T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA VE İNTERLÖKİN-6 EKSPRESYONUNA MİNOSİKLİN VE METİLPREDNİZOLON KOMBİNE TEDAVİSİNİN ETKİLERİ

Leman SENCAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

ADANA-2013

T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA VE İNTERLÖKİN-6 EKSPRESYONUNA MİNOSİKLİN VE METİLPREDNİZOLON KOMBİNE TEDAVİSİNİN ETKİLERİ

Leman SENCAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2010D7'nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:……..
ADANA-2013

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında her zaman beni destekleyen, tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen, danışman hocam ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sait Polat'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım süresince yardım ve desteklerinden dolayı, Tez İzleme Komitesi üyeleri, Prof.Dr.Ufuk Özgü Mete ve Prof.Dr.Metin Tuna'ya saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Abdullah Tuli'ye ve Dr. Ebru Dündar'a, deneylerim süresince birlikte çalıştığım, Nöroşirurji Anabilim Dalı Araştırma Görevlilerinden, değerli arkadaşlarım, Dr. Serkan Diril ve Uz. Dr. Neşet Kişi'ye teşekkürlerimi sunarım. Eğitimim sırasında, bana her zaman destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine, deneylerim süresince her konuda bana yardımcı olan, Anabilim Dalımız teknisyenleri Adile Sarıcalar ve Nevriz Dural ile Patoloji Anabilim Dalı teknisyenlerinden Kezban Bostaner'e çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında bana laboratuvarlarında ileri eğitim, çalışma ve deneyim kazanma imkanı tanıyan, Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörovasküler Cerrahi Anabilim Dalı Başkanı, Nöroşirurji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Nörogenetik Laboratuvarları Direktörü, Prof. Dr. Murat Günel'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamımın her alanında olduğu gibi, doktora eğitimim ve çalışmalarım sırasında da beni her zaman yüreklendiren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, sevgili anne ve babama ve biricik kardeşime, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Arş. Gör. Leman SENCAR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY ii

TEŞEKKÜR iii

İÇİNDEKİLER iv

ŞEKİLLER DİZİNİ vi

SİMGELER VE KISALTMALAR x

ÖZET xii

ABSTRACT xiv

1.GİRİŞ 1

2.GENEL BİLGİLER 3

2.1. Spinal Kord Yaralanmalarında Primer ve Sekonder Hasar Mekanizmaları 3

2.2. Metilprednizolon Tedavisi 7

2.3. Nörotropik Faktörler 12

2.4. Spinal Kord Hasarında Kök Hücrelerin Kullanımı 14

2.5. Enflamatuvar Cevaplar ve Sitokinlerin Rolü 15

2.6. Tümör Nekroz Faktör Alfa 19

2.7. İnterlökin-6 22

2.8. Minosiklin Tedavisi 24

3.GEREÇ VE YÖNTEM 26

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması 26

3.2. Operasyon 26

3.3. Tedavinin Uygulanması 26

3.4. Biyopsilerin Alınması 27

3.5. Işık Mikroskobi Yöntemleri 27

3.6. İmmunohistokimya Yöntemleri 27

3.7. Elektron Mikroskobi Yöntemleri 28

3.8. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri 30

3.8.1. Malondialdehit Analizi 30

3.8.2. Süperoksit Dismutaz Analizi 30
3.9. İstatistik 31
4.BULGULAR 32
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular 32
4.1.1. Kontrol Grubu 32
4.1.2. Sham Operasyon Grubu 35
4.1.3. Deney Kontrol Grubu 38
4.1.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup 42
4.1.5. Minosiklin Tedavisi Uygulanan Grup 46
4.1.6. Metilprednizolon+Minosiklin Kombine Tedavi Grubu 50
4.2. Elektron Mikroskobik Bulgular 54
4.2.1. Kontrol Grubu 54
4.2.2. Sham Operasyon Grubu 57
4.2.3. Deney Kontrol Grubu 60
4.2.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup 66
4.2.5. Minosiklin Tedavisi Uygulanan Grup 71
4.2.6. Metilprednizolon+Minosiklin Kombine Tedavi Grubu 76
4.3. İmmunohistokimya Bulguları 81
4.3.1. Kontrol Grubu 85
4.3.2. Sham Operasyon Grubu 87
4.3.3. Deney Kontrol Grubu 90
4.3.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup 96
4.3.5. Minosiklin Tedavisi Uygulanan Grup 101
4.3.6. Metilprednizolon+Minosiklin Kombine Tedavi Grubu 107
4.4. Biyokimyasal Bulgular 111
5. TARTIŞMA 115
6. SONUÇLAR 126
KAYNAKLAR 130
ÖZGEÇMİŞ 142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Travma sonrası spinal kordda nekrotik ve apoptotik hücre ölüm süreçleri. 17
Şekil 2: Spinal kord hasarından sonra gelişen immun/enflamatuvar reaksiyonlar. 17
Şekil 3: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 33
Şekil 4: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 34
Şekil 5: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin 36
Şekil 6: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 37
Şekil 7: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 39
Şekil 8: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 40
Şekil 9: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver-Barrera. 41
Şekil 10: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 43
Şekil 11: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan ait spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 44
Şekil 12: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 45
Şekil 13: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 47
Şekil 14: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 48
Şekil 15: Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık

mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 49
Şekil 16: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 51
Şekil 17: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. 52
Şekil 18: Metilprednizolon+ minosiklin kombine tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. 53
Şekil 19: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 55
Şekil 20: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 56
Şekil 21: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 58
Şekil 22: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 59
Şekil 23: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 61
Şekil 24: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 62
Şekil 25: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 63
Şekil 26: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 64
Şekil 27: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 65
Şekil 28: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 67
Şekil 29: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 68
Şekil 30: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun

elektron mikroskobik görünümü. 69
Şekil 31: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 70
Şekil 32: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 72
Şekil 33: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 73
Şekil 34: Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 74
Şekil 35: Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 75
Şekil 36: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 77
Şekil 37: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. 78
Şekil 38: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görüntüsü. 79
Şekil 39: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görüntüsü. 80
Şekil 40: Pozitif kontrolde TNF-α immunoreaktivitesi. 81
Şekil 41: Negatif kontrolde TNF-α immunoreaktivitesi. 82
Şekil 42: Pozitif kontrolde IL-6 immunoreaktivitesi. 83
Şekil 43: Negatif kontrolde IL-6 immunoreaktivitesi. 84
Şekil 44: Kontrol grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 85
Şekil 45: Kontrol grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 86
Şekil 46: Sham operasyon grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 87
Şekil 47: Sham operasyon grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 88
Şekil 48: Sham operasyon grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 89
Şekil 49: Deney kontrol grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 91
Şekil 50: Deney kontrol grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 92
Şekil 51: Deney kontrol grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 94
Şekil 52: Deney kontrol grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 95

Şekil 53: Metilprednizolon grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 97
Şekil 54: Metilprednizolon grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 98
Şekil 55: Metilprednizolon grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 99
Şekiş 56: Metilprednizolon grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 100
Şekil 57: Minosiklin grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 102
Şekil 58: Minosiklin grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 103
Şekil 59: Minosiklin grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 104
Şekil 60: Minosiklin grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 105
Şekil 61: Metilprednizolon+minosiklin grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 107
Şekil 62: Metilprednizolon+minosiklin grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. 108
Şekil 63: Metilprednizolon+minosiklin grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 109
Şekil 64: Metilprednizolon+minosiklin grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. 110
Şekil 65: Bütün gruplarda 24. saatte malondialdehit (MDA) seviyeleri. 112
Şekil 66: Bütün gruplarda 72. saatte malondialdehit (MDA) seviyeleri. 112
Şekil 67: Bütün gruplarda 24. saatte süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri. 114
Şekil 68: Bütün gruplarda 72. saatte süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri. 114

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPA : 2-amino-3 (3 hidroksi-5 metil-izoksazol 4) Propanoik asit
BCL-2 : B hücreli lenfoma 2
BDNF : Beyin kökenli sinir büyüme faktörü
BMSC : Kemik iliği kökenli kök hücre
CINC-1 : Sitokinle uyarılan nötrofil kemoatraktantı
CNTF : Silyar kökenli sinir büyüme faktörü
COX-2 : Siklooksijenaz-2
EKH : Embriyonik kök hücre
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
FK-506 : Takrolimus
GDNF : Gliya kökenli sinir büyüme faktörü
GK-11 : Gacyclidine
ICAM : İntersellüler hücre adhezyon molekülü
IL-1β : İnterlökin 1 beta
IL-6 : İnterlökin-6
IL-10 : İnterlökin-10
i NOS : Inducible nitrik oksit sentaz
LIF : Lösemi inhibitör faktör
MDA : Malondialdehit
MK 801 : Dizocilpine (NMDA reseptör antagonisti)
MP : Metilprednizolon
MR16-1 : Anti-mouse IL-6 reseptör antikoru
MSC : Mezenkimal kök hücre
MSS : Merkezi sinir sistemi
NASCIS : Amerikan ulusal akut spinal kord hasarları çalışma grubu
NFkβ : Nüklear faktör kappa β
NGF : Sinir büyüme faktörü
NMDA : N-metil-D-aspartik asit

NO : Nitrik oksit

NSPC : Nöral kök/progenitör hücre

NT-3 : Nörotropin-3

NT-4 : Nörotropin-4

NT-5 : Nörotropin-5

ONOO : Peroksinitrit

PECAM : Platelet endotelyal hücre adhezyon molekülü

ROS : Reaktif oksijen türleri

SKH : Spinal kord hasarı

SOD : Süperoksit dismutaz

TGF : Transforming growth factor

TNF-α : Tümör nekroz faktör alfa

µg : Mikrogram

µm : Mikrometre

U/g prot : Unit/gram protein

VCAM : Vasküler endotel hücre adhezyon molekülü

ÖZET

Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Tümör Nekroz Faktör Alfa Ve İnterlökin-6 Ekspresyonuna Minosiklin Ve Metilprednizolon Kombine Tedavisinin Etkileri

Spinal kord yaralanması (SKH), direkt mekanik travmaya bağlı olarak nöral dokunun zedelenmesi ile sonuçlanan primer yaralanma ve bunun tetiklediği sekonder hasar mekanizmalarını içerir. SKH'nı takiben ilk 24 saatte, TNF-α ve IL-6 gibi proenflamatuvar mediyatörler lezyon alanında yükselmekte ve sekonder hasarlardan sorumlu tutulmaktadırlar. Günümüzde önemli bir sağlık problemi olan SKH'nın bugün için kabul edilen üniversal bir tedavisi olmamakla birlikte, bir glukokortikoid olan metilprednizolon (MP), antienflamatuvar ve antiödematöz etkilerinden dolayı tedavide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte metilprednizolon tedavisinin tek başına yeterli olmadığı ve etki mekanizmalarının da hala tam olarak açıklığa kavuşmadığı bilinmektedir. Son yıllarda, tetrasiklin türevi bir antibiyotik olan minosiklinin MSS yaralanmalarında nöroprotektif etkiye sahip olduğu rapor edilmiş olmakla birlikte, minosiklinin koruyucu etkileri ile ilgili çalışmalar da sınırlı sayıdadır. SKH'nı takiben sekonder hasarın ilerlemesine neden olan TNF-α ve IL-6 sitokin ekspresyonlarının, hücresel dağılımı ve lezyon alanında ortaya çıkış sürelerinin birlikte gösterildiği bir çalışmaya bugüne kadar literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, deneysel spinal kord yaralanması sonrası TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarına, MP ve minosiklin tedavisinin tek başına ve kombine etkilerinin, immünohistokimyasal, elektron mikroskobik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 78 adet Wistar cinsi erkek sıçan, herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan kontrol grubu, spinal kord T2-T7 segmentleri arasında yalnızca laminektomi oluşturulan sham operasyon grubu ve T2-T7 arasında klip kompresyon yöntemi ile SKH oluşturulan deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. SKH'nı takiben deney grubunda yer alan hayvanlar da kendi aralarında; spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra yalnızca serum fizyolojik verilen deney kontrol grubu; spinal kord hasarını takiben MP tedavisi uygulanan grup; minosiklin tedavisi uygulanan grup ve MP+minosiklin kombine tedavisi uygulanan grup olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Tüm sham ve deney gruplarından spinal kord doku örnekleri yaralanmayı takiben 24. ve 72. saatlerde elde edilerek, ışık ve elektron mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirildi.

Değerlendirmeler sonucunda, TNF-α ekspresyonunun, 24. saatte deney kontrol grubunda yükseldiği, MP tedavisi alan grup ile kombine tedavi alan gruplarda anlamlı olarak azaldığı belirlendi. IL-6 ekspresyonun, 24. saatte deney kontrol grubunda yükseldiği, kombine tedavi alan grupta anlamlı olarak azaldığı gösterildi. Yaralanmadan 72 saat sonra bütün gruplarda her iki sitokinin ekspresyonunun azalmış olduğu dikkati çekti. Işık ve elektron mikroskobik

incelemelerde, SKH oluşturulan gruplarda, nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde yapısal dejenerasyonların meydana geldiği ve bu hücresel değişikliklerin, 72 saat sonra alınan doku kesitlerinde daha belirgin olduğu gözlendi. Tedavi gruplarında, travma sonrası tek başına MP tedavisinin, Minosiklin tedavisine göre daha etkin olduğu, ancak, MP+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruplarda, hücresel yapının, tüm gruplara oranla çok daha iyi korunduğu belirlendi. Bunların yanında, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeyinin, MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda, diğer tüm gruplara oranla anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti. SOD seviyesinin ise, MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda, diğer gruplara oranla anlamlı olarak arttığı gösterildi.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel akut spinal kord yaralanmasından sonra MP+Minosiklin kombine tedavisinin, yaralanma sonrasında artış gösteren proenflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-6 düzeyleri ile lipid peroksidasyonunu azalttığı, böylece nöronal ve glial hücre ölümünü engelleyerek fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabileceği düşünüldü. Bu nedenle, akut spinal kord yaralanmasını takiben MP+Minosiklin kombine tedavisinin, oluşturulacak tedavi protokollerinde dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Spinal kord yaralanması, metilprednizolon, minosiklin, TNF-α, IL-6, ultrastrüktür.

