüştür. Travma ile travma + MPZ grupları arasında istatistiksel olarak belirgin bir

fark saptanmasına rağmen ($p=0.002$), travma ile travma + IAL grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel farkı daha anlamlı görülmüştür ($p<0,0001$).

Travma + MPZ, Travma + IAL gruplarının nörolojik olarak diğer gruplara göre daha iyi olduğu izlenmiştir, ama iki grup arasında anlamlı fark saptanmamıştır. ($p=0.3$). (Şekil 4.3)



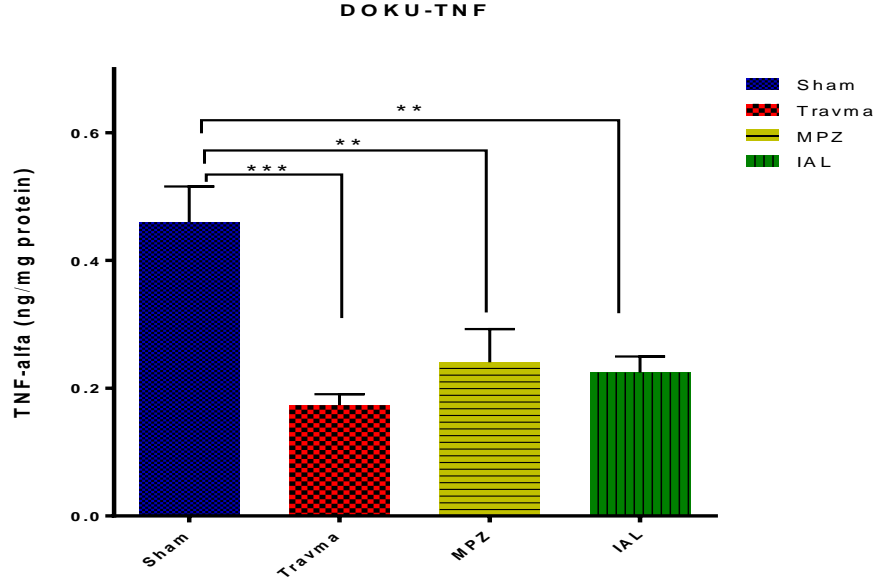
Şekil 4.3. Deney gruplarına göre Motor fonksiyon skoru karşılaştırılması

4.3. ELİSA İLE DOKU IL-6, TNFA DÜZEYLERİNİN İNCELENMESİ

Travma grubunda sham grubuna göre doku TNF- α konsantrasyonunun daha düşük olduğu görülmüştür. İstatistiksel olarak anlamlı saptanmıştır (0,1280 to 0,4453) ($p=0,002$).

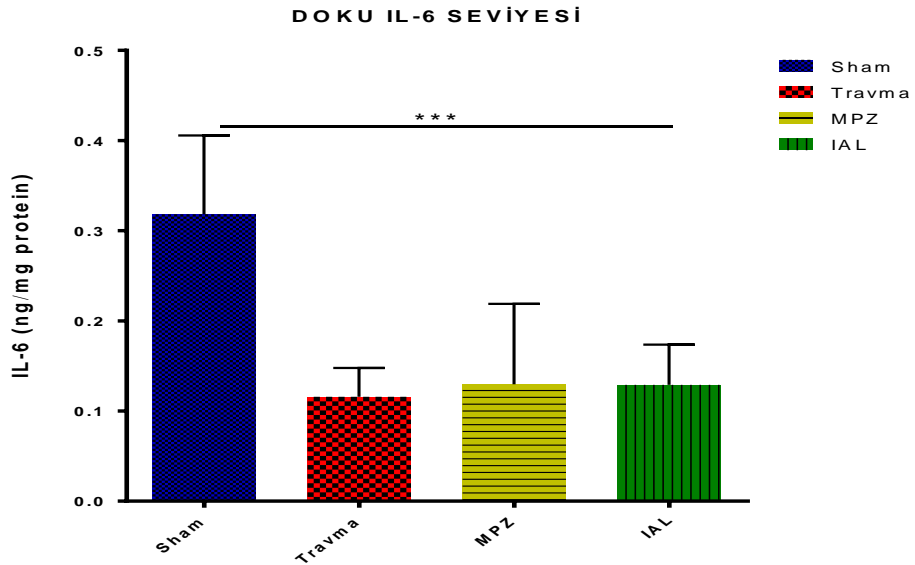
Sham grubunda, travma + MPZ (0,06074 to 0,3780) ve travma + IAL (0,07686 to 0,3941) gruplarına göre serum TNF- α konsantrasyonunun da artmış olduğu görülmüş, istatistiksel olarak anlamlı görülmüştür ($p=0,002$).

Travma grubu, travma + MPZ (0,2259 to 0,09139), travma + IAL (0,2098 to 0,1075) grupların arasında doku TNF- α ve doku IL-6 seviyelerinde anlamlı düşüş görülmemiştir ve anlamlı bulunmamıştır. (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Deney gruplarının ELİSA yöntem ile doku TNF- α konsantrasyonu gruplar arası karşılaştırılması.

Sham grubuna göre, travma (0,1093 to 0,2955) , travma + MPZ (0,1069 to 0,07936) , travma + IAL (0,1062 to 0,07998) gruplarında doku IL-6 azalmış görülmüştür , istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,002$) (Şekil 4.5).

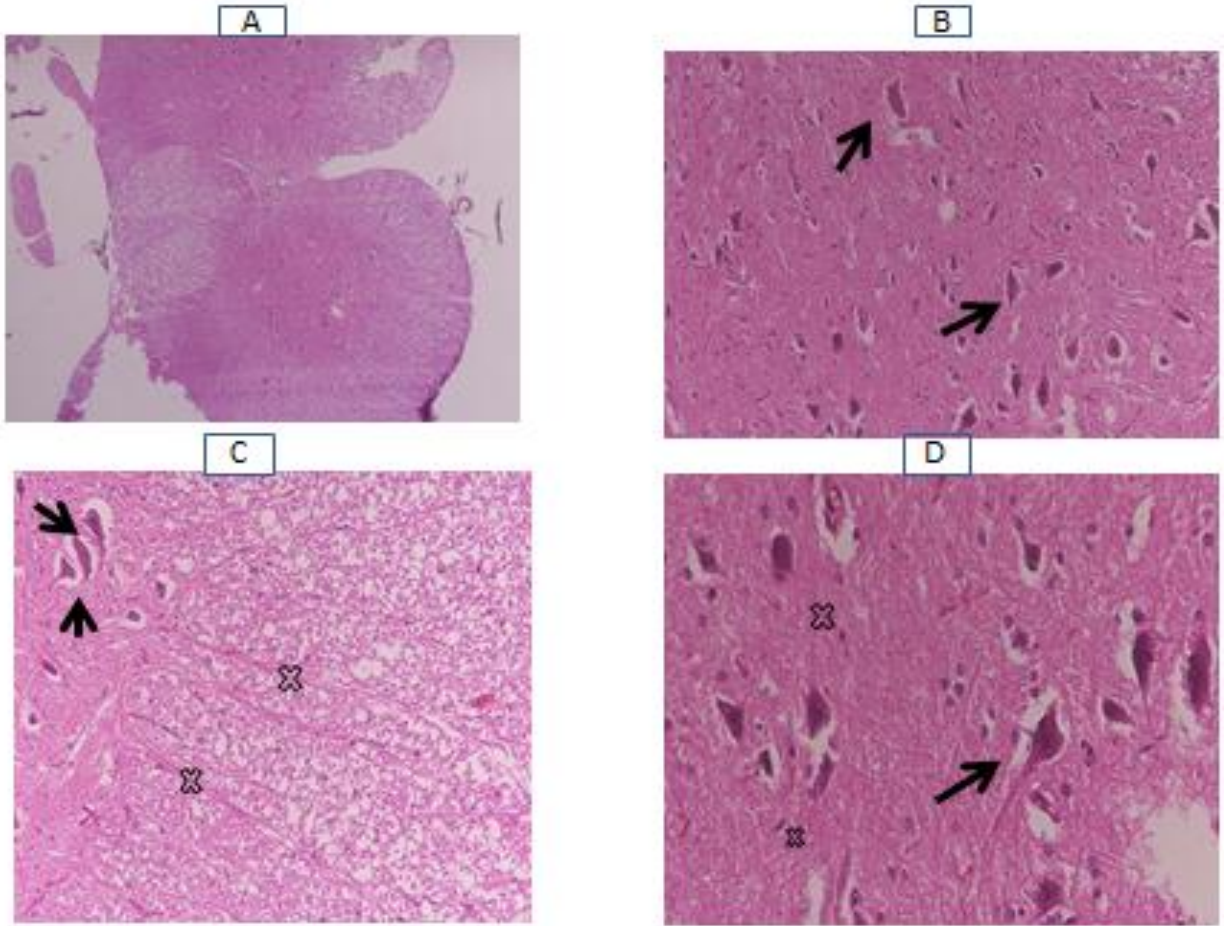


Şekil 4.5. Deney gruplarının ELİSA yöntem ile doku IL-6 konsantrasyonu gruplar arası karşılaştırılması

4.4. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Sham grubu:

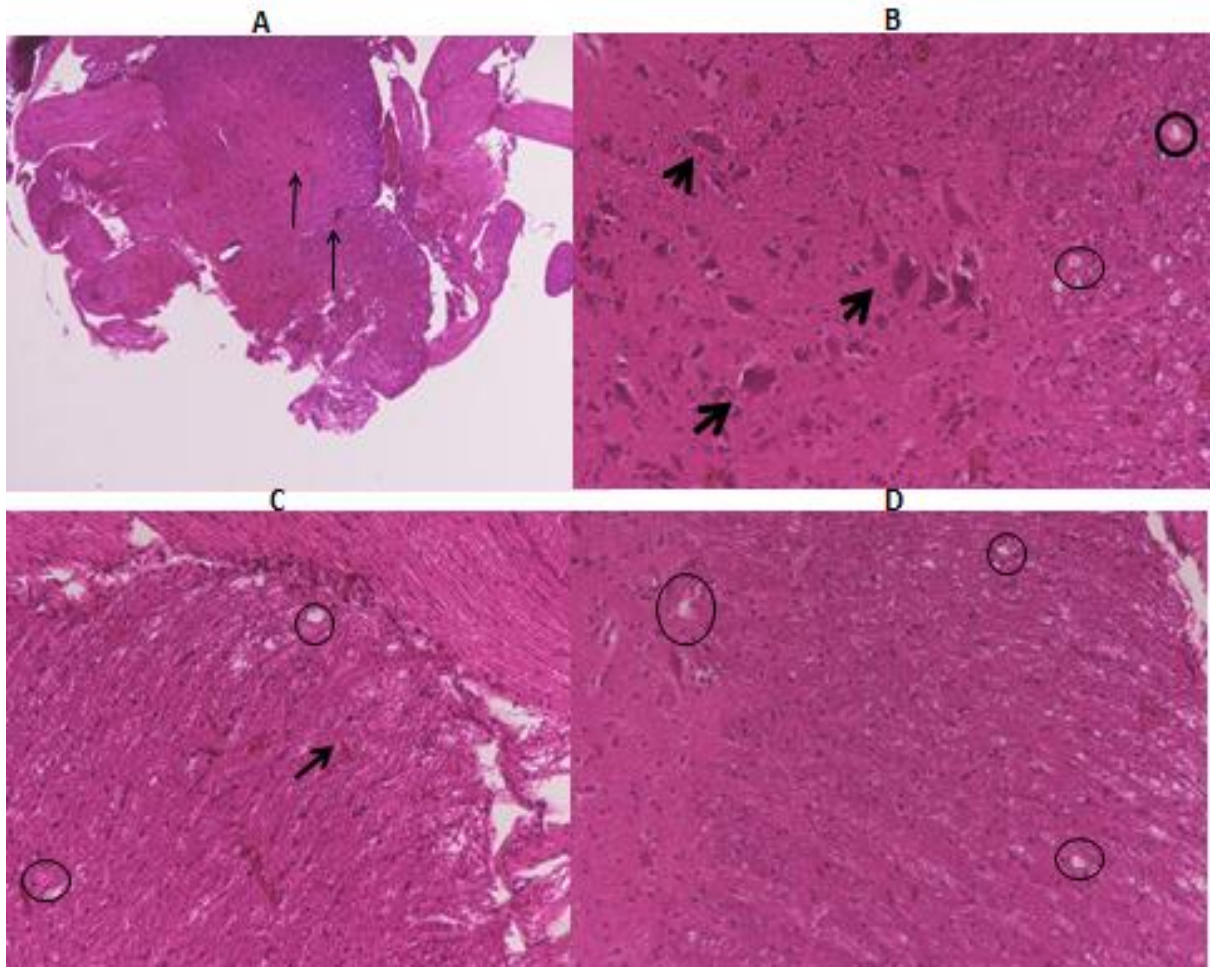
Sham grubunda ışık mikroskopik incelemede farklı büyütmelelerde spinal kordun beyaz cevher yapısı ve bu yapıda yer alan aksonlar ve miyelin kılıfları ile gri cevherde ön boynuzda bulunan multipolar motor nöronlar (ok) ökromatik çekirdek yapısı, belirgin çekirdekçik yapısı ve hücre gövdeleriyle birlikte normal yapıda gözlenmektedir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Sham grubu Hematoksilen-eozin boyaması. Sham grubunda longitudinal kesiti hem beyaz hem de gri cevher sağlam ve temiz görülmekte, ek olarak görülen spinal kordda akson yapısı (x) ve etrafını saran miyelin kılıflar normale yakın histolojik yapıda gözlenmektedir. (4X büyütme, A), (20X büyütme, B, C) (40X büyütme, D).