ABSTRACT

Effects Of Combined Treatment Of Minocycline And Methylprednisolone On The Expression Of Tumor Necrosis Factor Alpha And Interleukine-6 In Experimental Spinal Cord Injury

Spinal cord injury (SCI) includes primary injury that is resulted in neural tissue damage due to the direct mechanical trauma, and secondary injury mechanisms which are induced by primary injury. In the first 24 hours following SCI, pro-enflammatory mediators such as TNF-α and IL-6 increase at the lesion site and play important role in secondary tissue damage. SCI is an important health problem and there is no universal treatment protocol for it today. MP is an important glucocorticoid and it has been using for the treatment of SCI because of its anti-inflammatory effects. However, MP is not effective alone for the treatment of SCI and it's mechanisms and beneficial effects are not clear. In recent years it has been reported that minocycline which is a tetracycline-derived antibiotic has neuroprotective effects on central nervous system trauma. But there are limited studies on minocycline's effects on SCI. Furthermore, there is no research on the cellular distrubition and localization of TNF-α and IL-6 after SCI.

Seventy eight wistar rats were divided into 3 main groups as intact control group; they did not receive any operation, sham operation group; we created laminectomy on T2-T7 levels of spinal cord, and experimental control group received spinal cord compression injury. Following injury the experimental control group subdivided into 4 groups as: control group, which did not receive any drug administration, methylprednisolone treatment group; they received MP following injury, minocycline treatment group; they received minocycline following injury and, MP+Minocycline combined treatment group; a combination of MP and minocycline were administered to these rats.

Tissue samples were obtained from all groups at 24 hours and 72 hours after injury for light and electron microscopic, immunohistochemical and biochemical examinations. We found an increase in TNF-α levels in experimental control group at 24th hour. We also found that there were a significant decrease in TNF-α expressions in MP treatment group and MP+minocycline combined treatment group at 24 hours after injury. We observed an increase on IL-6 levels at 24th hour in experimental control group, on the other hand, in combined treatment group there were a significant decrease in IL-6 levels at the same time. It was remarkable that both cytokine's levels were decreased in all groups at 72 hours after injury. We found structural degenerations in neurons, glia cells and axons in the SCI groups of the light and electron microscopic examinations. We also found that MP was more effective than minocycline when we compared the treatment groups. However, the ultrastructure of the cells were well preserved in MP+Minocycline combined treatment group when compared with other injury groups. Furthermore when we compared all the groups, in combined treatment

group there were a significant decrease in MDA levels which is an important indicator for lipid peroxidation, on the other hand, there were a significant increase in SOD levels in the same group.

When all results are evaluated together, we found the combined treatment of MP and minocycline gives rise to a significant decrease in proinflammatory cytokines levels, which upregulate after injury. We also observed decreased lipid peroxidation and neuronal and glial cell death in this group. These results suggest that this combined treatment promotes functional recovery and, it should be considered as an effective treatment protocol following spinal cord injury.

Keywords: Spinal cord injury, methylprednisolone, minocycline, TNF-α, IL-6, ultrastructure.

1. GİRİŞ

Günümüze kadar spinal kord hasarı (SKH) üzerine pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, akut spinal kord yaralanması sonrası gelişen sekonder hasara neden olan olaylar zinciri hala tam olarak açık değildir. Şiddetli SKH geçiren hastalarda nörolojik prognozu tahmin etmek oldukça güçtür[1]. SKH, ülkemizde ve dünyada oldukça yaygın olarak karşımıza çıkan önemli bir sağlık sorunudur. Travmatik SKH, özellikle genç hastalarda, major ölüm nedenlerinden birisidir[2]. SKH'na neden olan etkenlerin başında, motorlu araç kazaları, spor yaralanmaları, iş ve ev kazaları yer almaktadır. Bu hastaların büyük çoğunluğu genç hastalardır. Her bir hastanın maliyetinin çok yüksek olması, SKH'nın ekonomik boyut açısından da önemli bir problem olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan olayın sosyal yanı da büyük bir sorundur[1,3].

Spinal kord yaralanması sonrası primer mekanik hasarın oluştuğu ve bunu takiben sekonder doku cevaplarının meydana geldiği bilinmektedir[4,5]. SKH'ından sonra, IL-1, IL-6 ve TNF-α gibi, proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonları önemli ölçüde artmaktadır[6]. Bu sitokinler; astrosit ve mikrogliyaların aktivasyonlarını, proliferasyon ve migrasyonlarını arttırırlar ve sekonder hasar oluşumunda da önemli rollere sahiptirler. Bunların yanısıra serbest radikal üretimi, kompleman aktivasyonu vazoaktif aminlerin ve eicosanoidlerin üretimini de uyararak enflamasyon artışına neden olmaktadırlar[7].

SKH'nın fizyopatolojisinin anlaşılması, sekonder hasarın etkilerinin ortadan kaldırılmasına yönelik tedavi yaklaşımlarını da arttırmıştır. Pek çok çalışmada amaçlanan tedavinin hedefi SKH'nın akut fazına yöneliktir ve sekonder doku hasarını sınırlamayı amaçlar[8]. Bugün için SKH'nın kabul edilen üniversal bir tedavisi yoktur[1,9]. Bununla birlikte kortikosteroidler, SKH'ında antienflamatuvar ve ödem azaltıcı olarak yaklaşık 30 yıldan bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır[10]. Dolayısıyla günümüzde insanlarda, akut SKH'nın tedavisinde metilprednizolon (MP) ve türevleri, yegane tedavi edici ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. MP'nin etki mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, güçlü antiödematöz ve antienflamatuvar etkilerinin, tedavi sürecinde rol oynadığı kabul edilmektedir[11].

Diğer taraftan SKH'nın tedavisinde pek çok diğer ajanın da yararlı etkileri, gerek deneysel hayvan çalışmalarında ve gerekse de insan üzerine yapılan uygulamalarda geniş olarak rapor edilmiştir. Bu kapsamda deneysel spinal kord yaralanması modellerinde; glutamat reseptör ve iyon kanal antagonistleri[12,13], GDNF, BDNF, NGF gibi nörotropik faktörlerin tedavi amacıyla kullanıldıkları ve önemli nöroprotektif etkilere sahip oldukları gösterilmiştir[14,15]. Bunların dışında, yaralı spinal korda yerleştirilen periferik sinir graftları[16-19], kültürde üretilen Schwann hücrelerinin yaralanmış korda transplantasyonu[20] ile kök hücre transplantasyonlarının da[21,22] spinal kord hasarı üzerine iyileştirici etkilerinin olduğu rapor edilmiştir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda spinal kord yaralanması sonrasında, tetrasiklin türevi bir antibiyotik olan minosiklinin de intraperitoneal veya intravenöz yolla verildiğinde, nöroprotektif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir[23]. Minosiklinin, spinal kord hasarında mikrogliya ve makrofajları inhibe ederek, nöroprotektif etki gösterdiği ve yaralanma sonrası oluşan nöropatik ağrıyı azalttığı ileri sürülmüştür[24]. Bununla birlikte SKH'ında minosiklinin etkileri ile ilgili az sayıda çalışma vardır. Dolayısıyla minosiklinin etki mekanizmasının ileri çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir[25].

Diğer taraftan spinal kord yaralanmaları sonrasında metilprednizolon ve minosiklinin kombine tedavilerinin etkilerini gösteren bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Sekonder doku hasarının minimize edilmesi bugün için SKH'nin tedavisinde primer hedeftir. Sekonder hasar kapsamında ortama salınan sitokinlerin yararlı etkileri yanında, ortamda yüksek oranda, uzun süreli bulunmalarının doku hasarına neden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Akut SKH'nı takiben TNF-α ve IL-6 ekspresyonunun hücresel dağılımı ve lezyon alanında ortaya çıkış süreleri ve dağılımlarının birlikte gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Diğer yandan, SKH tedavisinde yaygın olarak kullanılan MP'nin sitokin salınımına olan etkisi de hala tam olarak açık değildir. Ayrıca, son yıllarda SKH tedavi protokollerinde yer alan minosiklinin de, sitokinlerle ilişkisi ve bu bağlamdaki etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar son derece sınırlıdır. Bu çalışmada, sıçanlarda klip kompresyon yöntemi ile oluşturulan akut spinal kord yaralanması sonrası, TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarına, MP ve minosiklin tedavilerinin tek başına ve kombine etkilerinin, ışık, elektron mikroskobik immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Yaralanmalarında Primer ve Sekonder Hasar Meknanizmaları

Akut spinal kord hasarı primer ve sekonder hasar mekanizmalarından oluşmaktadır[4,5]. Primer hasar; direkt mekanik travmaya bağlı olarak nöral dokunun zedelenmesini içerir. Başlangıçtaki mekanik travma, gerilme ve kompresyonu içermektedir. Hem periferal hem de merkezi sinir sisteminde kırılmış, yer değiştirmiş kemik fragmentleri, disk materyalleri ve ligament yaralanmaları nöral elemanların direkt kompresyonuna neden olur. Kan damarları hasarlanır, aksonların yapısı bozulur ve nöral hücre membranları zarar görür. Gri cevherde dakikalar içerisinde mikrohemorajiler meydana gelir ve ilerleyen birkaç saat içinde de bu kanamalar radiyal ve aksiyal olarak yayılır. Spinal kord, dakikalar içerisinde şişer ve yaralanma seviyesinde spinal kanalın tüm çapını işgal eder. Kordun şişmesi venöz kan basıncını aştığında sekonder iskemi oluşur. Kan akımı otoregülasyonunun bozulması ve spinal nörojenik şok, sistemik hipotansiyona neden olur ve sonuçta ortaya çıkan iskemi daha da şiddetlenir. İskemi, bozulmuş nöral membranlardan salınan toksik kimyasallar ve elektrolit düzeyinde meydana gelen değişiklikler, sekonder yaralanma kaskadını başlatmaktadır[26-28]. Sekonder hasar dalgasının hızla yayılması ve yaralanma mekanizmalarının tetiklenmesi ile birlikte, iskemiyi içeren vasküler bozukluklar, otoregülasyon kaybı, nörojenik şok, hemoraji, mikrosirkülasyon kaybı, vazospazm ve tromboz oluşmaktadır[5, 29]. Ayrıca, hücre içi Ca^{++} artışı, ekstraselüler potasyum artışı ve intraselüler sodyum birikimi[30], serotonin, kateşolamin ve ekstraselüler glutamat[31], araşidonik asit salınımı, eicasanoid ve serbest radikal artışı ve lipid peroksidasyonu[32], endojen opiyatlarda artış[33], ödem[34], enflamasyon[35], ATP'ye bağlı enerji metabolizmasında kayıp[36] ve apopitoz[3, 37] meydana gelmektedir. Bunların yanında, akut spinal kord hasarı sonrasında, aksonal ve nöronal nekroz, miyelin kaybı, kavitasyon oluşumu ve infarkt gelişimi gözlenir. İlk 15 dakika içerisinde, gri cevherde kanama ve beyaz cevherde ödem ortaya çıkar, 2. saatte kanama artar ve 4. saatte pek çok aksonda şişme görülmektedir[4]. Diğer taraftan, SKH oldukça belirgin glutamat eksitotoksisitesine de neden olur, bunun sonucunda nöronal dendritler hasarlanır ve daha sonra da, nöron

ölümü gerçekleşir[38]. Sinir liflerinde miyelin kılıf hasarı belirgindir, özellikle büyük çaplı miyelinli sinir lifleri travmadan daha fazla etkilenmektedir[39]. Bunun dışında, yaralanmayı takiben miyelinli aksonların, miyelinsizlere göre daha fazla etkilendiği, klip kompresyon metodunda, beyaz cevherde yer alan sinir liflerinin çok daha fazla hasarlandığı rapor edilmiştir[3].

Akut SKH'ında, hem nekroz hem de apopitozu içeren, hücresel süreçler meydana gelmektedir[40]. Her iki hücre ölüm şekli de iskemi, oksidatif stres ve eksitotoksisite gibi hasarlarla indüklenmektedir. Yaralanmanın çok şiddetli olduğu hallerde, hücreler daha çok nekroza gitmektedir[41,42]. Oligodendrositler, SKH'nı takiben apopitotik hücre ölümüne hassas hale gelmekte ve apopitotik sürecin uyarılması ile birlikte Fas ve p75 gibi, reseptör ekspresyonu göstermektedirler[9]. Oligodendrositlerin ölümü aksonlarda demiyelinizasyon ile sonuçlanmakta ve bu durum distal nörolojik fonksiyon kaybına sebep olmaktadır[43]. Apopitoz, SKH'ından sonra gelişen sekonder hasarın önemli bir düzenleyicisidir[9]. Apopitoz, etkisini iki fazda gösterir, başlangıç fazına genellikle nekroz da eşlik etmektedir. Geç faz ise en çok beyaz cevherde görülmekte, daha çok oligodendrosit ve mikrogliaları içermektedir[44]. Apopitoz lezyon bölgesinde, yaralanmadan sonraki ilk 6 saat içinde başlar ve bir kaç gün sonra da bu alanda çok sayıda apopitotik hücre görülür. İzleyen günlerde, kor bölgesinde apopitotik hücreler azalır, buna karşın primer yaralanma alanından uzakta apopitotik hücre ölümü artmaktadır. Bu yeni apopitotik dalga, daha çok beyaz cevherde lokalizedir ve yayılımı lezyon merkezinden oldukça uzak alanlara da ulaşabilmektedir[45]. SKH'nı takiben gelişen iskemi ve eksitotoksisite gibi hallerde, apopitoz, dominant dejeneratif süreç olan nekroz gibi akut hücre ölüm mekanizması haline de gelebilir[3,46].

Başlangıçtaki travmadan günler veya haftalar sonra dahi görülen apopitozun, oligodendrositlere kadar yayılması[44], belki de apopitoz inhibitörü ilaç kullanımının spinal kord travmalarından sonra yeni bir strateji olarak karşımıza çıkabileceğini düşündürmektedir[28,47]. Apopitozun kaspazları aktive ettiği bilinmektedir. Yaralanma alanından çok uzakta, özellikle aksonların etkilendiği bölgelerde, oligodendrositlerin apopitoza gitmeleri demiyelinizasyon ile ilişkilendirilmiştir[44,48]. Bununla birlikte, bunu indükleyen sinyalin ne olduğu bilinmemektedir. Beyaz cevher traktuslarında ölen oligodendrositler ile direkt ilişkili çok sayıda mikroglia rapor edilmiştir[48]. Bu mikroglialar, muhtemelen hücre ölümünü düzenleyen mediatörleri salgıladıkları gibi,

aynı zamanda oligodendrosit ölümünden sonra ortaya çıkan hücre artıklarını da fagosite etmektedirler. Aktif mikrogliaların TNF-α ve IL-1β eksprese edebildiği bilinmektedir. Diğer taraftan oligodendrositler, AMPA reseptörleri tarafından düzenlenen eksitotoksik hücre ölümüne de oldukça hassastır[49]. Belki de uzun süreli apopitotik hücre ölümünde, TNF-α ve glutamat reseptörleri arasında güçlü bir etkileşim mevcuttur[40].