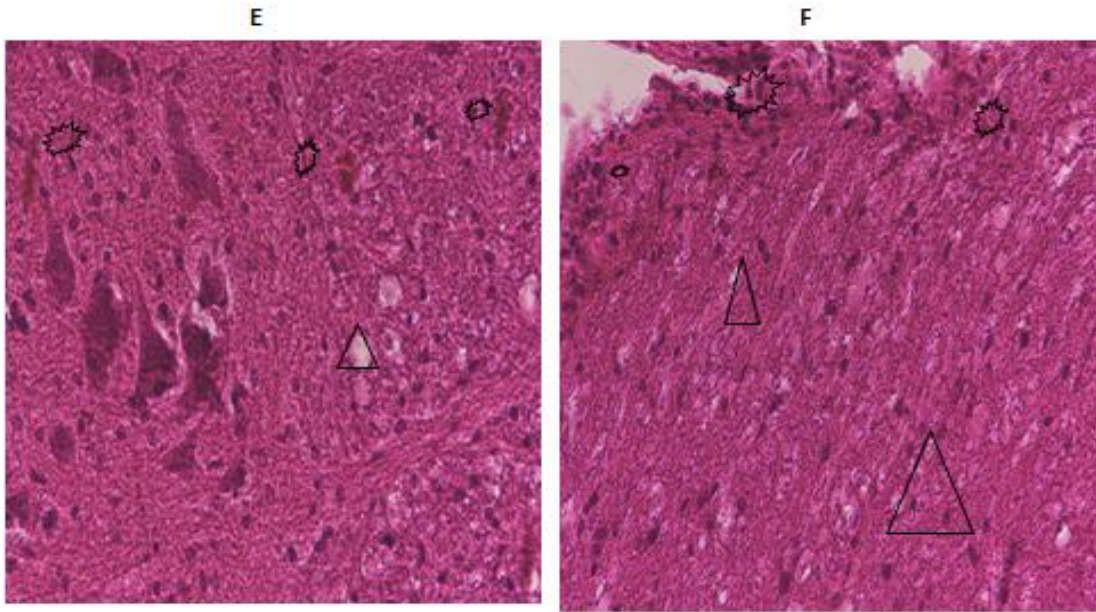
Travma Grubu

Travma uygulanan ikinci grupta, ışık mikroskopik incelemede farklı büyütmelerde spinal kordun gri cevherinde ön boynuzdaki motor nöronlarda genelde iskemik hücre yapısı koyu bazofilik hücreler (→) görülmekte. Ayrıca beyaz cevherdeki miyelinlerde yoğun dejeneratif değişiklikler ve şişmeler (O) ile hemorajik alanlar dikkat çekmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Travma grubu Hematoksilen–eozin boyaması; Koyu renkli iskemik hücre yapısı (Ok) ile görülmekte. Yoğun dejeneratif değişiklikler ve şişmeler (O). (4X büyütmeye, A), (20X büyütmeye, B) (10X büyütmeye, C, D).

Travma grubunda spinal kordun boyuna kesitlerinde 2 farklı görüntüde de beyaz cevherdeki aksonlar ve aksonu saran miyelin kılıflarında yoğun dejenerasyon ve şişmeler (yıldız) ile aksonlarda yer yer kopmalar (üçgen) gözlenmektedir.(Şekil 4.8)

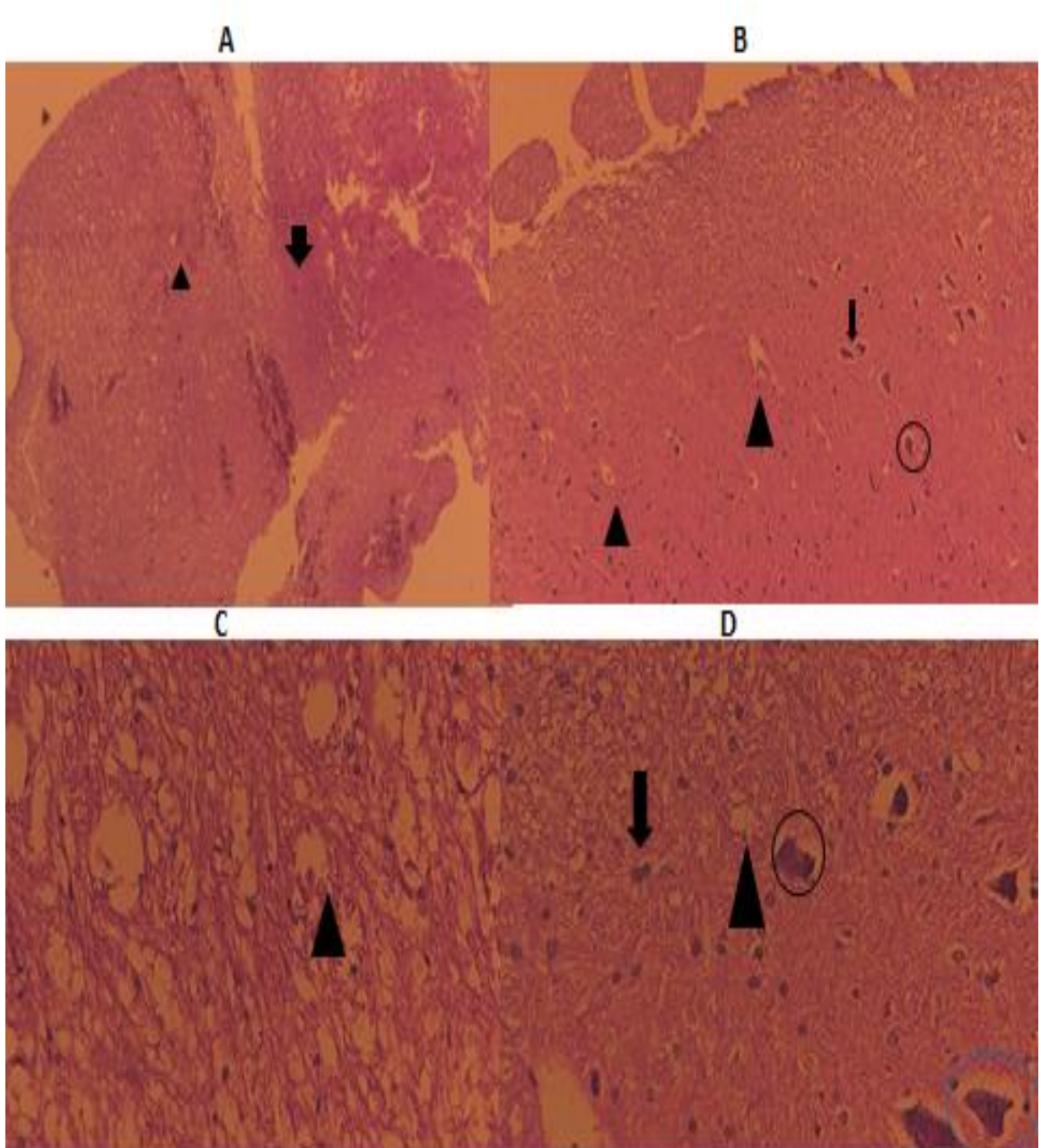


Şekil 4.8. Travma grubu Hematoksilen–eozin boyaması, Hemorejik alanlar ve aksonlarda kopmalar (40X büyütme, E,F).

Travma + MPZ

Metilprednizolon uygulanan grubun (Grup3) ışık mikroskopik incelemesinde farklı büyütmelemede medulla spinalisin beyaz cevherdeki aksonlar ve aksonları saran miyelin kılıfları (►) ile, gri cevherinde ön boynuzdaki motor nöronlarda ökromatik nükleus, belirgin nükleolus ve

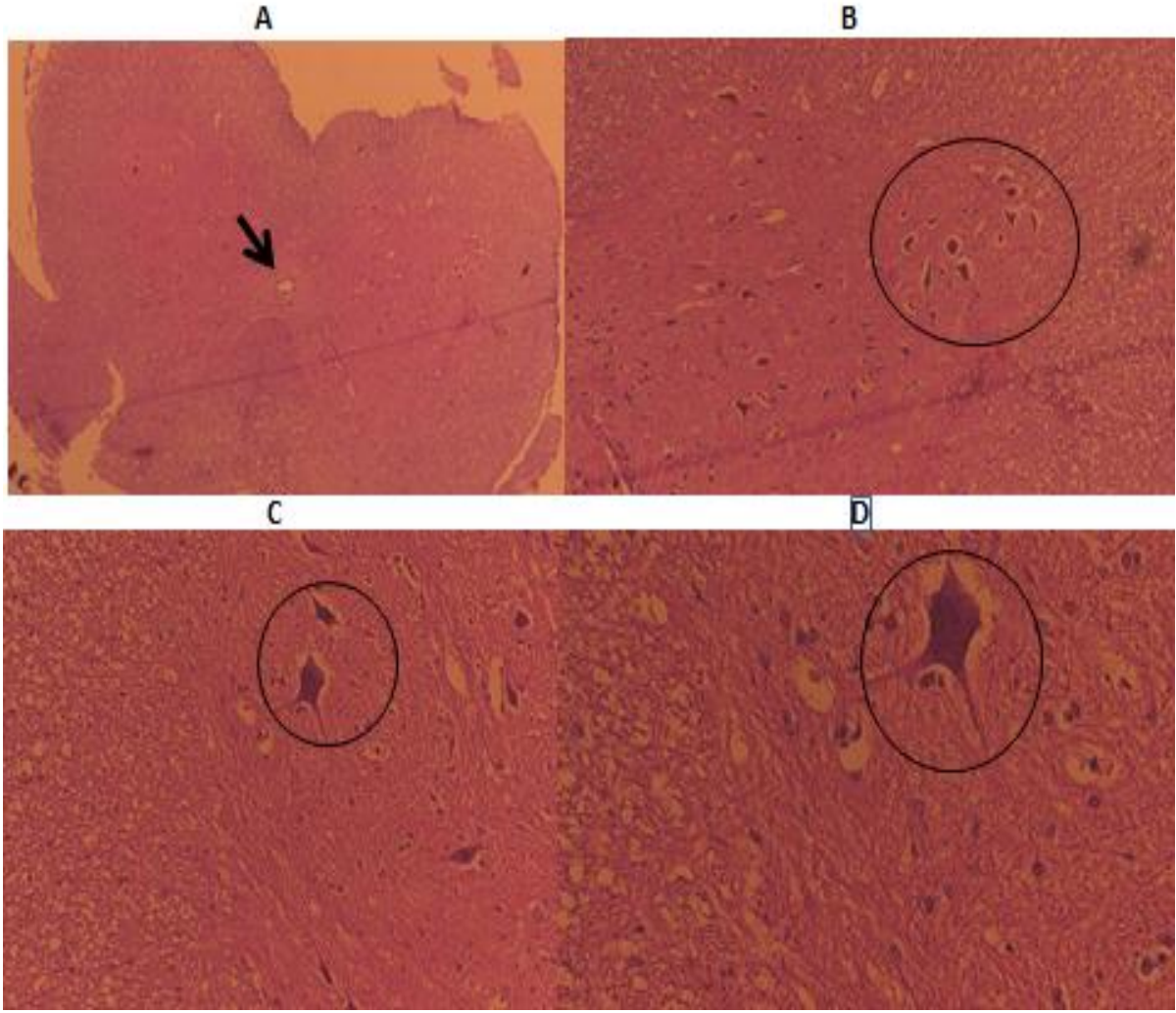
perikaryonda ergostoplazmik retikulumdan kaynaklanan tigroid alanlarıyla normale yakın yapı görülmekte (kalın ok) ancak bir, iki hücrede iskemik hücre yapısı koyu bazofilik hücre ve çekirdek ve çekirdekçığın seçilemediği dikkat çekmekte (O). (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Travma + MPZ grubu Hematoksilen–eozin boyaması: motor nöronlar, ökromatik nükleus, belirgin nükleolus ve perikaryonda ergostoplazmik retikulumdan kaynaklanan bazofilik hücre ve çekirdek ve çekirdekçiğin seçilemediği hücreler. (4X büyütme, A), (20X büyütme, B) (40X büyütme,C,D).

Travma + IAL

Izoalantolakton uygulanan grupta (Grup 4) spinal kordun ışık mikroskopik olarak yapılan incelemelerinde azalmış hasar dikkat çekmekte. Gri cevher, beyaz cevher, kanalis sentralis yapısı (→) ve kanalis sentralisi döşeyen ependim hücreleri ile gri cevherde ön boynuzdaki multipolar motor nöron hücreleri (0) normale yakın histolojik yapıda görülmektedir (Şekil 4.10).

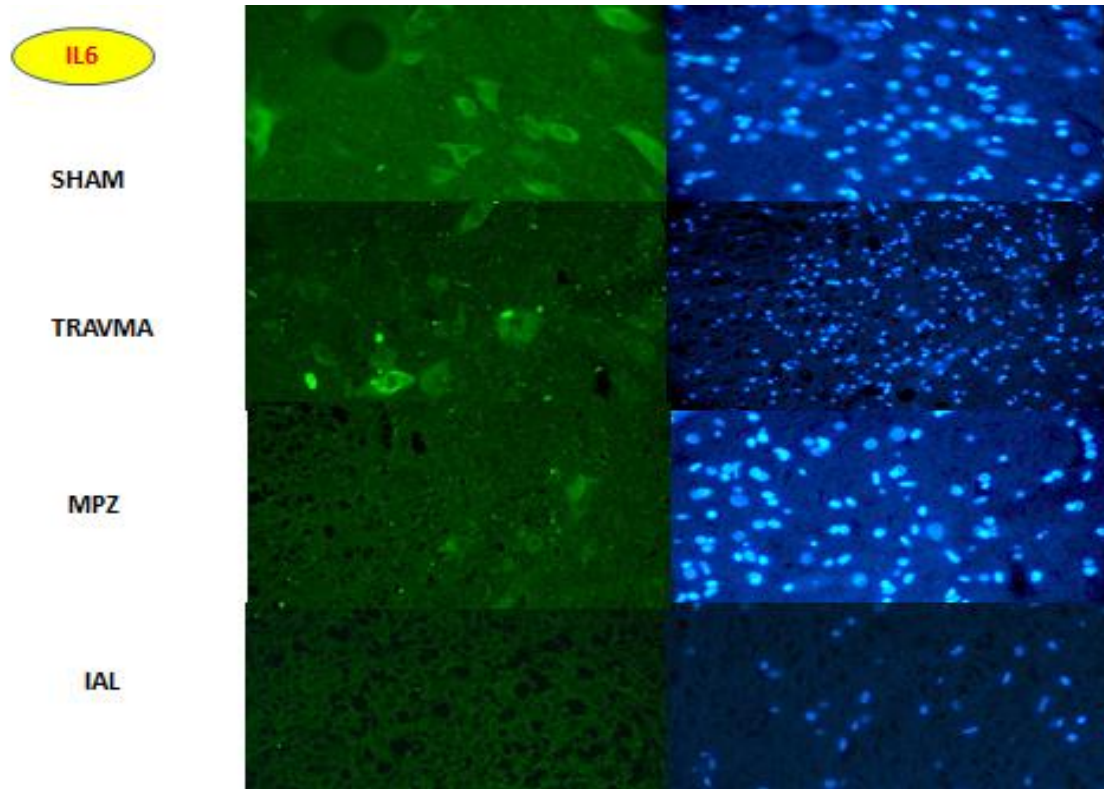


Şekil 4.10. IAL verilen Travma grubunun hematoksilin-eozin boyaması: Diğer travma gruplara göre hemorajik alan, ayrılmış miyelin kılıfı, halo hücreler azaldığı, sağlam nöronal hücrelerin sayısının arttığı görüldü. (4X büyütme, A), (10X büyütme, B) (20X büyütme,C) (40X büyütme, D).

4.5. İMMÜNHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Travma sonrası 24. saatte sakrifiye edilen sıçanların spinal kord dokularından alınan kesitlerde ayrı ayrı IL-6, CD3, Iba-1(Mikroglia), F4/80(Makrofaj), NF- κ B işaretleme yapılmış. Spinal kordun beyaz ve gri cevheri, sağ ve sol olarak 40x büyütmede komşu 4 ayrı alan incelenmiş, işaretlenen ortalama hücre sayıları karşılaştırılmıştır.

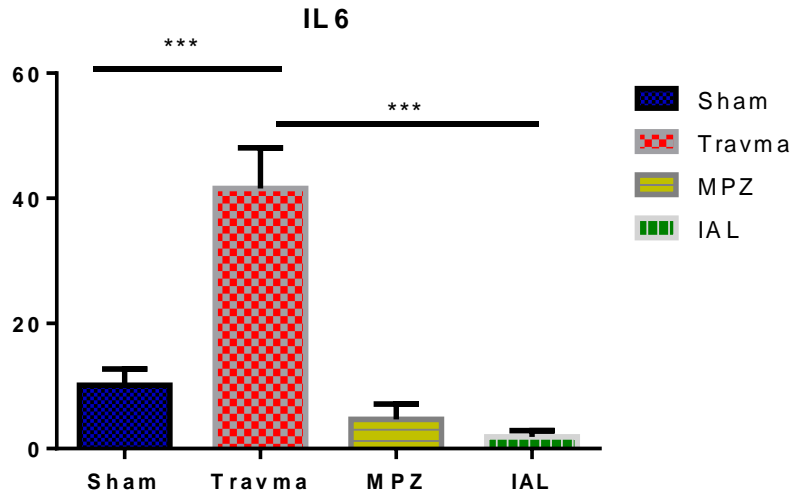
4.5.1. IL-6 Sinyalinin Değerlendirilmesi



Şekil 4.11. Spinal kord travma modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların spinal kord dokularında IL-6'nın epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Birinci ve İkinci satırda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile IL-6 ile pozitif boyanan hücreler.

Travma ve inflamasyonda proinflamatuvar sitokin olan IL-6 antikoruna ile immunreaktivite gösteren nöronlar, travma grubunda en yüksek sayıda tespit edildi. IL-6 pozitif hücre sayısı belirgin artmıştır ($3,213 \pm 13,36$) ($p < 0,0001$). Travma sonrası MPZ ($31,85 \pm 42,00$) ve IAL ($34,68 \pm 44,82$) uygulanan gruplar sadece travma uygulanan grupla karşılaştırıldığında, IL-6'la işaretli hücrelerde artış gözlemlendi ($p < 0,0001$). IAL verilen grupta, sham ($3,213 \pm 13,36$), travma + MPZ ($31,85 \pm 42,00$) gruplarına göre pozitif hücre sayısında azalma saptanmıştır. Travma + IAL grubu, diğer gruplarla belirgin istatistiksel fark göstermiştir, lakin IAL+ travma ile MPZ + travma ($-2,249 \pm 7,898$) gruplar arasında fark çok anlamlı bulunmamıştır ($p = 0,4394$).

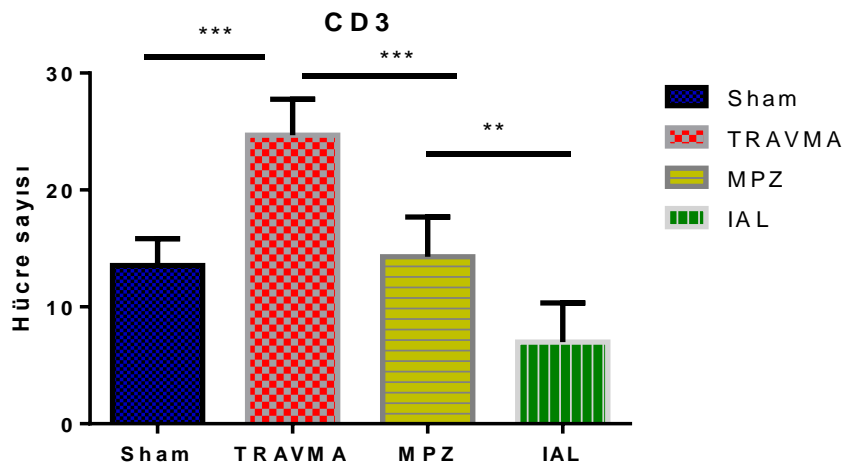
IAL alan travma grubunda doku IL-6 seviyesi, immünohistokimyasal olarak ELİSA'ya göre azalmış görülmüştür. Bunun nedeni, canlı dokuda IL-6 inhibisyonu hücresel seviyede daha anlamlı ve hızlı görülmektedir, yani ELİSA yöntemi ile 24 saat içinde IL-6 seviyesinin düşmesi için yeterli zaman olmamıştır, ama hücresel olarak immünohistokimyasal IL-6'nın düşüşü daha hızlı fark edilir ve anlamlı sonuç verir.



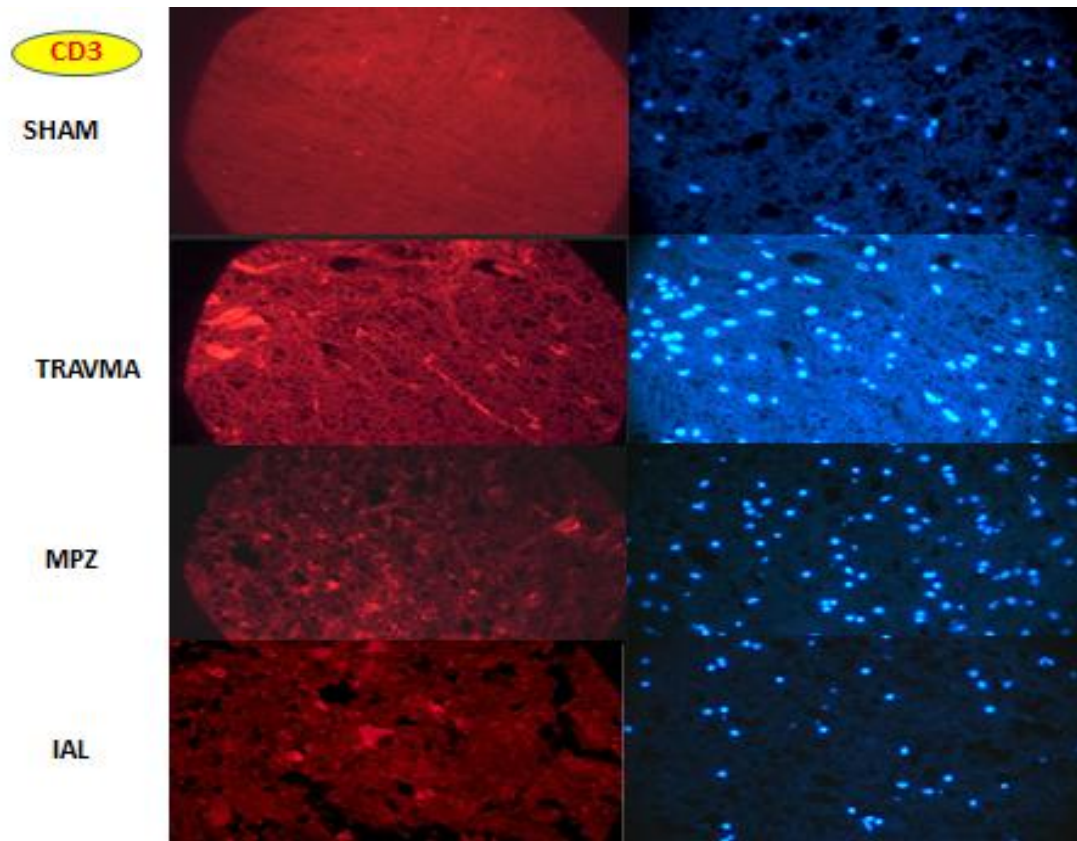
Şekil 4.12. Gruplar arası IL-6 işaretli hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılması.

4.5.2. T LENFOSİT AKTİVASYONU CD3 İLE İŞARETLENEN HÜCRE SAYILARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

İnflamasyonda önemli görev alan T lenfositlerin aktivasyonu göstermek için belirteci CD3 ile immunfloresan işaretleme yapılmıştır. Hücre sayılarında travma grubunda Sham grubuna göre belirgin artış gözlenmiştir. (16,70±5,583) ($p < 0,002$). Total boyanan hücre sayılarına göre IAL + travma grubunda, travma (12,14±23,26) grubuna göre T lenfosit aktivasyonunda çok belirgin bir azalma görülmüştür ($p < 0,0001$). Ek olarak IAL + travma grubunda, MPZ + travma (1,743±12,86) grubuna göre CD3 pozitifliğinde azalma görülmüştür, T lenfosit azalma miktarı 2 grupta da istatistiksel olarak yakındır. ($p = 0,0084$).



Şekil 4.13. Gruplar arası CD3 işaretli hücre sayılarının gruplar arası karşılaştırılması.