Primer yaralanmanın indüklediği sekonder hasarlar, temel olarak travma ve iskemi sonucunda meydana gelen patolojik değişikliklerdir[5,50]. Yaralanmadan sonra gri cevherde oluşan hipoperfüzyon, gri cevheri çevreleyen beyaz cevhere ulaşır[29]. Hipoperfüzyon, aksiyon potansiyelinin akson boyunca yayılmasını engeller ve spinal şoka yol açar[30,31]. Sekonder yaralanma sonucu oluşan hasarlı hücreler, aksonlar ve kan damarları toksik kimyasallar salgılar ve ortamda biriken bu ajanlar, sağlam komşu hücrelere de zarar verirler. Sekonder hasarı uyaran anahtar moleküllerden biri de glutamat aminoasitidir. MSS travmalarından hemen sonra, yaralanma bölgesinde, ekstrasellüler olarak toksik düzeyde glutamat artışı görülmektedir[51-54].

Glutamat, kimyasal eksitotoksisite adı verilen yüksek derecede zararlı önemli bir süreçte rol oynar. Sağlıklı spinal korda, birçok aksonun uç bölgelerinden de az miktarda glutamat salgılandığı bilinmektedir. Ortama salınan glutamat, hedef nörondaki reseptörüne bağlanır ve hedef hücrelerde impuls iletimi gerçekleşir. Bunun tersine, yaralı spinal kord nöronları, aksonları ve astrositlerinden salgılanan glutamat miktarının çok yüksek olduğu gösterilmiştir. Yüksek oranda bulunan glutamat, komşu hücrelerin aşırı uyarımına sebep olur. Bu durum kalsiyum iyonlarının salınmasına ve serbest radikal üretimi gibi, bir seri hasar verici ve yıkıcı olayı başlatmaktadır. Yüksek derecede aktive olmuş bu moleküller, hücre membranlarına ve diğer hücre komponentlerine zarar vererek, sağlıklı nöronların ölümüne sebep olmaktadır. Eksitotoksisitenin başlangıçta yalnızca nöronları etkilediği kabul edilmiş olmasına rağmen, daha sonraki çalışmalarda, oligodendrositlerin de bu durumdan ciddi oranda etkilendikleri açığa çıkarılmıştır[49,55]. Glutamat reseptörleri, AMPA olarak adlandırılırlar ve oligodendrosit hasarında çok önemli rollere sahiptirler. Gerçekten de bu durum SKH sonrası hasarlı aksonların neden demiyelinize hale geldiklerini ve impuls iletiminin bozulmasını açıklamaktadır[28]. SKH'nı takiben oluşan eksitotoksik hücre ölümü, sonuçta glia hücrelerini ve özellikle de oligodendrositleri belirgin olarak etkilemektedir[49]. Glia hücreleri, NMDA reseptörlerinden yoksun olduğundan[56] bu hücrelerdeki eksitotoksisite, AMPA ve kainat

reseptörleri yoluyla meydana gelmektedir. Dolayısıyla hem AMPA hem de kainat reseptörlerinin diferansiye olmuş oligodendrositlerde bulunması, nöronlara göre bu hücreleri, kalsiyum iyonuna daha geçirgen hale getirmektedir. Bu durum oligodendrositlerin eksitotoksik hücre ölümüne daha hassas olmalarını açıklayan önemli bir neden olarak kabul edilmektedir[3].

Özellikle hipoksik çevrede, ekstraselüler glutamat miktarının aşırı yükselmesi[57] iyonotropik glutamat reseptörleri olan, NMDA, AMPA ve kaninat reseptörlerinin yüksek oranda uyarımına sebep olmakta ve bu durum eksitotoksik hücre ölümü dalgasını başlatmaktadır[58]. Nöronlarda, glutamat, AMPA reseptörüne bağlanmakta ve depolarizasyonu başlatmaktadır. Bu durum, voltaj bağımlı sodyum kanallarını aktive etmekte ve depolarizasyon sonucunda da intrasellüler sodyum miktarında artışa neden olmaktadır. Bu cevabın kronikleşmesi, NMDA reseptörlerinin ekspresyonunu arttırmakta ve sonuçta oluşan reseptörler de glutamat tarafından aktive edilmekte ve buna bağlı olarak da, intraselüler sodyum seviyesinde artış sürmektedir. İntrasellüler iyonik dengesizlik, klor iyonlarının girişini tetiklemektedir. Bütün bu olaylar sonunda hücrenin osmotik dengesi bozulur ve hücre içerisine su girişi gerçekleşir ve sonuçta da hücrede litik değişiklikler meydana gelir[3,58].

Spinal kord yaralanmasının akut patofizyolojisinde, lipid peroksidasyonunun hipoperfüzyonun başlangıç periyodunda, hatta bundan daha da önemli olarak, reperfüzyon periyodunda da rol oynadığı rapor edilmiştir[59]. Malondialdehit gibi, bu oksidatif reaksiyonların ürünleri, spinal kord yaralanmasından sonra hızla artmaktadır[60]. Serbest radikaller, çiftlenmemiş elektronlara sahip moleküllerdir ve bu durum onları lipidlere, protein ve DNA'ya karşı yüksek derecede reaktif yapmaktadır. Moleküler oksijenin (O_2) kendisi de iki çiftlenmemiş elektrona sahiptir. Oksijene bir elektron eklenmesi, süperoksiti üretir, iki elektron hidrojen peroksiti ve üç elektron yüksek derecede reaktif hidroksil radikalinin oluşumuna neden olmaktadır. Bu serbest radikal oluşumu serbest ya da proteine bağlı demir tarafından katalize edilebilir. Diğer bir yüksek derecede reaktif serbest radikal peroksinitrittir ($ONOO^-$) ve süperoksit ile NO arası etkileşim ile oluşmaktadır. Ortaya çıkan serbest radikaller, hücre membranlarındaki yağ asitlerinin ilerleyici oksidasyonuna-lipid peroksidasyonuna neden olurlar ve bu oksidasyon süreci, daha çok serbest radikal oluşumunu tetikler ve hücre yüzeyinde reaksiyonun yayılmasına yol açar[61]. Oluşan bu oksidatif stres,

mitokondriyal solunum zinciri enzimlerini etkisiz hale getirmekte, DNA'yı ve DNA ile ilişkili proteinleri değiştirebilir ve sodyum-potasyum ATP'azı inhibe eder ve böylece metabolik bozulma artarak devam eder, sonuçta da nekrotik ve apoptotik hücre ölümleri meydana gelir[43,62]. SKH'nı takiben ilk bir kaç gün içinde spinal kord doku reperfüzyonu hücresel hasarı oldukça arttırır. İskemi süresince endotelyal hücrelerdeki ksantin dehidrogenaz proteolizise sebep olur. Diğer bir enzim olan ksantin oksidaz normalden farklı olarak, elektronları moleküler oksijene transfer eder. Endotel hücrelerinin aşırı oksijene maruz kalması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ortaya çıkmasına neden olan enzimatik reaksiyonlara yol açar[63]. Ortaya çıkan yüksek orandaki reaktif oksijen türleri nekrotik hücreler[64] ve nötrofillerdeki ROS'la birlikte[65] hücre ölümü için çok güçlü bir uyarı oluşturmaktadır. ROS, merkezi sinir sistemi hücrelerinde lipid, protein ve nükleik asitleri etkileyerek hücresel hasarı indükleyebilir. Serbest radikaller, plazma membranı ve organel membranlarında doymamış yağ asitlerinin çift bağlarına saldırarak lipid peroksidasyonuna yol açar[3].

2.2. Metilprednizolon (MP) Tedavisi:

SKH'nın fizyopatolojisinin anlaşılması, sekonder hasarın etkilerinin ortada kaldırılmasına yönelik tedavi yaklaşımlarını da arttırmıştır. Pek çok çalışmada amaçlanan tedavinin hedefi SKH'nın akut fazına yöneliktir ve sekonder doku hasarını sınırlamayı amaçlar[8]. Sekonder doku hasarı engellenebilir ve muhtemelen de geri dönüşümlüdür[1]. SKH'ından sonra tedavi stratejileri 2 noktaya odaklanmıştır: Bunlardan ilki, koruyucu tedavi protokolleri kullanılarak sekonder hasar oluşumunun sınırlandırılmasıdır. Diğeri ise, rejeneratif ve onarıcı stratejilerin geliştirilmesi ve kayıp dokunun yerine, yeni doku yapımının uyarılması, kaybolmuş fonksiyon ve bağlantıların yeniden oluşturulmasıdır[66]. Bugün için SKH'nın kabul edilen üniversal bir tedavisi yoktur[1,9]. Kortikosteroidler, SKH'da, antienflamatuvar ve ödem azaltıcı olarak, 30 yıldan buyana kullanılmaktadır[10]. Bununla birlikte, steroidlerin nöroprotektif etkilerinin mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir, ancak lipid peroksidasyonunu ve enflamatuvar sitokinleri inhibe ettikleri, enflamatuvar ve immün hücreleri modüle ettikleri, vasküler perfüzyonu iyileştirdikleri, kalsiyum girişi ve birikimini engelledikleri yaygın olarak kabul edilmektedir. Steroidlerin özellikle lipid peroksidasyonu üzerine olan etkileri çok çarpıcıdır, bu anlamda, Metilprednizolon (MP) yaygın olarak

kullanılmaktadır[43]. Yüksek doz intravenöz MP tedavisinin, ilk 8 saatte başlamak kaydı ile akut spinal kord hasarında kısmi nörolojik iyileşmeye neden olduğu rapor edilmiştir[67]. Günümüzde insanlarda, akut SKH'ında MP yegane tedavi edici ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, MP'nin etki mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. MP, diğer glukokortikoidler gibi antienflamatuvar etkiye sahiptir. Akut enflamasyon, hücresel ve hormonal olarak, kompleks olaylar zinciri olup, nötrofil infiltrasyonu, plaket birikimi, vasküler permeabilite artışı, ödem oluşumu ile karakterizedir. Eicosanoidler, serbest radikaller, kininler, proteolitik enzimler ve diğer enflamatuvar mediyatörler enflamasyonla ilişkilidir[11]. Glukokortikoidlerin antienflamatuvar etkileri bugüne kadar geniş olarak çalışılmıştır. Bu ajanlar, kemotaksisi ve lökosit göçünü inhibe ederek, fagositozu önleyerek, enflamatuvar mediyatör sentezini baskılayarak ve lizozomal enzimlerin sentezini durdurarak, enflamasyonu engellemektedirler. Steroidler, travma sonucu uyarılan serbest radikal hasarını da inhibe ederek, membranları stabilize etmektedirler[68]. Yüksek doz (30 mg/kg) intravenöz doz steroidin, lipid peroksidasyonunu azalttığı, ATP'azlar gibi, membran bağlı enzimleri koruduğu, nörofilamanlar gibi, hücre içi yapıları koruduğu, hasardan sonra oluşan laktik asit artışını azaltarak, yararlı etki gösterdiği rapor edilmiştir[69]. MP, lipid peroksidasyon ürünü araşidonik asit metabolizmasını da azaltmakta ve yaralanma alanında kan akımını iyileştirmektedir.

Amerikan ulusal akut spinal kord hasarları çalışma grubu (NASCIS), SKH'lı hastalar için ilk 8 saat içinde yüksek doz MP tedavisini tavsiye etmektedir[70], ilk 3 saatteki tedavi travmadan 3-8 saat sonraki tedaviye göre daha etkindir[71]. Bracken ve arkadaşları, SKH'ında, MP tedavisinin yararlı etkilerini bildirmişler[67], bu çalışmadan sonra da, intravenöz yüksek doz MP, akut SKH için standart tedavi yolu olarak uygulanmıştır[72]. Yapılan çalışmalarda, MP'nin bazı komplikasyonları da tanımlanmıştır[73]. Bununla birlikte, MP kullanımı ve sonuçları hakkında gerek deneysel[74], gerek klinik bulgular[75] halen oldukça tartışmalıdır ve elde edilen sonuçlar da birbiri ile tam örtüşmemektedir. MP'nin glukokortikoid olarak, makrofaj-mikroglial proliferasyonunu ve sitokin salınımını azaltması gibi, immünsupressif etkisi yaygın olarak kabul edilmektedir[76,77]. Bunun yanında, MP direkt veya indirekt olarak nöral progenitör hücreleri de etkilemektedir[78,79]. Kortikosteroidlerin hipokampal dentat giyrusta[80], beyin gri ve beyaz cevherinde, oligodendrosit yetişkin (adult) progenital

hücrelerin proliferasyonunu azalttığı rapor edilmiştir[81]. Bununla birlikte, MP günümüzde hala akut SKH'nın tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir[82,83]. Ancak, MP'nin etkilerinin hepsinin yararlı olup olmadığı, nörolojik iyileşme üzerine olan yetersizliği[84], nötralizan etkileri ile zararlı etkilerinin araştırılması gerekmektedir[43].

MP'nin major nöroprotektif etkisinin serbest oksijen radikallerini inhibe ederek lipid peroksidasyonunu engellemesi olduğuna inanılmaktadır[85]. Lipid peroksidasyonu, spinal kord yaralanması sonucunda erken dönemde meydana gelen sekonder bir bozulmadır[86]. Bunun yanı sıra, MP'nin, lipid hidrolizisini (araşidonik asit salınımını), eikosanoid oluşumunu inhibe ettiği, kan akımını koruduğu, nörofilaman yıkımını azalttığı, nöronal uyarılabilmeyi ve sinaptik transmisyonu arttırdığı ve güçlü antienflamatuvar etkiye sahip olduğu bilinmektedir[85,86]. MP, antienflamatuvar etkisini, glukokortikoid reseptörüne bağlanarak göstermektedir. SKH'ından sonra, MP, indüklenen kemotaksis[87] ve lizozomal enzim salınımı[88] gibi enflamatuvar yolları da inhibe etmektedir. Ayrıca, fosfolipaz A2'yi inhibe ederek, araşidonik asit kaskadı metabolitlerinin üretimini[89] ve böylece serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır[90]. Bunlara ek olarak MP, TNF-α ekspresyonu ve NFkβ aktivasyonunu baskılayarak enflamatuvar cevabın yoğunluğunu ve etki süresini de azaltmaktadır[91]. Bu etkiler ancak MP'nin uygun dozda verilmesiyle mümkündür. Özellikle SKH'ından sonra, 30 mg/kg MP dozu, efektif olarak kabul edilmektedir[92,93]. NASCIS 2'ye göre insanda spinal kord hasarından 8 saat sonra yüksek doz intravenöz MP tedavisi, duyu ve motor fonksiyonların geri dönüşümünü sağlamaktadır. Bartholdi ve Schwab, tek doz MP'nin, yaralanmadan 24 saat sonra nötrofil ve makrofajlar gibi periferal enflamatuvar hücrelerin invazyonunu azalttığını göstermişlerdir. Yaralanmadan kısa bir süre sonra enflamatuvar hücre sayısının azalmasından MP'nin sorumlu olduğu ve bu yolla MP'nin MSS hasarından sonra nöroprotektif etki gösterdiği kabul edilmektedir. SKH'nı takiben doku kaybının ana nedeni, iskemi, ödem ve serbest radikallerin indüklediği lipid peroksidasyonudur. MP, serbest radikal oluşumunu ve apoptotik hücre ölümünü azaltarak doku kaybını önlemektedir. MP ayrıca, makrofajlarda TNF-α ve NO sentezini de azaltmaktadır. Bunun yanında, mRNA destabilizasyonu yoluyla, lenfosit ve monositler için güçlü bir kemotaktik ve uyaran olan, makrofaj enflamatuvar protein 1-α ekspresyonunu da inhibe etmektedir. Diğer yandan yaralanmış olan spinal kord'da MP

tedavisinin, laktik asit, arginin ve eksitotoksik aminoasit seviyelerinde azalmaya neden olduğu bilinmektedir. MP tedavisi aynı zamanda, ödem kompozisyonunu değiştirerek, ödemin indüklediği damar tıkanıklığını da azaltmaktadır. Özellikle yaralı spinal kordda, kan akımının engellendiği lezyon bölgelerinde, MP'nin kan akımı üzerindeki onarıcı kapasitesi, doku kaybını azaltmaktadır. MP tedavisi, aksonal canlılık ve aksonal filizlenmeyi, nörofilamanların Ca^{++} bağımlı bozulmasını azaltarak yapmaktadır. MP, aksonlarda yaralanmayı takiben artan, aksonal büyüme ilerletici faktör ve FGF ile sinerjik etkiler göstermektedir. Ayrıca yaralanmadan 1 gün sonra MP'nin sıçanlarda makrofaj sayısını azalttığı, aynı etkiyi deney hayvanlarında 3 hafta sonra da gösterdiği bildirilmiştir. Yaralanmaya cevap olarak, makrofajlar dokuya yayılır ve mikroglialar ile birlikte hücre artıklarını ortadan kaldırır. Makrofaj sayısı yaralanmanın büyüklüğü ile ilgilidir. Yaralanma sonrası enflamatuvar mekanizmaların ilerleyici nekroza neden olduğu rapor edilmiştir. Makrofajların eksprese ettiği sitotoksik ajanlar, hücre artıklarını sindirmektedir, ancak, aynı zamanda bu ajanlar, normal hücrelerde de ölüme ve doku kaybına neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, MP'nin enflamatuvar hücreleri azalttığı gösterilmiştir. Makrofajlardaki bu azalmanın MP'nin indüklediği makrofaj toplanması ve proliferasyonunda önemli sitokinler olan TNF-α ve IL-1 azalmasından kaynaklandığı düşündürmektedir. Fagositik hücrelerin sayılarındaki aşırı yükselmenin engellenmesi, şüphesiz ki, spinal kord yaralanmalarından sonra sinir doku kaybını önleyecektir[94].

SKH'nın tedavisinde, MP dışında pek çok ajan tek başına ve kombine tedavi protokolleri ile kullanılmıştır. Gangliozidler (GM), MSS'de hücre membranlarının dış yüzeyinden eksprese olan sialik asit içeren glikosfingolipidlerdir. GM'in sistemik olarak verilmesinin, deneysel MSS yaralanma modellerinde nöroprotektif etkilere yol açtığı ve bu etkisini, akson büyümesini ve plastisiteyi arttırarak, eksitotoksisite ve apopitozu inhibe ederek yaptığı rapor edilmiştir[95,96].

SKH sonrasında, belirgin bir endojen opioid peptid lokal salınımı olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Opioidlerin, eksitoksik aminoasit salınımını artırdığı ve zararlı etkilerini eksitatör aminoasitler üzerinden yaptığı gösterilmiştir. SKH'ında salınan opioidlerin ortadan kaldırılmasında nonspesifik opioid reseptör antagonisti naloxone yoğun olarak çalışılmış ve naloxone'ın deneysel çalışmalarda spinal şoku tersine döndürdüğü, spinal kan akımını düzelttiği, fonksiyonel ve elektrofizyolojik

iyileşmeye neden olduğu rapor edilmiştir[97,98]. Nitekim NASCIS 2'nin 3 tedavi yönteminden biri olarak kabul edilmiştir. Naloxone'ın kısmi SKH'lı hastalarda hem motor hem de duyu iyileşmesine neden olduğu gösterilmiştir[70].

Bunların yanında SKH tedavisinde glutamat reseptör ve iyon kanal antagonistlerinin etkileri de araştırılmıştır. MK801 ve Gacyclidine (GK11) gibi, NMDA reseptör antagonistlerinin, SKH oluşturulan deneysel modellerde, önemli nöroprotektif etkilere sahip oldukları gösterilmiştir[12,13]. Kalsiyum kanal blokerleri, hücreler içerisine aşırı kalsiyum girişini önlemektedir. Kalsiyum kanal blokerlerinin bu etkisi, nöronal ve glial hücre membranlarında, kalsiyum akışını değiştirmekten daha çok, vasküler düz kaslar üzerine olan farmakolojik etkileri ile yapmaktadırlar. Örneğin, nimodipine'nin spinal kord kan akımını arttırdığı ve hipoperfüzyonu tersine çevirdiği deneysel SKH modelinde gösterilmiştir[99,100]. Sodyum kanal blokeri olan tetradotoxinin, lokal mikroenjeksiyonu deneysel SKH'ından sonra fonksiyonel geri dönüşleri arttırmış ve beyaz cevherde önemli oranda nöroprotektif etkiler göstermiştir[101,102]. Aynı şekilde, bir diğer sodyum kanal blokeri olan riluzole'ün de nöroprotektif etkileri rapor edilmiştir[103].

Diğer yandan, cyclooxygenase inhibitorleri olan ibuprofen ve meclofenamate, deneysel SKH modelinde kan akımını düzenleyen ve yaygın kullanılan non-steroidal antienflamatuvar ajanlardır[104]. COX-2 ekspresyonunun sıçan spinal kord yaralanmasından sonra arttığı gösterilmiştir. Bunu engellemek amacıyla, farmakolojik bir COX-2 inhibitörü kullanılarak, fonksiyonel geri dönüşlerin arttırılabileceği kaydedilmiştir[105,106]. Bunların yanında, immun baskılayıcılar olan; FK-506, siklosporin ve eritropoietinin de, SKH tedavisinde kullanılması önerilmiştir. FK-506 ve siklosporin, periferik sinir yaralanmalarında, iyileştirici etkilere sahip immün baskılayıcılardır[107,108]. Siklosporinler, beyin ve spinal kord yaralanmalarında mitokondrial membrana etki ederek, apopitozu önlemekte ve lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir[109,110]. Bunların yanı sıra, FK-506, MSS'de aksonal rejenerasyonu ilerletmekte ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırmaktadır[111,112]. Eritropoietinin antienflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik özellikleri olduğu düşünülmektedir[113,114]. Yapılan çalışmalarda eritropoietinin, deneysel spinal kord yaralanmasından sonra oluşturulan iskemi modelinde, motor nöron apopitozunu önlediği ve nörolojik fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir[43,115].

2.3. Nörotropik Faktörler

Son yıllarda nörotropik faktörlerin SKH tedavisindeki olumlu etkileri ile ilgili sonuçlar oldukça dikkat çekicidir. Nörotropik faktörler, nöronal yaşamı, aksonal büyümeyi, sinaptik plastisiteyi ve nörotransmisyonu kontrol eden sinir sisteminin anahtar düzenleyicileridir. Nörotropik faktörlerin spinal kord yaralanmasından sonra aksonal büyümeyi arttırdığı rapor edilmiştir. Yaralanmaya karşı nörotropik faktörlerin düzenlediği aksonal cevaplar, aksonal fenotipe, büyüme faktörlerine karşı reseptör üretimine, lezyonun türüne ve lokal mikroçevreye göre çeşitlilik göstermektedir. Nöronal hücre gövdelerinin lezyon alanına uzaklığı, lezyonun büyüklüğü, yaralanmaya verilen hücresel cevap, hücre yaşamı için son derece önemlidir. Diğer taraftan aksonun uygun hedefe yönlenebilmesi de gerekmektedir[14,15]. Aksonal yeniden büyüme, lezyonun gri cevherdeki yayılımı ve inhibitör ekstraselüler matriks moleküllerinin birikimi ile çok yakından ilişkilidir[116]. Yakın zamanda yapılan çalışmalar, spinal kord yaralanmasını takiben nörotropik faktörlere verilen farklı aksonal cevapların analizine yöneliktir. NGF, BDNF, NT-3 ve NT 4/5 klasik nörotropin ailesi üyeleri olarak vurgulanmıştır. Ayrıca sitokin büyüme faktörleri ve GDNF'yi içeren, TGF-β ailesi de, spinal kord yaralanmalarından sonra aksonal büyümeyi arttırmaktadır[15].

NGF, yaralanmadan sonra duyu aksonlarının büyümesinde güçlü bir uyarandır. Dorsal spinal kordda, periferal sinir graftına NGF infüzyonu, duyu aksonlarının, grafttan beyaz cevher dorsal sütununa doğru büyümesini sağlamıştır[117]. Periferal dorsal kök ezilme yaralanmalarından sonra, yalnızca %3 oranında duyu aksonu, spinal korda ulaşırken, NGF'nin 14 gün boyunca verilmesiyle bu oran %37'ye kadar çıkmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada, NGF üretimi için genetik olarak modifiye edilmiş primer fibroblast graftı kullanılarak, yaralı spinal korda NGF verilmiştir. Sonuçta hem duyu aksonlarında, hem de ventral motor aksonlarda büyüme gerçekleştiği gösterilmiştir[118].

Diğer yandan, spinal korda yerleştirilmiş periferik sinir graftına, BDNF verilmesinin duyu aksonlarında büyümeye neden olduğu da rapor edilmiştir[119]. Ayrıca midtorasik ezilme tipi spinal kord yaralanmasından sonra, 4 hafta boyunca intratekal aralığa verilen BDNF'nin yüksek konsantrasyonlarının, yaralanma bölgesi çevresinde motor nöronlarda büyümeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi stimüle ettiği kaydedilmiştir[120]. Bunların yanında, BDNF salgılamaları için, genetik olarak modifiye edilmiş ve spinal

korda graftlenmiş fibroblastların, rubrospinal traktus aksonlarında rejenerasyonu ilerlettiği gösterilmiştir[121].

Dorsal kök yaralanmasını takiben GDNF, aksonal büyüme üzerine en fazla etkiye sahip olan nörotrofik faktördür[122]. GDNF eksprese eden fibroblastlar, spinal korda transplante edilmiş ve bu hücrelerin transplantasyonu sonucunda, duyu aksonlarında ve lokal motor aksonlarda rejenerasyonun arttığı rapor edilmiştir[15,123]. Bunların yanında, nörotrofin 3'ün spinal kord yaralanmasından sonra kortikospinal aksonlarda büyümeyi ilerleten önemli bir nörotropik faktör olduğu, tek doz olarak enjekte edildiğinde spinal kordda kortikospinal aksonların filizlenmesini uyardığı gösterilmiştir[124,125]. Yaklaşık 20 yıl önce Bunge, Schwann hücrelerininin izolasyonu ve kültüre edilip spinal korda transplantasyonun mümkün olduğunu göstermiştir[126]. Sıçan siyatik sinirinden elde edilen Schwann hücreleri, tam kesi yapılmış spinal korda yarı geçirgen poliakrilonitril/polivinklorid tüpler içerisinde yerleştirilerek implante edilmiş ve aksonal büyümeyi sağladıkları gösterilmiştir[127]. Daha sonra yapılan çalışmalarda, doku kaybını azaltmak için, Schwann hücreleri ile doldurulan yarı geçirgen PAN/PVC tüpler, MP ile kombine edilerek spinal korda implante edilmiştir. Bu kombinasyon tedavisi, ara yüzde doku kaybını azaltmış, aksonların sayısı artmış, graft yönüne doğru supraspinal akson büyümesini ilerletmiş ve rejenere olan liflerin grafttan korda geçişini arttırmıştır[128]. Sinir dokudaki bu korunma ve artmış akson rejenerasyonu, MP'nin aktive olan makrogliya ve makrofajların, graft-kord arayüzündeki sayılarını azaltmasıyla ilişkilendirilmiştir[94].

MSS'deki aksonların, lezyondan sonra, herhangi bir müdahale olmadan rejenerasyon yetenekleri oldukça sınırlıdır[16,128]. Fakat periferik sinir graftı gibi, bir mikroçevre ile[16,17,18,19] ya da kültürde üretilen Schwann hücreleri ile desteklendiğinde[20], MSS'inde rejenerasyon yeteneği artmaktadır. Spinal kord kesisinden sonra, Schwann hücreleri ile doldurulmuş bir rehber kanal, T8 seviyesine graftlandığında, çok sayıda propriospinal nöronların aksonlarının, kord içine doğru büyüdüklerini göstermiştir. Schwann hücre graftına, 14 gün boyunca BDNF ve NT-3 verildiğinde, 14 gün sonra grafttaki miyelinli akson sayısında 3 kat artış görüldüğü, propriospinal aksonların da nörotropin verilmeyen gruba oranla 3 katına çıktığı rapor edilmiştir[129]. Yapılan diğer bir çalışmada, Schwann hücre graftında, adenoviral vektörle düzenlen BDNF ve NT-3 salınımına bakılmıştır. İmplantasyondan bir hafta sonra Ad-BDNF ve Ad-NT-3

karışımı, graft-kord ara yüzünün 7 mm distaline enjekte edilmiştir. Ad-BDNF ve Ad-NT3 tedavisi sonucu arka bacak fonksiyonlarında iyileşme ve akson rejenerasyonunda da belirgin bir artış kaydedilmiştir[15].