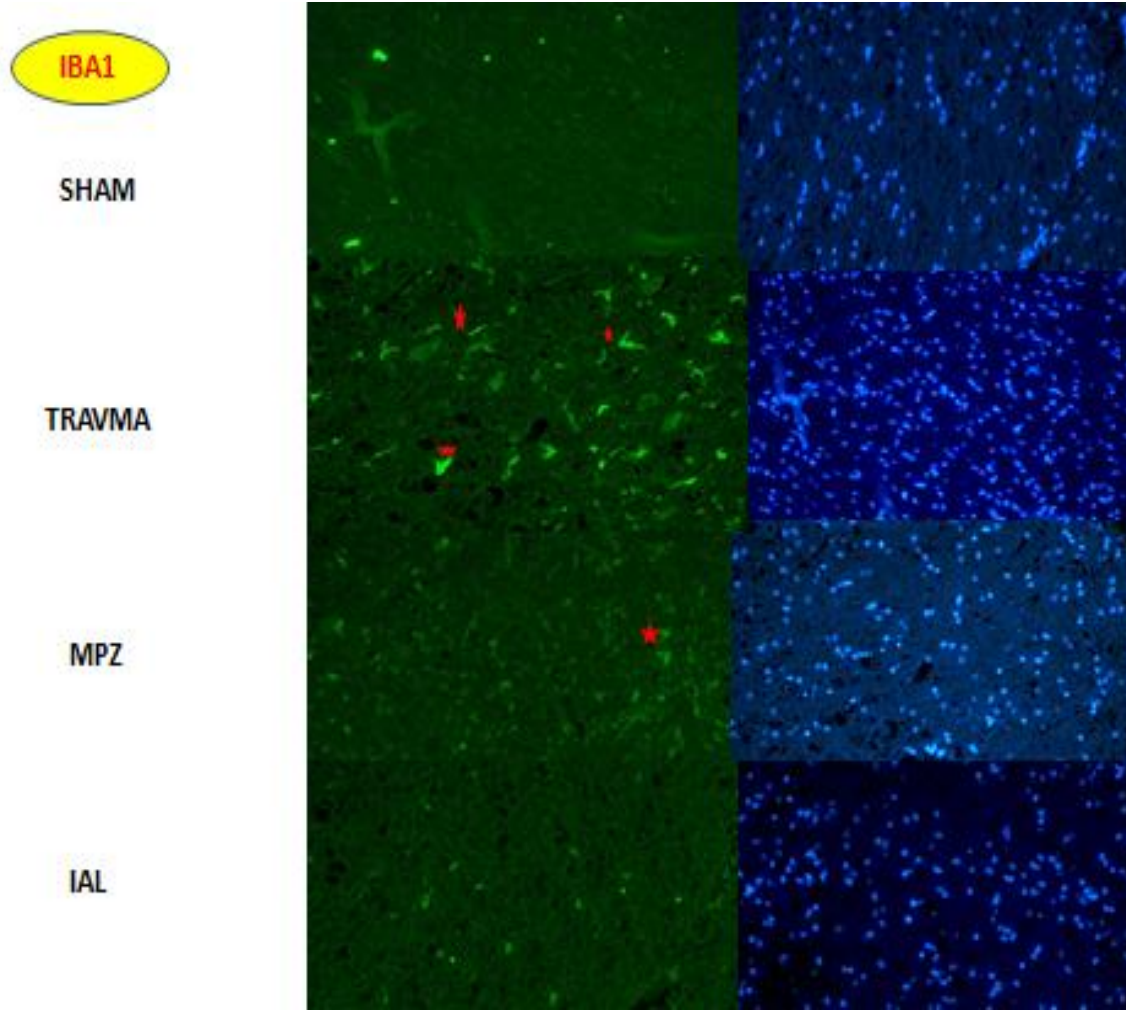
Şekil 4.14. Spinal kord travma modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların spinal kord dokularında CD3 ile işaretlenmiş T lenfositlerin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi (40X büyütme, ölçek 20 µm).

4.5.3. MİKROGLİA AKTİVASYONU İBA-1 İLE İŞARETLENEN HÜCRE SAYILARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Travma sonrası mikroglial hücre aktivasyonun gösterilmesi için mikroglia/makrofaj spesifik kalsiyum bağlayıcı bir protein olan iyonize kalsiyum bağlayıcı adaptör molekül-1 (Iba-1) tercih edilmiştir. Iba-1, aktin demetleme aktivitesine sahip olup aktive mikroglialarda fagositozda rol almaktadır [134].

Travma sonrası oluşan inflamasyonda mikroglial hücrelerin aktive olmasıyla hücrelerin morfolojileri, gen ekspresyonları ve fonksiyonları değişmektedir. Morfolojik olarak dallanmış, ince uzantıları olan mikroglialar doku hasarı veya patojen invazyonu söz konusu olduğunda buna

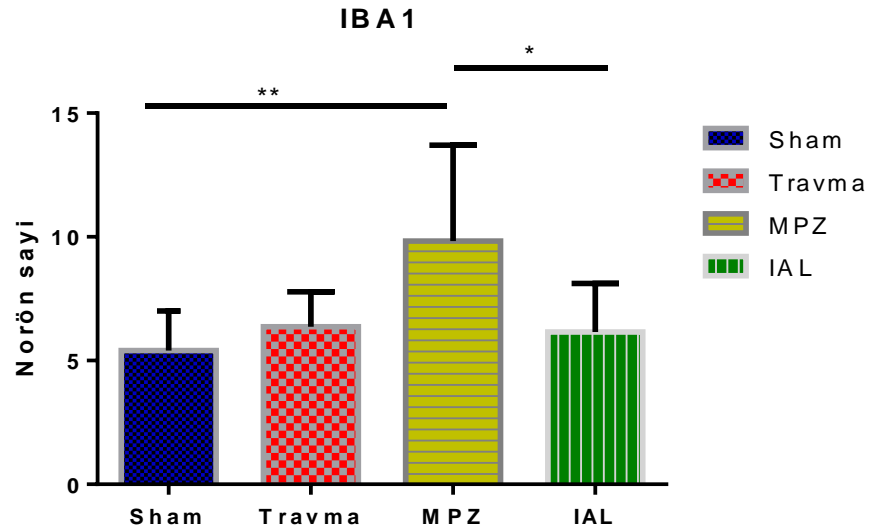
yanıt olarak infiltre olmuş makrofajlardan zor ayırt edilebilen, hipertrofik ve ameboid bir hal alırlar [135] (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Spinal kord travma modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların spinal kord dokularında Iba-1 ile işaretlenmiş Mikroglial hücrelerin epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi (40X büyütme, ölçek 20 μm). Yıldızlı işaretli hücreler dallanmış, ince uzantıları halindeki aktif ameboid mikroglialar.

Iba-1 ile işaretlenen tüm mikroglialar incelendiğinde, Sham grubu; travma ($4,252 \pm 2,352$) ve travma + IAL ($3,102 \pm 3,502$) grupları ile karşılaştırıldığında, Iba-1 sinyali ilaç verilen grupta azalmasına rağmen bu düşüş anlamlı bulunmamıştır ($p=0,9248$). Ancak travma grubu ile travma + MPZ ($6,777 \pm 0,1731$) grubuna bakıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak çok az anlamlı fark olduğu görülmüştür ($p=0,0363$). Travma ile travma + IAL ($3,102 \pm 3,502$) gruplarında,

mikroglial göçün daha az olduğu görülmesine rağmen, gruplar kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p=0,9984$) (Şekil 4.16.).

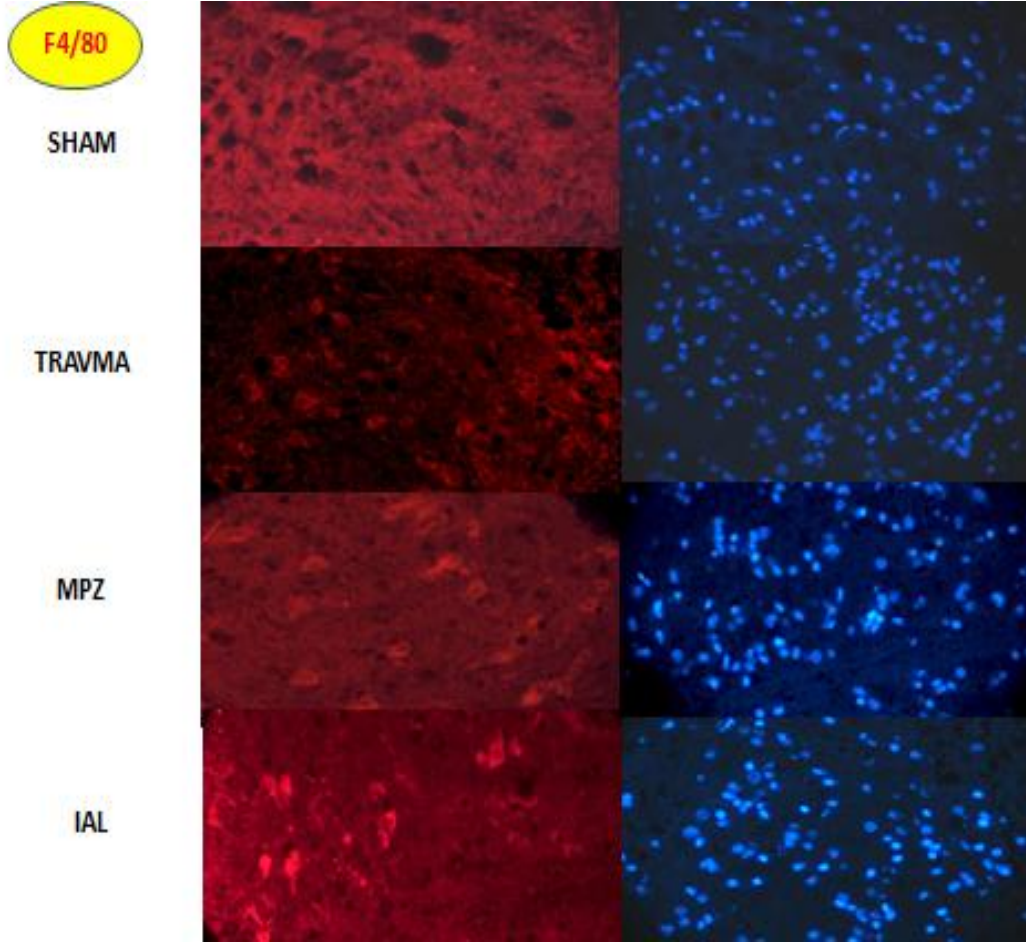


Şekil 4.16. Iba-1 ile işaretlenmiş hasarlı dokuya göç etmiş tüm mikrogliaların gruplar arasında karşılaştırılması.

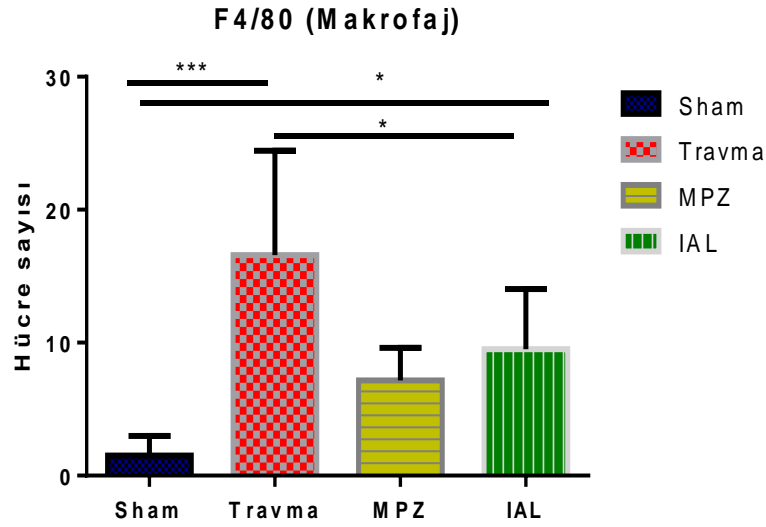
4.5.4 F4/80 İLE MAKROFAJ AKTİVASYON HÜCRE SAYILARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

İnflamasyon sonrası dokuda Makrofaj aktivasyonun gösterilmesi için F4/80 boyama ile immunfloresan hücrelerin işaretleme yapılmıştır. Travmanın 24. saatinde travma bölgesine göç etmeye başlayan anti inflamatuvar hücre olan makrofajın hesaplaması yapılmıştır.

Sham grubunda aktif hale gelmeyen makrofajlar, travma ($21,56 \pm 8,567$), travma + MPZ ($12,13 \pm 0,8582$) ve travma + IAL ($-14,48 \pm 1,492$) gruplarda görülmektedir. Sham ile diğer gruplar arasında çok anlamlı fark görülmüştür ($p < 0,0001$). Ayrıca travma grubu ile travma + MPZ ($2,929 \pm 15,92$) ve travma + IAL ($0,5793 \pm 13,57$) arasında az anlamlı fark saptanmıştır ($p = 0,0025$). Travma + MPZ ile travma + IAL ($8,846 \pm 4,146$) arasında anlamlı fark görülmemiştir ($p = 0,7575$). (Şekil 4.17) (Şekil 4.18)



Şekil 4.17. Spinal kord travma modeli oluşturulduktan 24 saat sonra sakrifiye edilen sıçanların spinal kord dokularında IL-6'nın epifloresan mikroskop ile görüntülenmesi (40X büyütme, ölçek 20 μ m). Birinci ve İkinci satırda hücre çekirdeklerini işaretleyen Hoechst görüntüleri ile IL-6 ile pozitif boyanan hücreler.