2.4. Spinal Kord Hasarında Kök Hücrelerin Kullanımı:

Son yıllarda spinal kord hasarı sonrasında rejenerasyonda kök hücre tedavisi, hasarlı nöronal ve glial hücrelerin yerine diğer fonksiyonel hücrelerin konulması, aksonlarda yeniden miyelinizasyonun mümkün olması, nöronal iletişimin düzenlenmesi, lezyon kavitelerinin birleştirilmesi, nörotrofik faktörlerin, antienflamatuvar sitokinlerin, doku onarımını, neovaskülarizasyonu ilerleten moleküller ile plastisite ve aksonal rejenerasyon için uygun mikroçevre oluşumunu sağlaması açısından umut vermektedir[21,22].

Embriyonik kök hücreler (EKH), blastokist dönemindeki embriyonun iç hücre kitlesinden köken alan ve hemen hemen tüm hücre tiplerine dönüşebilen pluripotent hücrelerdir[130]. Transplante edilen EKH hücreler, teratomları oluşturacağından bunların graftlanmadan önce predifferansiye hale getirilmeleri gerekmektedir. EKH hücrelerin nöral prekürsörlere farklanması için protokoller hazırlanmıştır[131]. Prediferansiye edilen EKH hücreler, SKH'ından sonra sıçan spinal korduna transplante edilmiş ve nöronlara ve glia hücrelerine farklanarak fonksiyonel iyileşmede kısmi bir düzelmeye yol açmıştır[132]. SKH'ından sonra şiddetli demiyelinizasyon gelişmekte, miyelin kılıfı oluşturan oligodendrositlerde apopitoz oranı olağanüstü artmaktadır. SKH'nı takiben, EKH hücrelerin subakut olarak sıçan spinal korduna transplantasyonu, bu hücrelerin oligodendrosit progenitör hücrelerine predifferensiye olmalarına neden olmakta ve böylece aksonlarda yeniden miyelinlenmeyi ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırmaktadır[133,134].

Nöral kök/progenitor hücreler **(**NSPC), hem fötal hem de yetişkin MSS'inde bulunan multipotent hücrelerdir. Bu hücreler ön beyin lateral ventriküllerinde, subventriküler zonda, hipokampusun dentat giyrusunda, spinal kord merkezi kanalında yoğun olarak bulunurlar. NSPC hücreler, yetişkin kemirgenlerin spinal kord merkezi kanalından izole edilerek kültüre edilmiş[135], bu hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda primer olarak oligodendrositlere farklandıkları gösterilmiştir[136]. Bunların yanında, NSPC hücrelerinin, SKH'ından sonra spinal korda transplantasyonlarının

nöroprotektif ve nörorejeneratif etkileri ile fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu etkileri de gösterilmiştir[137]. Yetişkin (adult) fare beyin kökenli NSPC hücreleri, sıçan spinal korduna transplante edilmiş ve büyüme faktörleri varlığında, oligodendrositlere farklanarak remiyelinizasyonu ve lokomotor fonksiyonları arttırmıştır[138]. SKH'nı takiben NSPC transplantlarının, valproik asitle birlikte verildiğinde, nöronal differensiyasyona neden olduğu, bozulmuş nöronal iletimin düzelmesini sağladığı ve iyileşmeyi arttırdığı kaydedilmiştir[139].

Diğer yandan, hemopoietik kök hücrelerin, SKH'ından sonra, farelere subakut transplantasyonlarının, fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir. SKH modelinde transplantasyon için kullanılan en yaygın non-nöronal hücrelerin, kemik iliği kökenli kök hücreler (BMSC) olduğu kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda, BMSC hücrelerinin SKH'dan sonra kemirgenlerde lokomotor iyileşmeyi arttırdığı gösterilmiştir[135,140]. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, mezenkimal kök hücrelerin (MSC) in vitro olarak nöronlara farklanabildikleri gösterilmiştir. Ancak MSC'lerinin, tümör oluşumu ve metastazını arttırmak gibi, yan etkileri de bulunmaktadır[141].

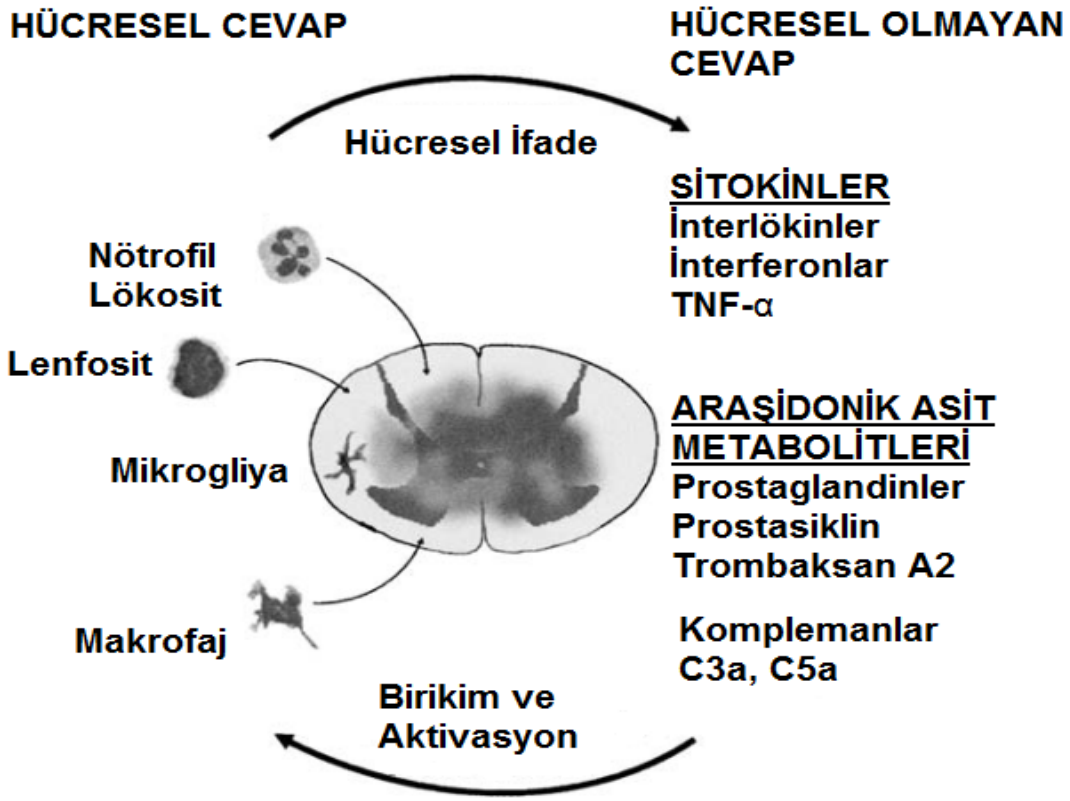
Yaralı spinal kord dokusu, hücre yaşamı, nöronal farklanma ve maturasyonun gerçekleşmesi için oldukça fakir bir mikroçevreye sahiptir. Araştırmacılar, MSS onarımında kök hücre etkinliğini arttırabilmek, daha iyi bir yaşam süreci, farklanma ve maturasyonun gerçekleşmesi için kök hücre tekniklerini daha da geliştirmeyi hedeflemektedirler. Transplante edilen EKH'lerin yaşamını arttırmak için hücreler, antiapoptotik bir protein olan BCL-2'yi yüksek oranda eksprese etmeleri amacıyla, genetik olarak modifiye edilmişlerdir. Bu hücreler spinal korda transplante edildiğinde, hücre adezyon molekülü olan L1 eksprese ederler ve bu da lezyonun rostral ve kaudaline ulaşır. Kortikospinal aksonlar, L1 ile transfekte edilen EKH'ler ile ilişki kurarak onlara doğru büyürler[142]. Bununla birlikte, tam bir iyileşme için, tek başına kök hücre transplantasyonunun yeterli olamayacağı, ilave kombine tedavi stratejilerinin de gerektiği görüşü, yaygın olarak kabul edilmektedir[22].

2.5. Enflamatuvar Cevaplar ve Sitokinlerin Rolü

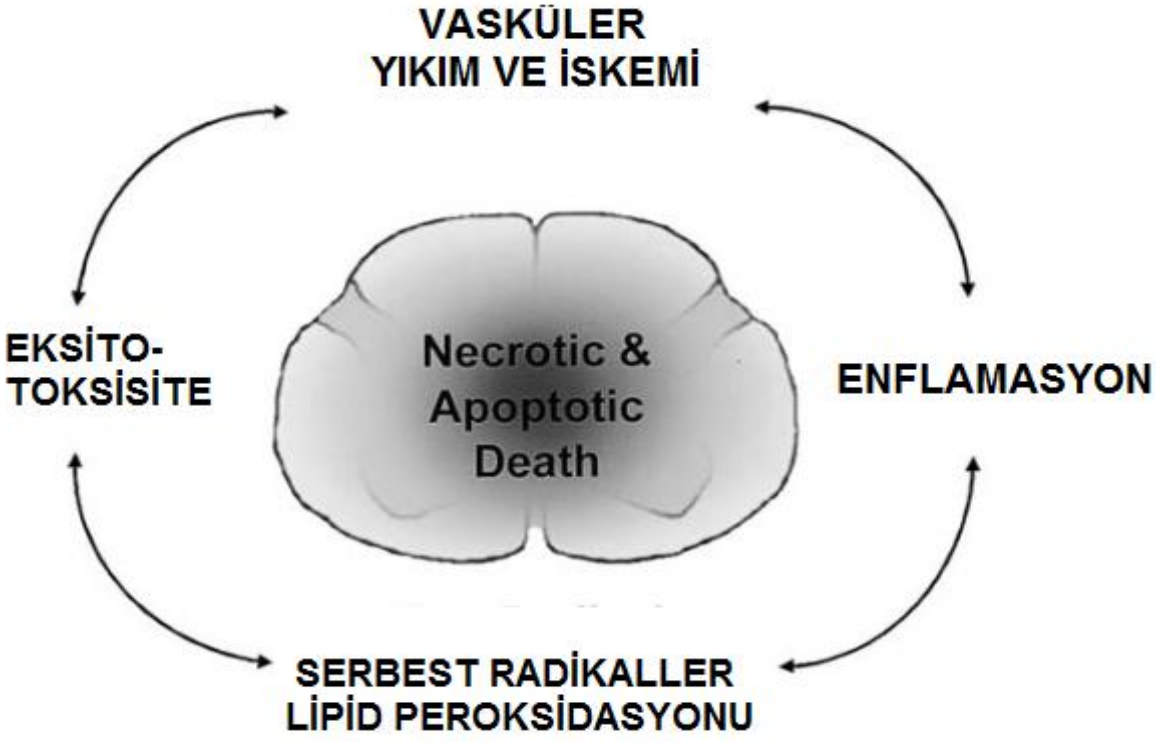
Enflamatuvar ve immünolojik cevaplar; T hücreleri, nötrofiller ve makrofajları içeren hücresel komponent ile sitokin, prostaglandin ve komplemanları içeren,

nonselüler komponentlerden oluşmaktadır. Spinal kord hasarından hemen sonra, kandan köken alan nötrofiller, hızla infiltre olmakta ve litik enzimler ve sitokinleri salgılamaktadırlar, bu durum, daha ileri doku hasarı ve diğer enflamatuvar hücrelerin toplanmasına da neden olmaktadır[143]. Periferik kandan köken alan monosit/makrofajların toplanması ve lokal mikrogliyaların aktivasyonu sonucu, hasarlı doku fagosite edilir[144]. Bunlar ve diğer reaktif hücreler, TNF, interlökinler ve interferonlar gibi, sitokinleri üretirler, bu ürünler enflamatuvar cevaplara aracılık ederler ve daha ileri doku hasarları ile ilişkilidirler[145,146].

Sitokinler, siklooksigenaz 2 (COX-2) ekspresyonunu uyarır, böylece araşidonik asitin parçalanması başlatılır, sonuçta proinflamatuvar prostanoidler (prostaglandinler, prostasiklinler ve tromboksanlar) oluşur, bu maddeler, vasküler permeabilite, direnç, plaket agregasyonu ve yapışmasına neden olurlar[147,148]. Bunların yanında, artmış sitoplazmik kalsiyum, fosfolipazları aktive eder ve membran içerisinde fosfolipidlerden araşidonik asit oluşumu sağlanır[149]. SKH'ından sonra enflamasyon, iki tarafı keskin bıçak gibi, hem nörotoksik hem de nöroprotektif olarak değerlendirilmektedir[150]. Enflamasyonun erken safhası zararlı tabiattadır, buna karşın, geç enflamasyon olayları nöroprotektif olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, enflamasyon, doku hasarına cevap olarak, savunma ve tamire yönelik olarak meydana gelmektedir. SKH'ından sonra gelişen hücre ölümü ve enflamatuvar/immün cevaplar Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Travma sonucunda spinal kord'da nekrotik ve apopitotik hücre ölümüyle ilgili süreçler başlamaktadır[43].



Şekil 2:Spinal kord yaralanmasına cevap olarak gelişen enflamatuvar/immün reaksiyonlar gösterilmiştir[43].

SKH'ından sonra transkripsiyon, enflamasyon, hücre ölümü ve hücre sinyal proteinlerinin genleri uyarılmakta[151] ve Caspas 3 aktivasyonunun artışına bağlı olarak, apopitotik süreç başlamaktadır. IL-1, IL-6 ve TNF gibi, proenflamatuvar sitokinlerin ekspresyonları önemli ölçüde artmaktadır ve bu moleküller, sekonder hasarların oluşumunda pivotal bir rol üstlenmektedirler[6]. Ayrıca bu sitokinler, astrosit ve mikrogliyaların aktivasyonlarını, proliferasyon ve migrasyonlarını arttırmakta, serbest radikal üretimi, kompleman aktivasyonu ile vasoaktif aminlerin ve eicosanoidlerin üretimine sebep olmaktadırlar, bütün bu mediyatörler enflamasyon artışına neden olmaktadır[7].Aktive olmuş nötrofil ve makrofajlar; sitokinler, serbest radikaller, eicosanoidler ve protezları salgılayarak, nöronal ve glial toksisiteye sebep olmaktadırlar[152, 153]. Bu toksik etkiler, birçok SKH modelinde gösterilmiştir. Nöroprotektif etkiler ve nörolojik iyileşmeyi sağlamak amacıyla, aktive olmuş nötrofil ve makrofajları ya nötralize etmek, veya bu hücrelerin fonksiyonlarını inhibe etmek gerekmektedir[154]. Nöronlar ve glia hücreleri, TNF-α ve IL-1β gibi, proenflamatuvar sitokinleri, normal hücrelerarası etkileşimlerin bir parçası olarak sentezler. Fakat bu sitokinlerin devamlı olarak artması, enflamasyona neden olur ve düzensizleşen sitokin salınımı, nöron ve oligodendrositlerin ölümüne neden olmaktadır[155]. TNF-α ve IL-1β'nın bloke edilmesi, spinal kord ve beyin travma modellerinde nöroprotektif etkilere neden olmuştur[156,157]. Diğer taraftan, IL-6 ve LIF'ün MSS yaralanmalarından sonra sekonder nörodejenerasyonda rol oynadıkları rapor edilmiştir[158,159]. Spinal kordda IL-6 ve LIF ekspresyonlarının aşırı artması sonucu, lökosit infiltrasyonunu arttığı, aksonal büyümenin azaldığı ve lokomotor iyileşmenin bozulduğu gösterilmiştir[159].MSS, mikroglialar ve immunolojik olarak aktif astrositler gibi, intrinsik immün hücrelere sahiptir ve bu hücreler, immun cevapların güçlü düzenleyicileridir. MSS, normal fizyolojik koşullarda nöroimmün etkileşimleri kan-beyin bariyeri ve IL-10, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1 ve IL-1a) gibi, antienflamatuvar sitokinler yoluyla düzenler[160]. Travmayla birlikte dakikalar içinde immun cevap ortaya çıkar ve proenflamatuvar ve protrombotik reaksiyonlar sonucunda, doku hasarı meydana gelir. Bu enflamatuvar kaskad; mikroglia ve astrosit aktivasyonunu, sitokinler ve kemokinler gibi moleküllerin salınmasını, monosit, makrofaj, nötrofil ve T hücrelerinin infiltrasyonunu ve ayrıca yaralanma bölgesine, hücre adezyonu, migrasyonu ve ekstravazasyonunun gerçekleşmesi için adezyon moleküllerinin artışını içermektedir[161].

Enflamatuvar cevap patojenlerin eliminasyonu ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılması yoluyla hemostazisin restore edilmesi için devreye girmektedir. Bu cevaplar sonuçta apopitoza neden olur ve salınan toksik maddelerden dolayı, çevredeki sağlıklı dokular da etkilenir[44]. MSS dışındaki dokularda doku tamiri ve rejenerasyon mümkün olduğundan, enflamasyon miktarı kabul edilebilir düzeydedir fakat MSS'nin sınırlı rejenerasyon yeteneğinden dolayı, enflamasyonla ilişkili hasar kalıcı olmaktadır. Enflamasyon kaskadında, birçok sitokin yer almasına rağmen, IL-1 β sekonder hücre ölümü ile ilişkili MSS proenflamatuvar kaskadının primer düzenleyicisi olarak kabul edilmektedir[162]. MSS yaralanmasından sonra IL-1 β ekspresyonu, artmış nöronal hasarla ilişkilendirilmiştir. Eksojen IL-1 β verilmesi, doku hasarını ve enflamasyonu arttırırken, antagonist IL-1a verilmesi sonucunda ise, nöral hasar anlamlı derecede azalmaktadır. Dolayısıyla enflamasyonun tamamı patojenik olarak kabul edilmemelidir. MSS'inde doku hasarı modellerinde, TNF-α, P55/P75 gibi, spesifik enflamatuvar gen reseptörlerinden yoksun farelerde yapılan araştırmalar, bu deneklerde artmış hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir. IL-10 ve IL-1ra'dan yoksun farelerde, travmayı takiben nöronal hasar artmıştır. Bunların yanında, IL-10 ve IL-1ra'nın travma alanına infüzyonu nöroprotektif olarak bulunmuştur. Her nekadar akut enflamatuvar reaksiyonların MSS dokuları için harap edici olduğu kabul edilse de, geç enflamatuvar olaylar, onarıcı ve iyileştirici yönde de olabilmektedir[54].

2.6. Tümör Nekroz Faktör-α (TNF-α)

SKH'nı takiben ilk 24 saatte, TNF-α ve IL-1β gibi, potansiyel proenflamatuvar mediyatörler lezyon alanında yükselmekte, bu bölgedeki sekonder hasarlardan da major olarak sorumlu tutulmaktadırlar. TNF-α, nötrofil, makrofaj, mikrogliya, astrosit ve T hücreleri tarafından salgılanır ve yaralanmadan kısa bir süre sonra, SKH alanında birikir[47]. TNF-α salınımından sonra, kandan köken alan aktive lökositler, spinal kord içerisine göç ederler ve ilave sitokin sekresyonuna neden olurlar. TNF-α, mikrogliya ve astrositleri uyaran ve potansiyel olarak nörotoksik olan, nitrik oksit gibi, metabolitlerin oluşumunu da uyarmaktadır[143]. TNF-α aynı zamanda, apopitozu uyarırken, oligodendrositler üzerine de toksik etki yapmakta ve nöronal fonksiyonu bozmaktadır[163]. Posttravmatik SKH'ında direkt ve indirekt etkilere sahip olan TNF-α, SKH'ından sonra ilk 24 saat içinde salınmakta ve 1 hafta süresince de birikmeye devam

etmektedir. Dolayısıyla bu sitokin ve bunu salgılayan hücrelerin, travmadan sonraki 24 saat ile 1 hafta sürecinde oluşan sekonder hasarlarla çok yakından ilişkili olduğu kabul edilmektedir[47].

Yaralanmadan 30 dk sonra TNF-α mRNA'sında geçici bir pik oluştuğu bilinmektedir. Wang ve arkadaşları[162], SKH'ından hemen sonra spinal kord ve beyin omurilik sıvısında, TNF-α biyolojik aktivitesinde artış olduğunu rapor etmişlerdir. TNF-α'nın hücresel kaynağı olarak, mikrogliyaların oldukça aktif hücreler olduğu kabul edilmektedir. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, MSS'inde, TNF-α immunoreaktivitesinin, daha çok beyaz cevherdeki aksonlarda ve daha az olarak da, gri cevherde bulunan nöronlarda eksprese olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte yaralanma, nöronlarda TNF-α sentezini aktive etmektedir. Bu molekül daha sonra gövdeden aksonlara iletilmektedir. Alternatif olarak, TNF-α aktif mikroglialar gibi, çeşitli hücre tiplerinden sentezlendikten sonra, intersellüler aralığa verilmekte ve buradan da aksonlara geçmektedir[91].

TNF-α, MSS'ni etkileyen hastalıklarda enflamatuvar reaksiyonun başlaması ve devamlılığında anahtar konumda rol oynayan moleküldür. Günümüzde spinal kord yaralanmalarının indüklediği TNF-α ekspresyonu, SKH'ından sonra erken dönemde hem mRNA hem de protein seviyelerinde gösterilmiştir. Bununla birlikte, günümüzde hala, TNF-α'nın yaralı spinal korda, esas hücresel kaynağı tam olarak açık değildir. Yapılan deneysel çalışmalarda yaralanma sonrası spinal kordda; nöronlarda, gliya hücrelerinde ve endotelyal hücrelerde TNF-α ekspresyonu gösterilmiştir[164].

TNF'nin etkisini bir proenflamatuvar transkripsiyon faktörü olan, Nüklear faktör kappa beta (NFkβ) üzerinden gösterdiği, bu faktörün TNF seviyesinin artışına paralel olarak arttığı, MP'nin, TNF ekspresyonunu azalttığı ve NFkβ'nın bağlanma kapasitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir. NFkβ bir oksidatif stres yanıt transkrpsiyon faktörü olarak kabul edilmektedir. NFkβ'yı aktive eden sinyaller, antioksidanlar tarafından engellenmektedir. Dolayısıyla, glukokortikoidlerin antienflamatuvar etkileri, NFkβ'yı inhibe etmeleri ile mümkün olmaktadır. TNF-α yaralanmış spinal korddan salınmakta ve NFkβ'yı aktive etmektedir. Aktive olan NFkβ, akut faz proteinleri gibi, enflamatuvar genleri, hücre adezyon moleküllerini, iNOS, interlökinler, proteazlar ve diğer moleküllerin ekspresyonunu düzenlemektedir[91].

Diğer taraftan, TNF-α lökosit aktivasyonuna bağlı endotel hasarından sorumludur, yalnızca nötrofilleri aktive etmekle kalmaz, aynı zamanda endotel hücrelerinde, örneğin E-selectin gibi, lökosit adhezyon moleküllerini de arttırmaktadır[4]. Bundan başka TNF-α, endotel hücrelerinde, nötrofil yokluğunda bile, direkt hasara da yol açmaktadır[165]. Yapılan çalışmalarda, TNF-α'nın travmatize SKH'ında artış gösterdiği ve 4 saat sonra da pik yaptığı rapor edilmiştir. TNF-α mRNA'nın travmatize SKH'dan 30 dakika sonra arttığı gösterilmiştir[166]. Deneysel çalışmalarda, TNF-α'nın hem sitotoksik hem de nöroprotektif etkileri ortaya çıkarılmıştır[43]. TNF-α'nın antikorlarla veya diğer sitokinler ile inhibisyonu, MSS yaralanmalarında fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu etkiye sebep olmaktadır, bu durum, TNF-α'nın sitotoksik etkisini ortaya koymaktadır[167]. Bunun aksine, bazı in vitro çalışmalarda, TNF-α'nın eksitotoksik ölüme karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir[168]. Transgenik farelerde, SKH'ında, TNF-α reseptör yokluğuna sahip farelerde, doğal tiplere göre daha fazla doku kaybı ve fonksiyonel yetersizlik belirlenmesi, TNF'nin nöroprotektif etkisinin varlığına işaret etmektedir[169]. Ayrıca TNF'nin nöropatik ağrı ile de yakından ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Aktive olan mikroglial hücreler, büyüme faktörleri, sitokinler, kompleman faktörleri, lipid mediyatörler, ekstraselüler matriks kompenentleri, enzimler, serbest radikaller, nörotoksinler, nitrik oksit ve prostaglandinleri salgılamaktadırlar, bunlardan bazıları şüphesiz ki nöropatik ağrıya da neden olan maddelerdir[170].

SKH'nın akut fazı süresince yaralı mikroçevrede, TNF-α'ya ek olarak, en fazla bulunan proenflamatuvar sitokinler, IL-1 ve IL-6'dır. IL-1, yaralanmadan hemen sonra mikroglialar tarafından salınır[171]. Bununla birlikte 15 dk içinde TNF-α ve IL-6 mRNA'ları da hücrelerde artmaktadır[164]. Tüm bu sitokinlerin birbirlerinin ekspresyonunu kostimüle edebileceği ve miktarlarının artacağı kabul edilmektedir[172]. SKH'ından hemen sonraki birkaç saat içerisinde, bu sitokinlerin seviyeleri pik yaparken, 24.saatte daha zayıf olarak izlenmektedir[146]. Buna rağmen TNF-α seviyeleri SKH'nı takiben, bir hafta süresince artmaya devam etmektedir. Bu durum lökosit infiltrasyonu ve primer yaralanma alanına proenflamatuvar sitokinlerin sekresyonu ile ilişkilendirilmektedir.

TNF-α ve IL-1'in, reseptörlerine bağlanmaları, bunların NFkβ sinyal yoluyla enflamatuvar cevabı ilerletmesine neden olur[171]. NFkβ, nöronlarda, mikroglialarda ve

endotelyal hücrelerde SKH'ını takiben ilk 30 dk sonra artmaya başlar ve ekspresyonu en az 72 saat kalıcıdır. Aktif NFkβ, ROS, sitokinler, iNOS ve prostoglandinler gibi enflamatuvar mediatörlerin üretimini arttırır[169,171]. MP'un, SKH'ında NFkβ yolağını inhibe ettiği rapor edilmiştir[91]. SKH, ayrıca antienflamatuvar sitokin TGF-β ekspresyonunu da indüklemektedir[3].

Sistemik IL-10 infüzyonunun da SKH'ından sonra TNF-α ekspresyonunu azaltarak, fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı rapor edilmiştir[167]. Buna ek olarak, yakın zamanda farelerde SKH sonrası, TNF-α'nın antagonisti olan etanercept'in, tek başına veya dexametasone ile kombine verilmesinin, sekonder hasar ve enflamasyonu azalttığı, lokomotor fonksiyonu düzelttiği gösterilmiştir[156].

2.7. İnterlökin 6 (IL-6) :

IL-6, T ve B hücre farklanması ve proliferasyonunda, immunglobulin sekresyonunda, akut faz proteinlerinin üretiminde ve makrofaj/monosit fonksiyonlarında anahtar rol oynayan multifonksiyonel bir sitokindir[173]. IL-6'nın, SKH patofizyolojisinde sekonder hasarı başlattığı bilinmektedir[174]. IL-6 salınır salınmaz membran-bağlı reseptörü olan, IL-6R' ye bağlanarak, IL-6/IL-6R kompleksini oluşturur ve bu kompleks de, gp130 ile ilişki kurarak, hücre içerisinde sinyal oluşumunu tetikler[175].

IL-6, immun sistem, endokrin sistem, sinir sistemi, hematopoietik sistem ve kemik metabolizmasında önemli rollerle sahiptir. T ve B hücreleri, polimorfonüklear hücreler, eozinofiller, monosit/makrofajlar, mast hücreleri ve dendritik hücreler gibi, immün sistemde yer alan birçok hücrenin IL-6 eksprese ettiği rapor edilmiştir. IL-6 eksprese eden diğer hücrelerin de; kondrositler, osteoblastlar, endotelyal hücreler, çizgili ve düz kas hücreleri, fibroblastlar, mezangial hücreler, keratinositler, bazı tümör hücreleri, mikroglial hücreler ve astrositler olduğu bildirilmiştir[176].

Nöronların IL-6 eksprese ettiği düşüncesi, çok yakın zamanda kabul edilmiştir. Bazı in vitro çalışmalarda, sempatik ve duyu gangliyonlarından kültüre edilen nöronlarda, IL-6 mRNA ekspresyonun varlığı rapor edilmiştir. NMDA aracılı glutamaterjik depolarizasyonu takiben, nöronlardan IL-6 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir. Bu etkinin L tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanallarının seçici olarak bloke

edilmesi ve kalsiyum kalmodulin protein kinazların inhibe edilmesiyle ortadan kalktığı bildirilmiştir[177].