Şekil 4.18. F4/80 ile işaretlenmiş hasarlı dokuya göç etmiş tüm Makrofajların gruplar arasında karşılaştırılması.

4.5.5 NF-κB YOLAK AKTİVASYON HÜCRE SAYILARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

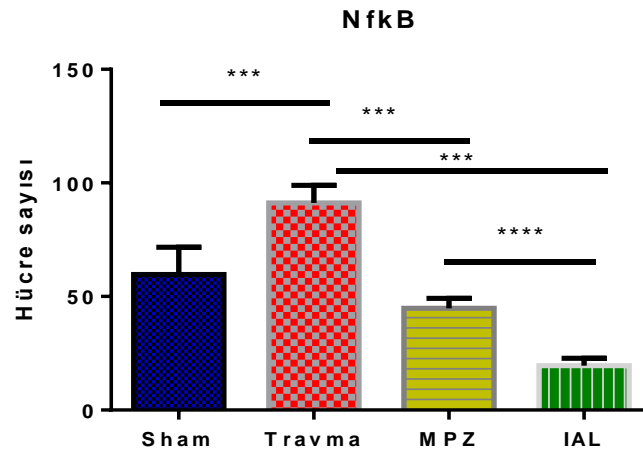
Test	Mean	95% CI of diff,	anlamlı?	Özet	P değeri
Sham vs. Travma	-31,50	-54,26± -8,739	Evet	***	0,0031
Sham vs. MPZ	14,83	-2,194±31,86	Hayır	ns	0,0811
Sham vs. IAL	40,17	21,54±58,80	Evet	**	0,0019
Travma vs. MPZ	46,33	29,54±63,13	Evet	***	0,0006
Travma vs. IAL	71,67	56,92±86,42	Evet	****	< 0,0001
MPZ vs. IAL	25,33	16,31±4,35	Evet	***	0,0006

Tablo 4.3. NF-κB yolak aktivasyonu gruplar arasında değerlendirilmesi

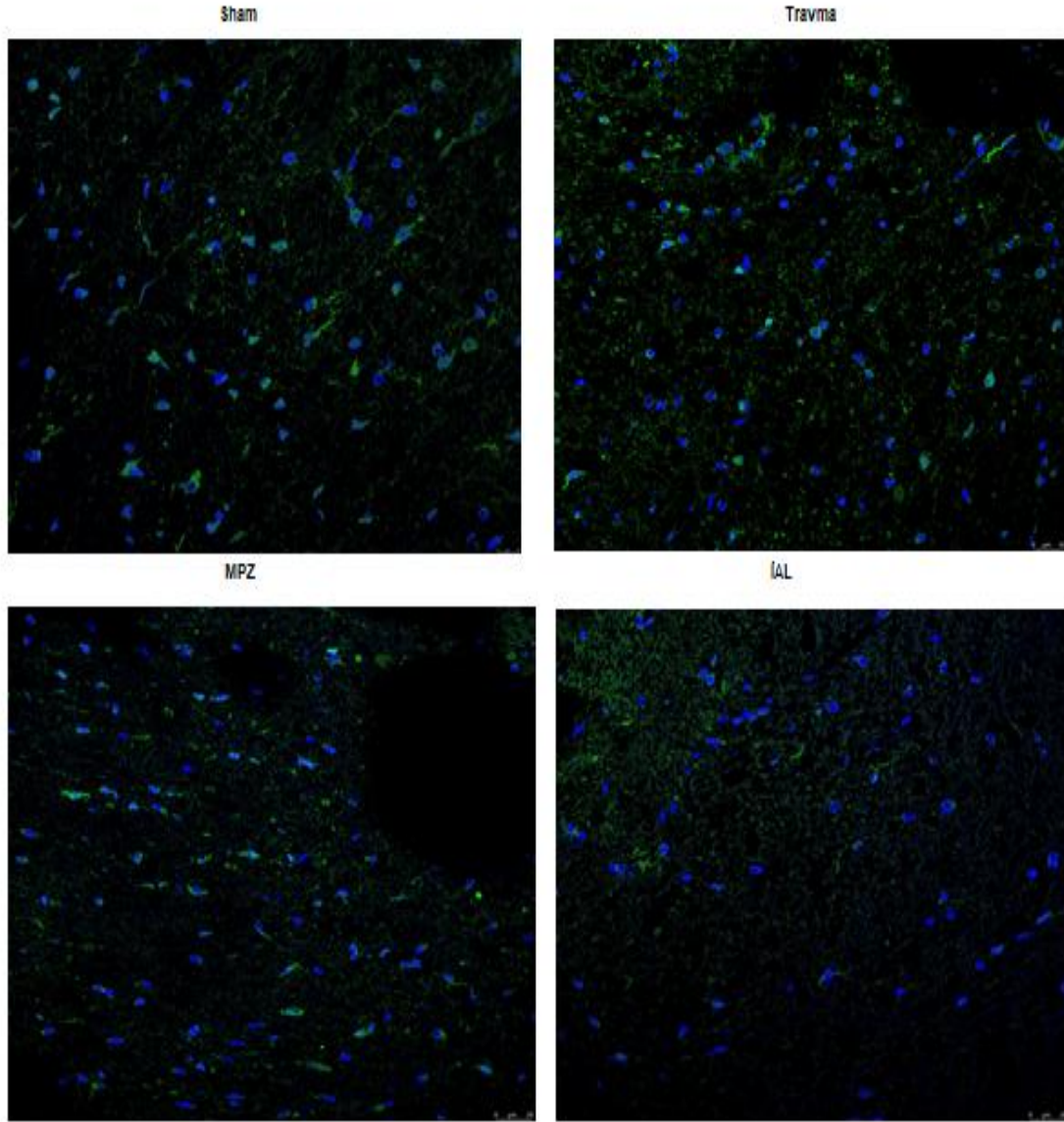
Hücrenin sitoplazmasında inaktif halde bulunan NF-κB kompleksi, Spinal kord travmasında inflamasyonun uyarısı sonucuna aktifleşip ve apoptoza gidişi artıran NF-κB'nin alt birim P65 immunohistokimyasal işaretlemesinde; işaretlenen total hücre sayısına göre travma grubunda sham grubuna oranla anlamlı artış izlenmiştir ($p=0,0031$) (Tablo 4.3). Travma

grubunda NF- κ B İşaretli n3ron sayısı, travma + MPZ ve travma + IAL gruplarıyla karşılaştırıldığında daha anlamlı artış g3stermiştir ($p=0,0006$, $p<0.0001$) (şekil 4.19).

İşaretlenen total n3ron sayısında travma + MPZ ve travma + IAL verilen grupların karşılaştırmasında; IAL verilen grupta NF- κ B immunoreaktivitesinde belirgin azalma tespit edilmiştir ($P=0.0006$) (şekil 4.20).



şekil 4.19. NF- κ B işaretli hücrelerin gruplar arası karşılaştırılması; pozitif boyanan total hücre sayısı tabloda g3sterilmiştir. (****: $p<0,0001$)



Şekil 4.20. Nf-KB immünohistokimyasal Mikroglial hücrelerin işaretlemesi : Sham grubu, Travma grubu, MPZ verilen travma grubu, IAL verilen travma grubu izlenmektedir. (İndirekt immunoperoksidaz-hematoksilen, x40 büyütme).

5. TARTIŞMA

Bu uzmanlık tez çalışmasında, sıçanlarda serbest ağırlık düşürme yöntemi ile oluşturulan spinal kord travması modelinde; intraperitoneal Izoalantolakton (IAL) uygulanmasının 24. saatte nöroinflamasyon üzerine etkileri incelenmiştir.

Spinal kord hasarının (SKH); dünyada görülme sıklığının yüksekliği, fiziksel aktivite, psikososyal ve ekonomik açıdan oluşturduğu hasarın büyüklüğü ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün düzenlenememiş olması nedeniyle günümüzde halen önemini sürdürmektedir. Bunun ile bağlantılı olarak özellikle travma sonrası gelişen nöral hasarın azaltılması ve motor fonksiyonların korunmasına yönelik moleküler ve hücresel düzeyde klinik çalışmalar devam etmektedir [89].

Sürekli geliştirilmeye çalışılan etkin farmakolojik tedavi yöntemleri hasar sonrası gelişen süreçlerin patofizyolojisinin iyi anlaşılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Hasar sonrasındaki ilk birkaç gün içerisinde omurilikte oluşan lezyonun patolojik görüntüsündeki ciddi değişiklikler klinik ve deneysel gözlemlerin en önemli noktasını oluşturmaktadır.

1911 yılında Allen köpeklerde oluşturduğu kontüzyon tipi omurilik yaralanması sonrası uygulanan myelotominin ve posttravmatik hematomyelinin kaldırılmasının nörolojik fonksiyonlarda düzelme sağlaması, daha önce bu konu ile ilgili yapılan deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasını sağlamış ve aynı zamanda sekonder hasar konseptinin de öncülüğünü yapmıştır [136,137].

Birçok travma spinal kord hasarına (SKH) neden olabilir. Travma, omuriliğin kendisini veya etrafındaki vertebral kolonu etkileyebilir. Hasarın boyutu, farklı biyomekanik faktörlere dayanır. Ekstansiyon, fleksiyon, dislokasyon veya rotasyonla ilgili distraksiyonel kuvvetlerin hepsi, nöronal elemanların kendisinde veya spinal kord damarlarında gerilme veya yırtılmaya neden olur. Diğer çeşitli mekanik nedenler; kemik kısımlardan, ligamanlardan veya spinal kanal içindeki kanamadan kaynaklanan kompresyonu içermektedir. Bu kuvvetler, sadece yaralanma esnasında akut olarak değil; aynı zamanda kalıcı deformiteye ikincil ve kronik olarak da omuriliği harabiyeti yapabilir. Mekanik kompresyon; instabilite veya destrüktif ek kuvvetler yükleyen posttravmatik kifoz gibi daha ileri yapısal deformasyonlara götürebilir ve nörolojik defisit artışına sebep olabilir [62,64].

Medulla spinalise darbe olduğu ilk anda nöronlarda oluşan yaralanma primer hasar olarak adlandırılmakta ve primer hasarın tetiklediği mekanizmalarla oluşan nörolojik yaralanma ise sekonder hasar olarak tarif edilmektedir [83,87,88,90].

Mekanik etkiler ile ortaya çıkan birinci hasarı takiben spinal kordda gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri ikincil hasar olarak adlandırılır ve spinal kordun daha fazla zarar görmesine, dolayısıyla travma sonrası hücre ölümünün devam etmesine neden olur. Primer hasarın medikal veya cerrahi tedavisi olmadığından dolayı güncel kök hücre çalışmaları dışında yapılan tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yöneliktir [55,56].

Spinal kord travmasına maruz kalan hastalarda doku hasarı, iskemi ve hemorajiye karşı akut bir fizyolojik yanıt olarak genellikle ilk saatlerden itibaren inflamatuvar olaylar ortaya çıkar. Sitokinler ve diğer endojen mediatörlerin salgılanması ve karmaşık bir etkileşimini içeren olaylar zinciri doğal iyileşme sürecini sağlamaya yöneliktir. İnflamatuvar yanıtın aşırı olması organizma aleyhine olup, sistemik inflamasyon cevabı ve multipl organ disfonksiyonu sendromu ile sonuçlanabilir. Travmaya sekonder ortaya çıkan inflamasyon yanıtta primer rolü IL-1, IL-6 ve TNF- α rol oyar [138].

Akut inflamasyonun ortaya çıkmasındaki en önemli etken hasar bölgesindeki vasküler yanıttır. Travmadan hemen sonra kısa süren bir vazokonstriksiyon ve sonrasında arterioller vazodilatasyon oluşur. Bu da kapiller yatakta konjesyona ve takiben vasküler permeabilitede artışa neden olur. Hasar bölgesine inflamatuvar hücre infiltrasyonu, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) hasar bölgesini birkaç saat içinde infiltre etmesiyle başlar ve travmanın 24. saatinde en yüksek seviyeye ulaşır. Sitokinler hücre sel düzenleyici proteinlerdir. Farklı uyarılara karşı yanıt olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler. Sitokinler immün ve inflamatuvar yanıtın etkin mekanizmalarının çoğuna katılırlar. IL-1 beta, IL-6 gibi sitokinler, proinflamatuvar sitokinler olarak bilinir ve inflamatuvar değişikliklerin oluşmasında, patojenin eliminasyonunu sağlayan hızlı bağışıklık cevabının ortaya çıkmasında görev alırlar. IL-6, akut faz cevabın asıl oluşturucusudur ve TNF- α ile ortak olarak, IL-6; ateşi oluşturan bir endojen pirojen olarak önemli rol oynar. Gram negatif bakteriyel enfeksiyon ve inflamatuvar reaksiyonlardan sonra dolaşımdaki seviyeleri artmış bulunmuştur [139].