IL-6, Th1 ve Th2 hücre cevaplarında, B hücrelerine de etki ederek, bu hücrelerin immünglobulin üretiminin arttırılmasında fonksiyon yapmaktadır. IL-6 ayrıca, B ve T lenfositlerinin farklanmasını uyarmakta, makrofajları ve NK hücreleri aktive etmekte ve hepatositleri akut faz proteinlerinin sentezi için uyarmaktadır. Bunların yanında, IL-6, makrofaj ve dendritik hücreler gibi antijen sunan hücrelerin farklanması üzerine de etkileri bulunmaktadır[176].

İnsanlarda ve hayvan modellerinde merkezi sinir sistemi travmalarından sonra IL-6 upregülasyonu gerçekleşir. SKH'ından 6 saat sonra IL-6 mRNA seviyesinin pik yaptığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Okada ve arkadaşları, bu erken upregülasyonun zarar verici olduğunu bildirmiş ve SKH'ından sonra nötralize edici IL-6 antikoru verilerek farelerde önemli derecede motor iyileşmenin meydana geldiğini rapor etmişlerdir[158]. IL-6 ile ilgili diğer bazı çalışmalarda, upregülasyonun kronik olabileceği ve devamlı artışın SKH'na sahip hastalardaki kronik ağrı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. SKH'ındaki kronik ağrı ile IL-6 seviyeleri arasındaki ilişkiyi açıklayan çalışmalar da bulunmaktadır[178].

İnterlökin 6'nın, spinal kordda major enflamatuvar hücreler olan makrofaj/mikroglia aktivasyonunu ve infiltrasyonunu arttırdığı bilinmektedir. IL-6'nın aşırı artışı, enflamasyonu uzatmakta ve yaralanmayı daha da kötüye götürmektedir[159]. IL-6'nın bloke edilmesinin SKH'ından sonra enflamasyonu azalttığı, yapılan deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Anti-mouse IL-6 reseptör antikoru (MR16-1), IL-6 reseptörünü nötralize eden bir antikordur ve bu reseptörün IL-6'ya bağlanmasını engellemektedir. MR16-1' in SKH'ından sonra enflamasyonu azalttığı, astrogliozisi düşürdüğü, doku ayrışmasını arttırarak fonksiyonel iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir[158]. İnsan IL-6 reseptörü antikorunun (MRA; tocilizumab) Castleman's hastalığında ve romatoid artritte klinikte kullanıldığı bilinmekte olup, bu ilacın SKH'nın tedavisi için bir seçenek olabileceği ileri sürülmüştür. MR16-1'in bu etkilerini, IL-6/JAK/STAT-3 sinyalizasyonunu bloke ederek gösterdiği rapor edilmiştir[179].

Sitokinlerin genel olarak proenflamatuvar özellikte oldukları ve glial skar formasyonunu ilerleterek, sinir sisteminde zarar verici etkilerinin olduğu bilinse de, bu mediyatörlerin aynı zamanda, nöral dokuda rejenerasyonu ilerletici etkilerinin de

olduğuna dair önemli kanıtlar bulunmaktadır. Bu durum hem merkezi hem de periferik sinir sistemi için geçerlidir. IL-6, IL-11, IL-17, LIF, CNTF gibi moleküllerin hematopoietik ve sinir sisteminde etkilerinin varlığı gösterilmiştir. Bu nöropoietik sitokinler, gp 130 reseptörü ile sinyallerini iletmektedirler. Oluşan hücresel sinyaller normal beyin gelişimi, beyin travmaları sonucu oluşan hastalıklarla yakından ilişkilidirler[176]. Yapılan son çalışmalarda, IL-6 sinyal inhibisyonunun gliozise neden olabileceği bu nedenle de akson rejenerasyonunu engelleyebileceği bildirilmiştir. IL-6'nın, enflamasyonun geç dönemlerinde, doku artıkları temizlendiğinden ve çeşitli nörotrofik faktörler salgılandığından, spinal kord onarım sürecinde iyileştirici etkilere sahip olduğu kabul edilmektedir[179].

2.8. Minosiklin Tedavisi:

Günümüzde spinal kord hasarının tedavisinde pek çok ajan tek başına veya kombine olarak kullanılmaktadır. Kord hasarı sonucunda gelişen enflamatuvar reaksiyonların zararlı etkilerinin azaltılması ve özellikle de nöronların korunması hedeflenmektedir. Minosiklin, tetrasiklin türevi geniş spektrumlu bir antibiyotik olup, kan-beyin bariyerini geçebilen, gram (+) ve gram (–) enfenksiyonlara karşı etkili bir tetrasiklindir. İntraperitoneal veya intravenöz yolla verildiğinde, nöroprotektif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir[23]. Minosiklin, spinal kord hasarında mikrogliya ve makrofajları inhibe ederek, nöroprotektif etki göstermekte ve oluşan nöropatik ağrıyı azaltmaktadır[24]. SKH'ında enflamasyon her ne kadar patolojik süreç olarak kabul edilmekle birlikte, enflamasyon aynı zamanda yaralanmış dokunun tamiri için de çok önemli bir role sahiptir. Minosiklinin etki mekanizması tam olarak bilinmese de, glutamat aracılı eksitotoksisiteyi önlediği, mikroglial aktivasyonu engelleyerek antienflamatuvar etkiye sahip olduğu, sitokrom-c ve caspaz salınımını bloke ederek apopitotik nöronal ölümü azalttığı, aynı zamanda matriks metalloproteinaz-2 aktivitesine karşı etkiye sahip olduğu kabul edilmektedir. Minosiklin'in antienflamatuvar etkisi iyi bilinmektedir, mikroglial aktivasyonu inhibe ettiği, böylece bir çok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde etkili olabileceği kabul edilmektedir. Minosiklin immün hücreler üzerine olan direkt antienflamatuvar etkisi ile, mitokondriyonlardan sitokrom c salınımını inhibe etmekte ve nöronlarda kaspaz 1 ve 3 ekspresyonunu azaltmaktadır[24].

Günümüze kadar, minosiklinin serebral iskemi, travmatik beyin hasarı, SKH, ALS, Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı ve Multiple Sklerozda nöroprotektif etkileri rapor edilmiştir. SKH'ında minosiklin'in koruyucu etkileri çok az çalışmada rapor edilmiştir. Bununla birlikte, minosiklinin etki mekanizması ve gelecekte SKH'nın tedavisinde muhtemel yararlı etkilerinin, daha ileri çalışmalar ile araştırılması gerekmektedir. Günümüzde minosiklinin SKH'ından sonra, fonksiyonel geri dönüşleri arttırdığı, lezyon alanını küçülttüğü, hücre ölümünü azalttığı ve sitokin ekspresyonu üzerine etkili olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, minosiklinin nöroprotektif etkilerinin hücresel ve moleküler temeli hala tam olarak bilinmemektedir[25].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda minosiklinin yalnızca nöronal apopitoz sürecini değil, aynı zamanda oligodendrositlerin apoptotik sürece girmelerini engelleyerek fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı bildirilmiştir. Spinal kord hasarından sonra oligodendrositlerin apopitozunda pro-NGF'nin önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir. Yune ve arkadaşları minosiklinin, SKH'dan sonra mikroglialarda aktive olan ve pro-NGF üretimini uyaran, P38 MAPK molekülünü inhibe ederek pro-NGF üretimini engellediğini ve böylece oligodendrosit apopitozunu önleyerek fonksiyonel iyileşme sürecini hızlandırdığını bildirmişlerdir.[180]

Spinal kord yaralanması sonrası primer mekanik hasarın oluştuğu, bunu takiben sekonder doku cevaplarının başladığı bilinmektedir. Sekonder doku hasarının minimize edilmesi bugün için SKH'nın tedavisinde primer hedeftir. Sekonder hasar kapsamında ortama salınan sitokinlerin yararlı etkileri yanında, ortamda yüksek oranda uzun süreli bulunmalarının doku hasarına neden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Akut SKH'nı takiben TNF-α ve IL-6 ekspresyonunun hücresel dağılımı ve lezyon alanında ortaya çıkış süreleri ve dağılımlarının birlikte gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Diğer taraftan SKH tedavisinde yaygın olarak kullanılan MP'nin sitokin salınımına olan etkisi de hala tam olarak açık değildir. Bununla birlikte, son yıllarda SKH tedavi protokollerinde yer alan minosiklinin de sitokinlerle ilişkisi, bu bağlamdaki etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalar da son derece sınırlıdır. Bu çalışmada, sıçanlarda klip kompresyon yöntemi ile oluşturulacak akut spinal kord yaralanması sonrası TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarına, MP ve Minosiklin tedavisinin tek başına ve kombine etkilerinin, immünohistokimyasal, elektron mikroskobik ve biyokimyasal düzeyde araştırılması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi ve gruplara ayrılması

Deneysel akut spinal kord yaralanması sonrasında metilprednizolon (Sigma, Katolog no: M1750000-1EA) ve minosiklinin (Sigma, Katolog no: M9511) ayrı ayrı ve kombine tedavilerinin TNF-α ve IL-6 sitokin seviyelerine etkilerinin incelenmesi amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DETAUM) 250-300 gr ağırlığında 78 erkek Wistar cinsi sıçan temin edildi. Bu denekler herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan ve sağlam bırakılan kontrol grubu (n=10), spinal kord T2-T7 segmentleri arasında yalnızca laminektomi oluşturulan sham operasyon grubu (n=10) ve T2-T7 segmentleri arasında klip kompresyon yöntemi ile spinal kord hasarı (SKH) oluşturulan deney grubu (n=58) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. SKH'nı takiben deney grubunda yer alan hayvanlar da kendi aralarında; spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra yalnızca serum fizyolojik verilen grup (grup 3A, n=10); spinal kord hasarını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan grup (grup 3B, n=16); spinal kord hasarını takiben minosiklin tedavisi uygulanan grup (grup 3C n=16) ve son olarak da spinal kord hasarından sonra metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan grup (grup 3D n=16) olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı.

3.2. Operasyon:

Bütün cerrahi işlemler 150 mg/kg intramusküler ketamin anestezisi altında gerçekleştirildi. Klip kompresyon yöntemi Rivlin ve Tator[181] modeline göre yapıldı. Spinal kord yaralanması Torakal 2-7 (T2-7) segmentleri arasında, ekstradural klip kompresyon uygulaması ile gerçekleştirildi. Kapanma gücü 50 g olan anevrizma klibi (Yaşargil, FE 691K, Aesculap AG, Germany) ekstradural olarak uygulanarak deneklerde SKH yapıldı. Klip uygulama süresi 1 dakika olarak ayarlandı ve süre bitiminde klip hemen kaldırıldı.

3.3. Tedavinin Uygulanması

Deney kontrol grubundaki (Grup 3A) deneklere SKH'nı takiben yalnızca serum fizyolojik enjekte edildi. Metilprednizolon tedavisi alan gruba (Grup 3B),

yaralanmadan hemen sonra, başlangıç dozu olarak 30 mg/kg metilprednizolon intravenöz olarak uygulandı[67,69,70,91]. Daha sonraki 24 ve 48. saatlerde, 2. ve 3. dozlar 10 mg/kg intravenöz olarak verildi. Yalnızca minosiklin tedavisi uygulanan gruba (Grup 3C), başlangıç dozu olarak 90 mg/kg, 2. ve 3. dozlarda 50 mg/kg minosiklin intraperitoneal olarak verildi[180]. MP+minosiklin kombine tedavi grubuna (Grup 3D) ise MP, grup 3B' ye uygulanan dozda, minosiklin grup 3C'de belirtilen dozlarda kombine olarak uygulandı.

3.4. Biyopsilerin Alınması:

Grup 2 ve 3A, 3B, 3C, 3D'de yer alan deneklerin yarısından SKH'ından 24 saat sonra; aynı grupların kalan yarısından ise SKH'ından 72 saat sonra spinal kord doku örnekleri alındı. Elde edilen spinal kord dokuları, ışık ve elektron mikroskobik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal incelemeler için uygun yöntemler ile hazırlandı.

3.5. Işık Mikroskobi Yöntemleri

Işık mikroskobik incelemeler için bütün gruplardan elde edilen spinal kord doku örnekleri, %4'lük paraformaldehit içerisine alındı ve oda ısısında 48-72 saat süreyle tespit edildi. Daha sona formalinin uzaklaştırılması amacıyla dokular su ile yıkandı ve Leica Ototeknikon (Germany) otomatik doku takip cihazı ile rutin doku takipleri yapıldı. Bloklama işlemini takiben 5 μm kalınlığında alınan parafin kesitler, Hematoksilen-Eozin ve miyelinizasyonun gösterilebilmesi amacıyla da Kluver-Barrera yöntemleri (EMS Catalog#: 26681) ile boyandı. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alındı ve uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.6. İmmünohistokimya Yöntemleri

Tümor nekroz faktor alfa (TNF-α) ve İnterlökin-6 (IL-6) aktivitesinin belirlenmesi amacı ile, elde edilen histolojik kesitler, polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutularak, tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60 °C'de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi

giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu içerisine alınıp 95ºC'lik su banyosunda, 30 dakika süreyle tutularak antijenlerin açığa çıkarılması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda çalkalandı ve %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) içerisine alındı. H_2O_2'te yaklaşık 6 dk kadar bekletildikten sonra, kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla serum damlatıldı ve oda ısısında, nemli ortamda 10 dakika bekletildi. Ardından, kesitler üzerindeki solüsyon dökülerek, dokuların etrafı kurulandı ve 1/400 oranında sulandırılan, anti-IL-6 (IL-6; anti-rat rabbit polyclonal antibody, ab6672, Abcam, USA.) ve 1/2000 oranında dilüe edilen anti-TNF-α (TNF-α; anti-rat rabbit poyclonal antibody, ab66579, Abcam, USA.) primer antikorları damlatıldı. Primer antikor damlatılan tüm kesitler +4°C'de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikorlar yerine, tampon solüsyonu damlatıldı.