NF- κ B, nöronlarda yaygın olarak eksprese edilir ve aktivasyonu nöronal bilginin işlenmesiyle ilişkilidir. Kemokinler, sitokinler, proinflamatuvar enzimler, adezyon molekülleri, proinflamatuvar transkripsiyon faktörleri gibi nöronal sağkalımı modüle eden moleküllerin gen regülasyonu ile ilgilidir. Nöronların yanı sıra, glial hücrelerde ve serebral kan damarlarında NF- κ B transkripsiyon faktörleri bol miktarda bulunur ve nöronal ortam etrafındaki inflamatuvar reaksiyonu da düzenler. Bu şekilde nöroinflamasyonu, nöronal korumayı veya nörotoksisiteyi modüle eder [140].

Travma sonrası hem glia hem nöronlarda NF- κ B işaretli hücre sayısının artmış olması, NF- κ B ekspresyonunun artmış olabileceğini ve inaktif durumdan aktif hale geçtiğini düşündürür. Bu şekilde nöroinflamasyon ve nörotoksisite yolaklarını yönetir. Artmış NF- κ B mikroglial aktivasyonu, salınan reaktif oksijen türleri ve proinflamatuvar sitokinler (IL-6 ve TNF- α gibi) ile ilişkili sekonder nörotoksistide merkezi rol oynar [141].

DeneySEL SKH sonrası farmakolojik ajanlar tek başlarına veya Metilprednizolon (MPZ) ile kombine bir şekilde gruplar oluşturularak uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda kombine ilaç kullanımının tek başına Metilprednizolon (MPZ) kullanımına üstünlüğü saptanmamıştır [54]. Bu nedenle kombine ilaç kullanımı yerine hasar mekanizmalarını önlemeye yönelik yan etkileri daha az olan ajanlarla çalışmanın SKH tedavisine yön göstereceği düşünülmektedir. SKH kalıcı ve geri dönüşsüz nörolojik defisitlere sebep olduğundan dolayı SKH geçiren hastaların yaşam kalitesi ciddi şekilde azalmıştır [142]. Yüksek doz kortikosteroidlerin nörolojik faydaları gösterilmiş olsa da yan etkileri de mevcuttur. Patolojisi ve farmakolojik tedavisi ile ilgili soru işaretlerini cevaplamak amacıyla SKH ile ilgili deneysel çalışmalar hala devam etmektedir.

SKH sonrası IAL NF- κ B yolağın inhibisyona bağlı nöroinflamasyonun ve ikincil hasar mekanizmalarının engellenmesi oksidatif stress, hücre disfonksiyonu, inflamatuvar yanıt ve apoptozun oluşumunu engeller. Böylece nöronal sağkalımın artmasına ve nörolojik fonksiyon bozukluklarının engellenmesine katkıda bulunabilir.

IAL ve türleri, nonspesifik fosfodiesteraz inhibisyonunu ve direkt STAT3 aktivasyonunu inhibe ederek, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etki gösteren ilaçlardır. Klinikte akciğerde bakteriyel enfeksiyona bağlı inflamasyon ve parankimal hasarı tedavi etmek için kullanılmıştır [143, 144].

En son yapılan çalışmalarda IAL ve benzeri ilaçların, sıçan modelinde, kafa travması ve beyin hasarında NF- κ B üzerine inhibe edici etkisi gösterilmiştir ve ona bağlı nöronlarda antiinflamatuvar özelliği saptanmıştır [129, 145].

Bu çalışmalar göz önüne alındığında daha önce SKH'ye bağlı nöroinflamasyonda ve hayvan spinal kord travması modellerinde denenmemiş olan Izoalantolactonun (IAL) sıçan spinal kord travması modelinde bu etkileri incelenmiştir.

NF- κ B işaretli hücre sayısı travma grubunda sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. ($p=0,0031$).

MPZ verilen travma grubunda ise travma grubuna göre işaretli hücre sayısında anlamlı düşüş vardır ($p=0,006$), ama IAL verilen travma grubunda, travma grubuna göre bu düşüş daha anlamlı görülmüştür ($p<0.0001$).

Travmada artmış mikrogliya/makrofaj aktivasyonu nöroinflamasyonda önemlidir. Bu nedenle tedavi hedeflerinden biri mikrogliya/makrofaj aktivasyonunu baskılamaktır. Bu nedenle spesifik mikrogliya/makrofaj belirteci olan Iba-1/ F4,80 kullanılmıştır. Travma grubunda Sham grubuna göre anlamlı olarak pozitif hücre sayısı artmıştır ($p<0,00001$). Travma sonrası MPZ ve IAL verilen sıçanlarda travma grubuna göre pozitif glia hücre sayısı azalmış, hatta sham grubuna yakın değerlere ulaşmıştır ($p=0,0025$), ($p=0,0363$). Bu bulgular IAL'nun, MPZ etkisi gibi mikrogliya/makrofaj aktivasyonunu baskılayan etkisini travma modelinde desteklemektedir.

Tüm bu bulgular travmatik spinal kord hasarı sonrası nöroinflamasyon yollarından birinin NF- κ B yolağı üzerinden geliştiğini ve IAL'nun bu yolak üzerinden nöroinflamasyonu baskılayabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada sıçan spinal kord travma sonrası serum IL-6, TNF- α düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Literatür bilgisine paralel olarak, travma grubunda sham grubuna göre doku IL-6, TNF- α konsantrasyonu artmıştır. Ancak istatistiksel olarak kısmen anlamlı bulunmuştur. Bunun sebeplerinden birisi travma şiddeti, diğeri travma sonrası doku IL-6 ve TNF- α düzeylerin bakılma süresi olabilir. Çalışmamızda sıçanlarda orta şiddette spinal kord travması

oluşturulmuştur. Yapılan çalışmalarda IL-6, TNF- α seviyelerinin travma şiddeti ile korele olduğu bildirilmiştir [138, 142, 145]. Bu nedenle dokuda beklenen düzeyleri saptanamamış olabilir.

ELISA sonuçlarına göre, MPZ ve IAL verilen gruplarda; doku TNF- α , IL-6 konsantrasyonu diğer gruplara göre anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p=0,002$). Literatürde bu durumu açıklayacak herhangi bir bilgi bulunamamıştır. Ancak bu durum, IAL verilen grupta nöroprotektif özellikteki NF- κ B deki artışla ilişkili olabilir.

Çalışmamızda IAL'nin omurilik travmasındaki nöroinflamasyon etkisi araştırıldı. Bu amaçla, omurilik travması uygulanan sıçanlara IAL verilerek nörolojik muayene ve değerlendirme yapıldı.

Sıçanların motor nörolojik muayeneleri; Drummond ve Moore kriterleri ve eğik düzlem test sonuçlarına göre değerlendirildi. Eğik düzlem testi sonucunda; travma ve travma sonrası MPZ ve IAL uygulanan sıçanların, sham grubu ile karşılaştırıldıklarında eğik düzlem derecelerinin anlamlı olarak düştüğü görülmüştür ($p<0,0001$).

MPZ ve IAL uygulanan ilaç gruplarında ise verilen ilaçların etkisiyle eğik düzlem test sonuçları 23. saatte artış gösterdi. IAL ilacı verilen sıçanlarla, sadece travma uygulanan sıçanlar arasında eğik düzlem dereceleri açısından 23. saatte istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar geliştiği görülmüştür ($P=0,003$).

Drummond Moore kriterleri kullanılarak yapılan motor fonksiyon skorları incelendiğinde; omurilik travması oluşturulan sıçanlar sham grubu ile karşılaştırıldığında motor fonksiyon skorlarının anlamlı olarak düştüğü gözlenmiştir ($p<0,0001$).

MPZ ve IAL uygulanan ilaç gruplarında ise, sıçanların motor fonksiyonları 23. saatte artış göstermeye başlamıştır. IAL uygulanan sıçanlarla, sadece travma uygulanan sıçanlar arasında motor fonksiyon skorları açısından 23. saatte anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,0001$).

Makroskopik olarak travma sonrası sakrifiye edilmiş sıçanların spinal kordu incelendiğinde; travma grubunun, sham grubuna göre hiperemik ve ödemli olduğu, travma sonrası MPZ ve IAL verilen grupta travma grubuna göre bu bulguların azaldığı görülmüştür.

Histopatolojik incelemelerde travma grubunda yaygın olarak tespit edilen ödem, IAL verilen grupta; belli bir alanda tespit edilmiştir. Damarlar sham grubundan farklı olarak, kollabe değil açık lümenli olarak görülmüştür. Travma grubunda sıklıkla görülen karyoreksis, karyolizis ve hayalet nöron görünüşleri, nadiren bulunmuştur. Bu bulguların IAL'in nöroprotektif etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Ayrıca travma sonrası IAL verilen grupta piamater, travma grubuna oranla az, MPZ verilen gruba oranla da artmış miktarda infiltratif hücreler içermiş ve travma grubuna oranla daha az ödemli alanlar görülmüştür. Yine travma sonrası IAL verilen grupta sayıca nörodejeneratif hücrelerde azalma dikkat çekmiş ve bu grupta sitoplazmik kondensasyon bulgusu olan hipereozinofilik sitoplazma görünüşlerine travma grubunun aksine rastlanılmamıştır. Travma grubunda yaygın olarak görülen dilate ve eritrosit içeren vasküler yapılar yine IAL verilen travma grubunda izlenmemiştir.

Tüm bu histopatolojik bulgular Izoalantolacton'un (IAL) spinal kord travmasında nöroprotektif özelliklere sahip olduğunu ve nöroinflamasyonu azalttığını düşündüren kuvvetli bulgulardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Wistar cinsi sıçanlarda serbest ağırlık düşürme metoduyla oluşturulan orta şiddetteki sıçan spinal kord travması modelinde Izoalantolacton'un (IAL) nöroprotektif ve nöroinflamasyonu baskılayıcı özellikleri; postravmatik nöronların hasarı engelleyici etkileri incelenmiştir.

- 1) IAL, travmatik spinal kord hasarındaki inflamasyonu çeşitli yollarla azaltmaktadır, bunlardan birisi NF- κ B yolağıdır.

- 2) IAL kullanarak spinal kord hasarında nörolojik olarak anlamlı bir iyileşme ve düzelme sağlandığı düşünülmüştür ($p < 0,0001$).
- 3) IAL verilen grubunda diğer gruplara göre NF- κ B işaretli total hücre sayısı azalmıştır. ($p < 0,0001$). Bu bulgulara göre sıçan spinal kord travması modelinde NF- κ B yolağı üzerinden gelişen nöroinflamasyon yolağı gösterilmiştir. IAL'un NF- κ B yolağı üzerinden gelişen nöroinflamasyonu inhibe edici etkisi gösterilmiştir.
- 4) IAL verilen grupta doku TNF- α , IL-6 düzeyleri azalmıştır ($p < 0,002$), Ancak istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p = 0,068$). Bu durumun örneklem sayısının yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür.
- 5) IAL verilen grupta IL-6 ve TNF- α salınımı anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0,002$).
- 6) Iba-1 ve F4/80 ile mikroglial ve makrofaj hücreler değerlendirildiğinde, IAL ile mikroglial ve makrofaj göçün anlamlı olarak daha az olduğu görülmektedir ($p = 0,0025$), ($p = 0,0363$).
- 7) IAL travma sonrası gelişen mikroglia aktivasyonunu baskılayarak nöroinflamasyonu azaltan etkiler göstermiştir ($p < 0,0001$)
- 8) CD3+ T lenfositler, IAL alan grupta anlamlı olarak azalmıştır ($p = 0,0084$).
- 9) IAL histopatolojik olarak travma sonrası ödemi belirgin olarak azaltmıştır Nörodejeneratif hücre sayısını azaltması ayrıca nöroprotektif özelliklerini kanıtlar.

Sonuç olarak travmaya bağlı nöroinflamasyonda NF- κ B aktivasyon yolağı önemlidir. Izoalantolakton bu yolak üzerinden etki ederek nöroinflamasyonu baskılayıcı özellik gösterir. Ayrıca bulgular Izoalantolakton nöroprotektif etkilerinin olduğunu göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Priebe, M.M. et al.** *Spinal cord injury medicine. 6. Economic and societal issues in spinal cord injury.* Arch. Phys. Med. Rehabil.2007; 88, S84–S88.
2. **National Spinal Cord Injury Statistical Center** *Spinal cord injury. Facts and figures at a glance.* J Spinal Cord. Med. 2005; 28, 379–380.
3. **J. R. Bethea, M. Castro, R. W. Keane, T. T. Lee, W. D. Dietrich, and R. P. Yeziarski,** “*Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor- κ B activation,*” *The Journal of Neuroscience*, 1998; vol.18, no. 9., 3251–3260
4. **D. S. Rafati, K. Geissler, K. Johnson et al.,** “*Nuclear factor- κ B decoy amelioration of spinal cord injury-induced inflammation and behavior outcomes*” *Journal of Neuroscience Research*,2008;vol. 86, no. 3, pp. 566–580.
5. **Yigitkanli K, Pekcec A, Karatas H, Pallast S, Mandeville E, Joshi N, Smirnova N, Gazaryan I, Ratan RR, Witztum JL, Montaner J, Holman TR, van Leyen K.** *Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke.* Ann Neurol 2013; 73:129–135.
6. **Gruner J. A.** *A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat.* J. Neurotrauma 9, 123-128. 10.1089/neu.1992.9.123 .
7. **Onose, G. et al.** *A review of published reports on neuroprotection in spinal cord injury.* Spinal Cord 2009; 47, 716–726.
8. **Hurlbert, R.J.** *Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury.* Spine (Phila Pa 1976) 31,2006; S16–S21 discussion S366.

9. **Hall, E.D. and Springer, J.E.** (2004) *Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal*. NeuroRx, 2004;1, 80–100.
10. **Zhao, Peng.** "Alantolactone Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest on Lung Squamous Cancer SK-MES-1 Cells". Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.2015;29 (5): 199–226.
11. **Dumont AS, Dumont RJ,Oskouian R.** Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? Current Opinion in Neurology 2002; 15:713-720.
12. **Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert J.** Acute spinal cord injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. Clin. Neuropharmacology 2001; 24(5): 254-264.
13. **Xarchas K, Bourandas J.** Injuries and disease of the Spine in ancient times. Spine 2003; 28(13):1481-1484.
14. **Hughes JT.** The Edwin Smith Surgical Papyrus: An analysis of the first case reports of spinal cord injuries. Paraplegia 1988; 26:71-82.
15. **Elsberg CA.** The Edwin Smith Surgical Papyrus and diagnostic treatment of injuries to the skull and spine . Ann Med. Hist. 1931; 3:271-279.
16. **Marketos SG, Skiadas P.** Hippocrates. Spine 1999; 24:1381-1391.
17. **Sonntag VKH.** History of degenerative and traumatic disease of the spine.In a history of neurosurgery. Greenblat SH. American Association of Neurological Surgeons 1997;355-357.
18. **Ohry A, Ohry KK.** Spinal cord injuries in the 19th century.Churchill Livingstone,Edinburg 1989; 9-35.

19. **Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W.** *Animal models used in spinal cord regeneration research.* Spine 2002; 27(14):1504-1510.
20. **Amar AP, Levy ML.** *Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury.* Neurosurgery 1999; 44(5)1027-1040.
21. **Gülmen V, Zileli M.** *Deneyisel omurilik yaralanması. Omurilik ve omurga cerrahisi 2nd ed.* 2002; 951-956.
22. **Çavdar S.** *Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi* Ed. M. Zileli ve A.Fahir Özer, 2.baskı, cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002,s: 15-17.
23. *Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body an yahoo education.* Philadelphia. Lea & Febiger, 1918; Newyork Bartleby. com. 2000.
24. **Aydoğan S. A. Fahir Özer :** *Omuriliğin vasküler anatomisi ve kan akımı, Omurilik ve Omurga Cerrahisi ,* Ed. M.Zileli, A. Fahir Özer, 2. baskı, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002, s: 87-90.
25. **Netter FH:** *Beyin ve omurluğun anatomisi, The Netter Collection of Medical illustration Nervous System, Volume 1: Part I: Anatomy and Physiology,* Ed: Brass A, Elsevier Saunders, 2007, pp: 36–66.
26. **Devivo M.** *Epidemiology of traumatic spinal cord injury.* In:Kirshblum SC, Campognolo D, DeLisa JE, EDs. Spinal cord medicine. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins,2002; 69-81.
27. **Tator CH.** *Experimental and clinical studies of the pathophysiology and management of acute spinal cord injury.* J Spinal Cord Med. 1996 Oct;19(4):206– 214.

28. **Karamemetoğlu SS, Unal S, Karacan I, Yılmaz H, Togay HS, Ertekin M, Döşoğlu M, Ziyal MI, Kasaroğlu D, Hakan T.** *Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An epidemiological study.* Paraplegia. 1995;33(8):469-71.
29. **Karamemetoğlu SS, Nas K, Karacan I, Sarac AJ, Koyuncu H, Ataoğlu S, Erdoğan F.** *Traumatic spinal cord injuries in southeast Turkey: an epidemiological study.* Spinal Cord. 1997;35(8):531-3.
30. **Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sümbüloğlu G, Kirnap M, Dursun H, Kalkan A, Cengiz A, Yalınkılıç A, Ünal HI, Nas K, Orkun S, Tekeoğlu .** *Traumatic spinal cord injuries in Turkey: A nation-wide epidemiological study.* Spinal Cord. 2000;38(11):697-701.
31. **Stevan Kirshblum, Çeviri. Erhan B, Bardak AN. In: Delisa J ed - Arasıl T, Gök H, Yavuzer G, EDs.** *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon İlkeler ve Uygulamalar.* ikinci Baskı, Ankara, Güneş Tıp Yayınevi, 2007; sf. 1715- 1751.
32. **Zileli M.** *Omurilik yaralanmasında epidemiyoloji ve prognoz.* In Zileli M, Özer F. EDs. *Omurilik ve Omurga cerrahisi.* İzmir, Meta Basım Evi.2002; Sf: 885-892.
33. **Gündüz B, Erhan B.** *Updates in ASIA Evaluation: Lower Extremity Motor Evaluation [Omurilik Yaralanması Nörolojik Sınıflaması için Uluslararası Standartlar Değerlendirme Formunun Güncellenmesi].* Turk J Phys Med Rehab 2015;61(1):19–24.
34. **Hachem LD, Ahuja CS, Fehlings MG.** *Assessment and management of acute spinal cord injury: From point of injury to rehabilitation.* J Spinal Cord Med 2017;40(6):665–75.
35. **Gunduz B.** *ASIA Update - ASIA Impairment Scale: Level Determination, Classification, and Case Examples.* Turk J Phys Med Rehab 2015;61(Supp 1):25–31.
36. **Erhan B, Gündüz B.** *Omurilik Yaralanması. In: Oğuz H, Çakırbay H, Yanık B, editörler. Tıbbi Rehabilitasyon.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2015. pp. 461–478.

37. **Kirshblum SC, Biering-Sorensen F, Betz R, Burns S, Donovan W, Graves DE, Johansen M, Jones L, Mulcahey MJ, Rodriguez GM, Read MS, Steeves JD, Tansey K, Waring W.** *International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury: Cases with classification challenges.* J Spinal Cord Med 2014;37(2):120–127.
38. **Nowak DD, Lee JK, Gelb DE, Poelstra KA, Ludwig SC.** *Central cord syndrome.* J Am Acad Orthop Surg 2009;17(12):756–65.
39. **Ranga U, Aiyappan SK.** *Brown-Séguard syndrome.* Indian J Med Res 2014;140(4):5723.
40. **McKinley W, Santos K, Meade M, Brooke K.** *Incidence and Outcomes of Spinal Cord Injury Clinical Syndromes.* J Spinal Cord Med 2007;30(3):215–24.
41. **Bohlman H, Ducker T, Lucas J.** **Spine and spinal cord injuries.** In: **Simeone R, Herkowitz H, Garfin SR, Balderston RA, Rothman E,** editors. *The Spine 3rd ed.* WB Saunders; 1992. pp.973–1011.
42. **Brouwers E, van de Meent H, Curt A, Starremans B, Hosman A, Bartels R.** *Definitions of traumatic conus medullaris and cauda equina syndrome: a systematic literature review.* Spinal Cord 2017;55(10):886–90.
43. **Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, Johansen M, Jones L, Krassioukov A, Mulcahey MJ, Read MS, Waring W.** *International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011).* J Spinal Cord Med 2011;34(6):535–46.
44. **Alaca R.** **Omurilik Yaralanmasında Rehabilitasyon.** In: **Beyzaova M, Kutsal YG,** editörler. *Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon 1-2.* Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2016. 2920 p.

45. **Catz A, Itzkovich M, Agranov E, Ring H, Tamir A.** *SCIM - spinal cord independence measure: a new disability scale for patients with spinal cord lesions.* Spinal Cord 1997;35(12):850–6.
46. **Gresham GE, Labi MLC, Dittmar SS, Hicks JT, Joyce SZ, Stehlik MAP.** *The quadriplegia index of function (QIF): Sensitivity and reliability demonstrated in a study of thirty quadriplegic patients.* Spinal Cord 1986;24(1):38–44.
47. **Ditunno JF, Barbeau H, Dobkin BH, Elashoff R, Harkema S, Marino RJ, Hauck WW, Apple D, Basso DM, Behrman A, Deforge D, Fugate L, Saulino M, Scott M, Chung J.** *Validity of the walking scale for spinal cord injury and other domains of function in a multicenter clinical trial.* Neurorehabil Neural Repair 2007;21(6):539–50.
48. **Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Hurlbert RJ, Rozzelle CJ, Ryken TC, Theodore N.** *Clinical assessment following acute cervical spinal cord injury.* Neurosurgery 2013;72:40–53.
49. **Bluvshstein V, Front L, Itzkovich M, Aidinoff E, Gelernter I, Hart J, Soerensen FB, Weeks C, Laramee MT, Craven C, Hitzig SL, Glaser E, Zeilig G, Aito S, Scivoletto G, Mecci M, Chadwick RJ, El Masry WS, Osman A, Glass CA, Silva P, Soni BM, Gardner BP, Savic G, Bergström EM, Catz A.** *SCIM III is reliable and valid in a separate analysis for traumatic spinal cord lesions.* Spinal Cord 2010;49(2):292–6.
50. *MRG ve BT İnceleme Standartları* , Türk radyoloji derneği. 2018; 35-36.
51. **Kuropatnicki AK, Klósek M, Król W.** *The beginnings of modern research on propolis in poland.* Evid Based Complement Alternat Med. 2013; doi: 10.1155/2013/983974.
52. **Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E.** *Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats.* Free Radic Biol Med. 2004; 37(3): 386-94.

53. **Hoşnüter M, Babuççu O, Armutcu F, Kargı E, Işıkdemir A.** *The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury.* Burns. 2004; 30(1): 121-5.
54. **Teke Z, Yenisey C, Sacar M, Simsek NG, Akoglu M.** *Caffeic acid phenethyl ester alleviates mesenteric ischemia/reperfusion injury.* J Invest Surg. 2012; 25(1): 354-65.
55. **Ilhan A, K.U., Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O.** *The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits.* Eur J Cardiothorac Surg. 1999; 16(1): 458-63.
56. **Vural A, Nergis Y, Arslan A, Uzunlar K.** *Deneyisel spinal kord travmalarında dopamin ile kombine nimodipin ve nalorfinin etkileri* Ankara Patoloji Bülteni. 1994; 11(2): 21-5.
57. **Onifer SM, Scheff SW.** *Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery.* ILAR J. 2007; 48(4): 385-95.
58. **Hasturk A, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altinors N.** *Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage.* Turk Neurosurg. 2009; 19(4): 353-59.
59. **Anthes DL, Theriault E, Tator CH.** *Ultrastructural evidence for arteriolar vasospasm after spinal cord trauma.* Neurosurgery.1996; 39: 804-814
60. **Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ.** *Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. Part 2: acute spinal cord injury.* Neurosurg.1993;285-292.
61. **Amar AP, Levy ML.** *Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury.* Neurosurgery.1999; 44: 1027-1039.

62. **Tator CH.** *Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects.* Neurochirurgie.1991;37: 291-302.
63. **Berksoy İ,Ac-DMQD-CHO** *Noroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travması modelinde incelenmesi.* Taksim Eğit. Araş. Hast. Nöroşirürji Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi ; 2004.
64. **Huges T.***Neuropathology of the spinal cord. Young RR, Woolsey RM, ed. Diagnosis and Management of Disorders of the Spinal Cord.* Philadelphia: W B Saunders.1995; 49-67.
65. **Keane RW, Kraydieh S. Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD.***Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury.* J Neuropathol Exp Neurol . 2001;60: 422-429.
66. **Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF.** *Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury.* Spinal Cord . 1998;36 : 683-690.
67. **Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P.***Advances in spinal cord injury. Role Apoptosis.* Spine.2000; 25: 1859-1866of.
68. **Choi DW.** *Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture in calcium dependent.* Neurosci Lett .1985; 58: 293-297.
69. **Agrawal SK, Fehlings MG.***Role of NMDA and non NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury.* J Neurosci .1997;17: 1055-1063.
70. **Cheung JY, Bonventra JV, Malis CD,Leaf A.** *Calcium and ischemic injury.* N Engl J Med.1986; 314: 1670-1676
71. **Lipton SA, Rosenberg PA.***Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders.* N Eng J Med. 1994;330: 613-622.

72. **Wrathall JR, Teng YD, Choiniere D.** *Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors.* Exp Neurol .1996;137: 119-126.
73. **Braugler JM, Duncan LA, Goodman T.** *Calcium enhances in vitro free radical-induced damage to brain synaptosomes, mitochondria and cultured spinal cord neurons.* J Neurochem.1985; 45: 1288-1293.
74. **Choi DW.** *Calcium mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage.* Trends Neurosci. 1988;11: 465-469.
75. **Sugawara T, Lewen A, Gasche Y, Yu F, Chan PH.** *Overexpression of SOD1 protects vulnerable motor neurons after spinal cord injury by attenuating mitochondrial cytochrome c release.* FASEB J 16: 1997-1999, 2002.
76. **Choi WS, Lee EH, Chung CW.** *Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2.* J Neurochem.2001;77:1531-1541.
77. **Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA.** *DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats.* J Comp. Neurol 1999; 404: 159-71.
78. **Braugler JM, Hail ED.** *Current application of "high-dose" steroid therapy for CNS injury. A pharmacological perspective.* J Neurosurg.1985; 62: 806-810.
79. **Hall ED.** *The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone.* J Neurosurg.1992;76; 13-22.
80. **Hall ED, Braugler JM.** *Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺ -K⁺ -ATPase activity.* J Neurosurg.1982; 57: 247-253.

81. **Hurlbert RJ.** *Methyprednisolone for acute spinal cord injury: an inappropriate standart of care.* J Neurosurg.2000; 93: 1-7.
82. **Young W, Flamm ES.** *Effect of high-dose corticosteroid therapy on blood flow, evoked potentials, and extracellular calcium in experimental spinal injury.* J Neurosurg.1982; 57: 667-673.
83. **Tator CH, FRCS, Fehlings MG:** *Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms:* J Neurosurg, 75: 15-26, 1991.
84. **Zileli M:** *Omurilik yaralanmasının farmakolojik tedavisi. Omurilik ve Omurga Cerrahisi.* Ed. Zileli M, Özer AF, 2. Baskı, Saray Medikal yayıncılık, İzmir, 2002, s: 833- 840.
85. **Uzan M:** *Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatoloji, Medulla Spinalis Yaralanmaları,* Ed. Hancı M, Aydıngöz Ö, Logos Yayıncılık, istanbul, 2000, s:152-161.
86. **Agrawal SK, Nashmi R, Fehlings MG:** *Role of L-and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury.* Neuroscience, 2000; 99: 179-188.
87. **Agrawal SK, Fehlings MG:** *Mechanisms of secondary injury to spinal cord axons in vitro: Role of Na, Na-K ATPase, the NA-H exchanger and the Na-Ca exchanger.* J. Neuroscience, 1996; 16 (2): 545-552.
88. **Amar AP, Levy ML:** *Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury.* Neurosurgery, 1999; 44: 1027-1040.
89. **Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ:** *Acute spinal cord injury, Part II: Contemporary Pharmacotherapy.* Clin.Neuropharmacology, 2001; 24 (5): 265-279.

90. **Tator CH, FRCS, Fehlings MG:** *Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms:* J Neurosurg, 1991; 75: 15-26.
91. **Bethea JR, Dietrich WD:** *Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury.* Current Opinion in Neurology, 2002; 15: 355-360.
92. **Li M, Ona VO, Chen M, et al:** *Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury.* Neuroscience, 2000; 99: 333- 342.
93. **Schwab ME, Bartholdi D.** *Degenerative and regeneration of axons in the lesioned spinal cord.* Physiol Rev 1996;76:319-370.
94. **Kaptanoğlu E.** *Temel nöroşirurji; Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi.1. Baskı,* Ankara: Buluş Tasarım ve Matbacılık Hizmetleri, 2005.
95. **Rawji KS, Kappen J, Tang W, et al.** *Deficient surveillance and phagocytic activity of myeloid cells within demyelinated lesions in ageing mice visualized by ex vivo live multiphoton Imaging.* J Neurosci. 2018.
96. **Carlos TM, Harlan JM.** *Leucocyte-endothelial adhesion molecules.* Blood 1994;84: 2068-2101.
97. **Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, Kracht M.** *NFκB: A multifaceted transcription factor regulated at several levels.* Chem Bio Chem 2004; 5: 1348-1358.
98. **Sen R, Baltimore D.** Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1988; 46: 705- 716.
99. **Zhang L, Badgwell DB, Bevers JJ, Schlessinger K, Murray PJ, Levy DE, Watowich SS.** *IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathways: Functional analysis of the conserved STAT3 N-domain.* Mol Cell Biochem 2006; 288 (1- 2): 179-189.

100. **Sun XF, Zhang H.** *NF- κ B and NF- κ BI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases.* *Histol Histopathol* 2007; 22: 1387-1398.
101. **Dalmızrak A, Kosova B.** *TANK proteininin sinyal iletimindeki fonksiyonel analizi.* Yüksek Lisans Tezi, İzmir 2005.
102. **Ekinci Ö, Memis L.** *Küçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında nükleer faktör kappa B immünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi.* *Gazi Tıp Dergisi* 2008; 19 (1): 1-5.
103. **Camandola S, Mattson MP.** *NF- κ B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases.* *Expert Opin Ther Targets* 2007; 11 (2): 123-131.
104. **Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML.** *NF- κ B inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer.* *Curr Med Chem* 2007; 14: 367-376.
105. **Hoffman A, Baltimore D.** *Circuitry of nuclear factor κ B signalling.* *Immunol Rev* 2006; 210: 171-186.
106. **Ling L, Cao Z, Goeddel DV.** *NF-kappaB-inducing kinase activates IKKalpha by phosphorylation of Ser-176.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3792-3797.
107. **Lindström TM, Bennett PR.** *The role of nuclear factor kappa B in human labour.* *Reproduction* 2005; 130: 569-581.
108. **Yamamoto Y, Gaynor RB.** *Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer.* *The J Clin Invest* 2001; 107 (2): 135-142.
109. **Umezawa K.** *Inhibition of tumor growth by NF- κ B inhibitors.* *Cancer Sci* 2006; 97 (10): 990- 995.

110. **Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Franzen R, Wislet-Gendebien S.** *Spinal cord injuries - how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge?* Stem Cells. 2013; doi: 10.1002/stem.1579.
111. **Grulova I, Nagyova M, Cizek M, Cizkova D.** *The effect of hypothermia on sensory-motor function and tissue sparing after spinal cord injury.* Spine J. 2013; doi: 10.1016/j.spinee.2013.06.073.
112. **Avcı CB, Baran Y, Sahin F, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G.** *Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells.* J Cancer ResClin Oncol. 2011; 137(1):41-7.
113. **Yusuf SŞ, Ömer B, Sevil AV.** *Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimentally Induced Spinal Cord Trauma.* L Clinical Med. 2012; 3(4): 442-7.
114. **Bakar B, Kupana Ayva S, Sarkarati B, Kasımcı MO, Kılınc K.** *Effects of low-dose methotrexate in spinal cord injury in rats.* Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2013; 19(4): 285-93.
115. **Ismailoğlu Ö, O.B., Sütcü R, Kara Y, Tomruk O, Demir N.** *Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats.* Am J Med Sci. 2013; 345(1): 39-44.
116. **Kato H, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Kouchoukos NT, Choi DW.** *Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat.* Exp Neurol. 1997; 148(2): 464-74.
117. **Kasai M, Soumiya H, Furukawa S.** *Ethanol extract of chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury.* Evid Based Complement Alternat Med. 2011: 10.1155/2011/749627.

118. **Guang C, Shouyu W, Decheng LV.** *Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats.* *Exp Ther Med.* 2013; 6(4): 868-72.
119. **Merih I, Taner T, Hakan Y, Fevzullah A, Aylin A, Ferruh G, Mustafa U.** *The Use of Methylprednisolone, Vitamin E and Their Combination in Acute Spinal Cord Injury: An Experimental Study.* *Turkish Neurosurgery.* 2006; 16(1): 2-8.
120. **Hao HH, Guo ZJ, Bai L, Zhang RP, Shuang WB, Jia YJ, Wang J, Li XY, Liu Q.** *Valproic acid reduces autophagy and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats.* *Neurosci Bull.* 2013. 29(4): 484-92.
121. **Smith, elder and Company.** *The collected works of Sir Humphry Davy ,Discourses delivered before the Royal society. Elements of agricultural chemistry, pt.* Chemical Society (Great) (1895). 2015; 554-555.
122. **Xu R, Zhou G, Peng Y, Wang M, Li X.** *Pharmacokinetics, tissue distribution and excretion of Isoalantolactone and Alantolactone in rats after oral Administration of Radix Inulae Extract.* *Molecules.* 2015;20:7719–7736.
123. **Lee J-Y, Kim S-B, Chun J, Song KH, Kim YS, Chung S-J, Cho H-J, Yoon I-S, Kim D-D.** *High body clearance and low oral bioavailability of alantolactone, isolated From inula helenium, in rats: extensive hepatic metabolism and low stability in gastrointestinal fluids.* *Biopharm Drug Dispos.* 2016; 37:156–167.
124. **Pal HC, Sehar I, Bhushan S, Gupta BD, Saxena AK.** *Activation of caspases and poly (ADP-ribose) polymerase cleavage to induce apoptosis in leukemia HL-60 cells by Inula Racemosa.* *Toxicol in Vitro.* 2010;24:1599–1609.
125. **Cantrell CL, Abate L, Fronczek FR, Franzblau SG, Quijano L, Fischer NH.** *Antimycobacterial Eudesmanolides from Inula helenium and Rudbeckia subtomentosa.* *Planta Med.* 1999;65:351–355.
126. **Hye, Sun Lim.** *"Alantolactone from Saussurea lappa Exerts Antiinflammatory Effects by Inhibiting Chemokine Production and STAT1 Phosphorylation in TNF- α and IFN- γ -induced in HaCaT cells".* *Phytotherapy Research.* 2015; 29 (7): 1088–1096.

127. **Alejandro, Barreroa.** "New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones". *Fitoterapia*. 2000; 66 (71): 60–64.
128. **Shea,S.** "In vitro activity of *Inula helenium* against clinical *Staphylococcus aureus* strains including MRSA". *British Journal of Medical Science*.2009; 66 (4): 186–9.
129. **Liwei n, Jinsheng L, Yeye W. Rui T.** *Anti-Neuroinflammatory Effect of Alantolactone through the Suppression of the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways*. *Cells*, 2019; 8(7): 739.
130. **Karamehmetoğlu SS, Karacan I, Yılmaz H, Togay HS, Ertekin M, Döşoğlu M, Ziyal MI, Kasaroğlu D, Hakan T.** *Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An epidemiological study*. *Paraplegia*. 1995; 33(8): 469-71.
131. **Döşoğlu M, İzgi N, Ünal ÖF.** *Omurilik Travmalarında İkincil Hasar Mekanizmaları*. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 1998; 4(3): 147-57.
132. **Wrathall JR, Teng YD, Choiniere D:** *Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX an antagonist of non N-methyl-Daspartate receptors*. *Exp. Neurol*. 1996; 137: 119-126.
133. **Young W:** *The Post-Injury Response in Trauma and Ischemia Seconder Injury of Protective Mechanisms*. *Cent Nerv Syst Trauma*. 1987; 4: 27-51.
134. **Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S.** *Microglia/macrophage-specific protein Iba-1 binds to fibrin and enhances its actin-bundling activity*. *J Neurochem* 2004;88(4):844-56.
135. **Donat CK, Scott G, Gentleman SM, Sastre M.** *Microglial Activation in Traumatic Brain Injury*. *Front Aging Neurosci*. 2017;9:208.
136. **Allen AR:** *Remarks on the histopathological changes in the spinal cord due to impact. An experimental study*. *J Nerv Dis* 1914; 41:141 -147
137. **Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W:** *Animal models used in spinal cord regeneration research*. *Spine* 2002; 27(14):1504 -1510.

138. **Opal SM, DePalo VA.** Anti-inflammatory cytokines. 2000,117:1162 -1172.
139. **Ligun Yang, Nigel R. Jones et al.** *Severity -dependent expression of pro - inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat.* Journal of Clinical Neuroscience 2005 276-284.
140. **Shih, R.-H., C.-Y. Wang, and C.-M. Yang,** *NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review.* Frontiers in Molecular Neuroscience, 2015. 8(77).
141. **Block, M.L., L. Zecca, and J.-S. Hong,** *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms.* Nature Reviews Neuroscience, 2007. 8(1): p. 57.
142. **Anderson DK, M.E., Waters TR, Green ES,** *Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment.* J Neurosurg. 1982; 56: 106-113.
143. **Chun, J.** *"Alantolactone selectively suppresses STAT3 activation and exhibits potent anticancer activity in MDA-MB-231 cells".* Cancer Letters. 2015 357 (1): 393–403.
144. **Qiu, J., Luo, M., Wang, J., Dong, J., Li, H., Leng, B. ,Deng, X.** *Isoalantolactone protects against Staphylococcus aureus pneumonia.* FEMS Microbiology Letters 2011; 1574-6968.
145. **Xun W., Yu-Long L., Jin-Shan X., Xiao-Qiang L., Li-Tao W. and Bo Z .** *Alantolactone plays neuroprotective roles in traumatic brain injury in rats via anti inflammatory, anti-oxidative and anti-apoptosis pathways,* Am J Transl Res. 2018; 10(2): 368–380.