Primer antikorla muamele edilip 1 gece +4°C'de bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS'den geçirildi ve üzerlerine Biotin (D01-125, Lifespan, USA.) damlatılarak 15 dk süreyle oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS'de yıkanan kesitlerin etrafi kurulanıp Avidin (D01-125, Lifespan, USA.) damlatılalarak, 20 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS'den geçirilen kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için hematoksilen ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular lamel ile kapatıldı, Olimpus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.7. Elektron Mikroskobi Yöntemleri

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan spinal kord doku parçaları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5 lik gluteraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm^3 lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar gluteraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Böylece dokular gluteraldehit ile toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa

10’ar dk çalkalandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1 lik osmium tetraoksit solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi. İki saatlik osmium tetraoksit tespitinden sonra dokular yine fosfat tamponu ile iki kez 10’ar dk yıkandı. Dokular daha sonra aşağıdaki sıraya göre dehidrate edildi :

- % 50 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
- % 70 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
- % 86 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
- % 96 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
- % 100 Etil alkolde + 4º C’de 15 dakika
-

Buraya kadar olan işlemler buzdolabında +4º C’de gerçekleştirildi. Daha sonra aşağıdaki işlemler oda ısısında gerçekleştirildi :

- %100 Etil alkolde 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika
- Propilen oksitte 15 dakika

Dehidrate edilen doku parçaları daha sonra aşağıdaki solüsyonlar içerisinde immerse edildi :

Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika
Propilen oksit + gömme materyali 30 dakika

Bu işlemlerden sonra doku parçaları içerisinde yeni hazırlanmış gömme materyali (resin) bulunan tüplere alındı ve bir gece süreyle rotatorda karıştırıldı.

Gömme Materyali :

- Araldit CY 212 20 ml
- Sertleştirici HY 964 20 ml
- Hızlandırıcı DY 064 0.6 ml

- Plastikleştirici – Dibütil Fitalat 1 ml

Ertesi gün doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak 00 polietilen kapsüllere gömüldü ve 60º C etüvde 48 saat süreyle polimerize edildi. Daha sonra elde edilen bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Reichert Ultracut S ultramikrotomu ile 50 nm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere toplandı ve % 70'lik etil alkolde doymuş uranil asetat ve Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler, JEOL JEM 1400 transmisyon elektron mikroskobu (Japan) ile incelendi ve dijital resimleri elde edildi.

3.8. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Deneklerden elde edilen spinal kord doku parçaları serum fizyolojik içeren şişelere konuldu ve buz içerisinde muhafaza edildi. Daha sonra serum fizyolojik içerisinden çıkarılan dokular fosfat tamponu ile homojenize edilerek (homojenizat) santrifüj tüpü içerisine konuldu ve buz içerisinde saklandı. Sonra fosfat tamponu ile 1/10 oranında seyreltilen homojenizatlarda malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) ölçümleri yapıldı.

3.8.1. Malondialdehit (MDA) Analizi:

Homojenizatın pH:3,4'de aerobik koşullarda, tiobarbitürik asit ile 95°C'de inkübasyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin optik dansitesinin ölçümüyle malondialdehit miktarı saptandı ve hesaplamaları yapıldı[182].

3.8.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Analizi:

Homojenizatlarda, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin p-iyodonitrotetrazoliyum viyolet (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının optik dansitesinin okunması esasına dayanan randox kit yöntemi kullanılarak süperoksit dismutaz tayini yapıldı. Daha sonra ölçülen değerlerin hesaplamaları yapıldı[183].

3.9. İstatistik

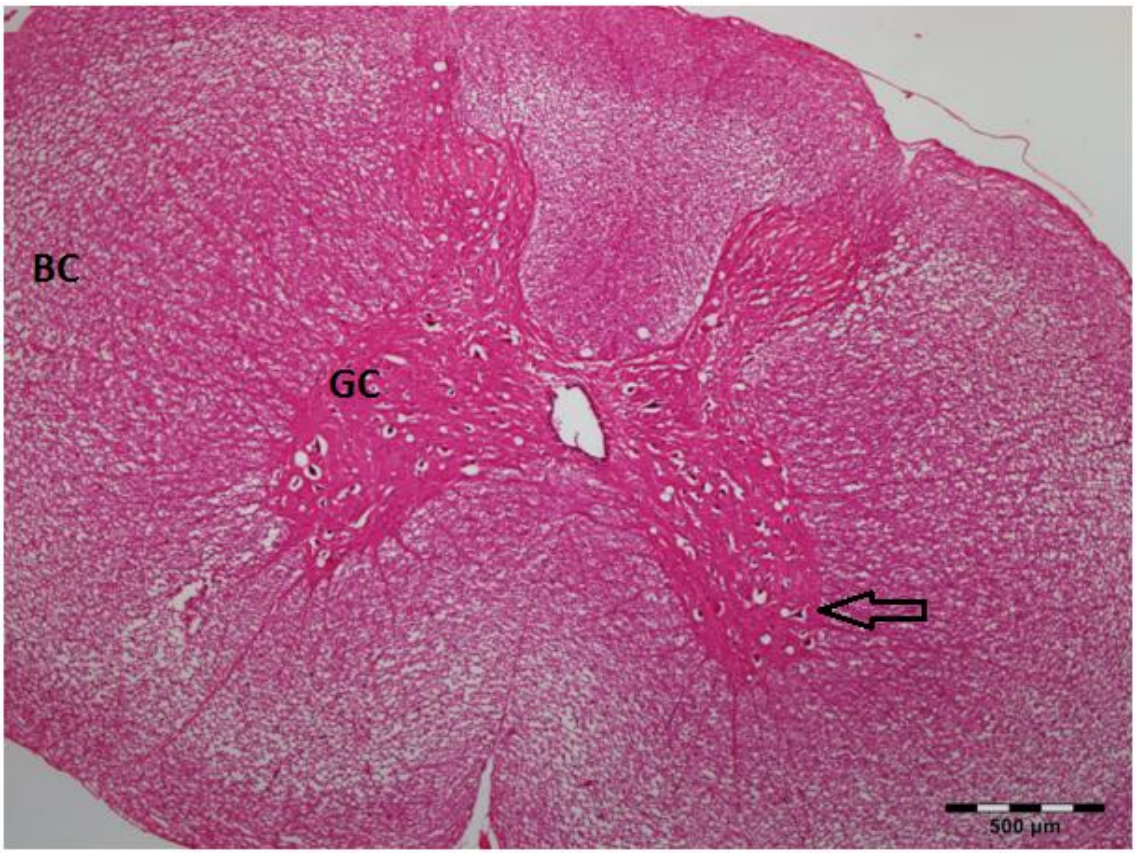
Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Karşılaştırma Bonferroni ve Tamhane testine göre yapıldı. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi ($p<0,05$). Değerler aritmetik ortalama (X) ± standart sapma şeklinde ifade edildi.

4. BULGULAR

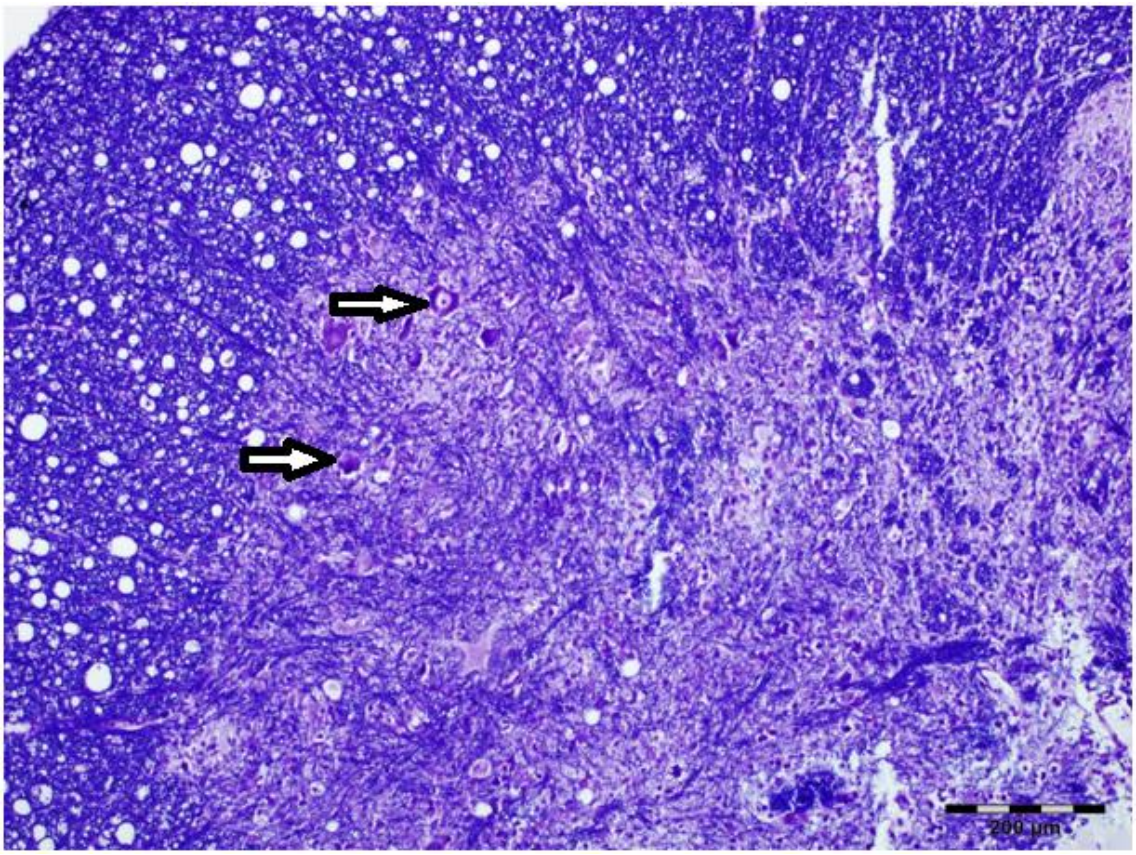
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular

4.1.1. Kontrol Grubu

Spinal kord travması oluşturulmayan, tamamen sağlam bırakılan bu gruba ait hayvanların spinal kord doku örneklerinin ışık mikroskobik incelenmesinde, spinal kordun dıştan bağ dokusu yapısındaki pia mater ile çevrili olduğu görüldü. Pia materin hemen altında yer alan ve spinal kordun dış kısmını oluşturan beyaz cevher yoğun olarak miyelinli sinir lifleri, glia hücreleri ve kan damarlarından oluşmaktaydı. Beyaz cevherin iç kısmında yer alan gri cevher ise nöron perikaryonları, çoğunluğunu miyelinli sinir liflerinin oluşturduğu aksonları, nöroglia hücrelerini ve kan damarlarını içermekteydi. Spinal kord ön boynuzunda yer alan motor nöronlar ve arka boynuzdaki duyu nöronları ayırt edilmekteydi. Gri cevherde yer alan nöron perikaryonları veziküler bir çekirdek ve geniş bir sitoplazmaya sahipti. Veziküler tipte hücre çekirdeğinin orta kısmında belirgin bir çekirdekçiğe sıklıkla rastlandı. Nöronların sitoplazmasında Nissl cisimcikleri belirgin olarak izlendi. Gri ve beyaz cevherde yer alan nöroglia hücreleri belirgin hiperkromatik boyanmış çekirdekleri ile ayırt edildi. Gri cevherin orta bölgesinde yer alan merkezi kanal ise silyalı kübik hücreler olan ependim hücreleri ile döşenmişti (Şekil 3 ve 4).



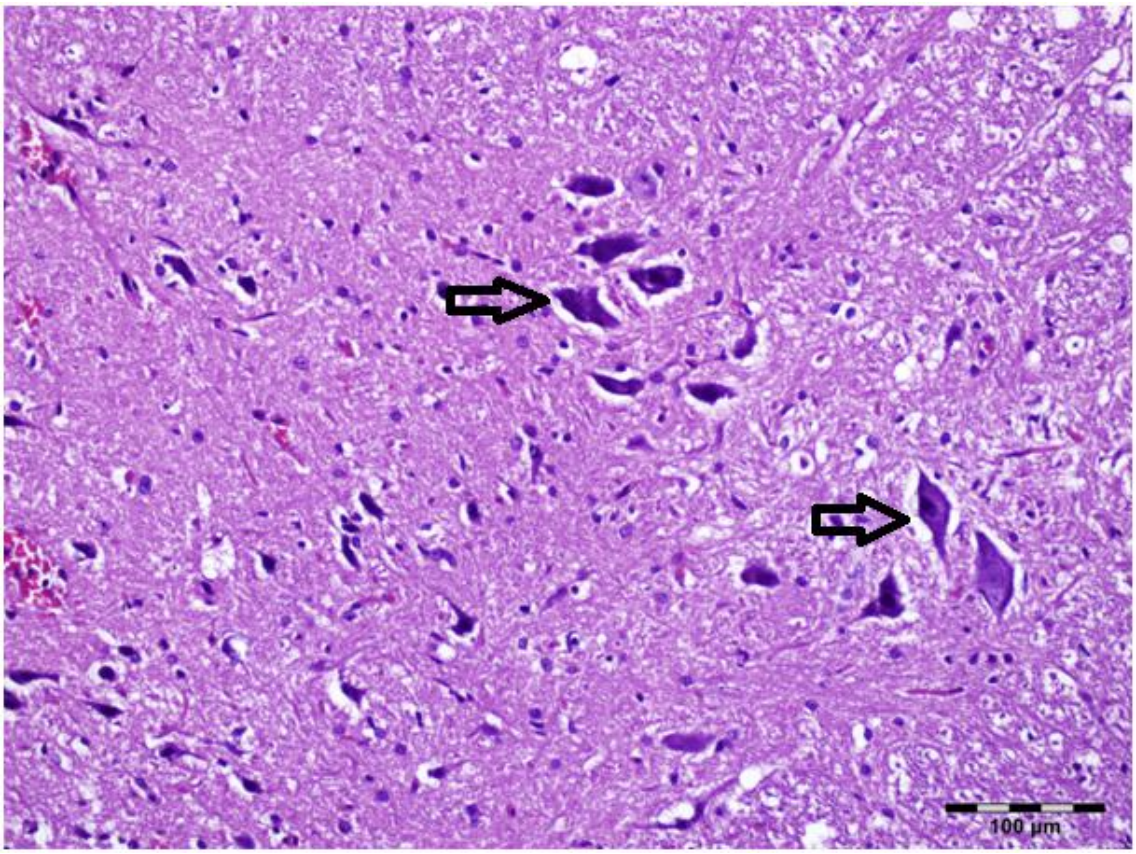
Şekil 3: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Spinal kord dokusu dıştan pia mater ile çevrilidir. Merkezde H harfi şeklinde gri cevher (GC), bunun da ortasında ependim hücreleri ile döşeli merkezi kanal, dışta da beyaz cevher izlenmektedir (BC). Gri cevherin ön boynuzunda yer alan motor nöronlar (ok) belirgin olarak görülmektedir. Bar= 500µm.



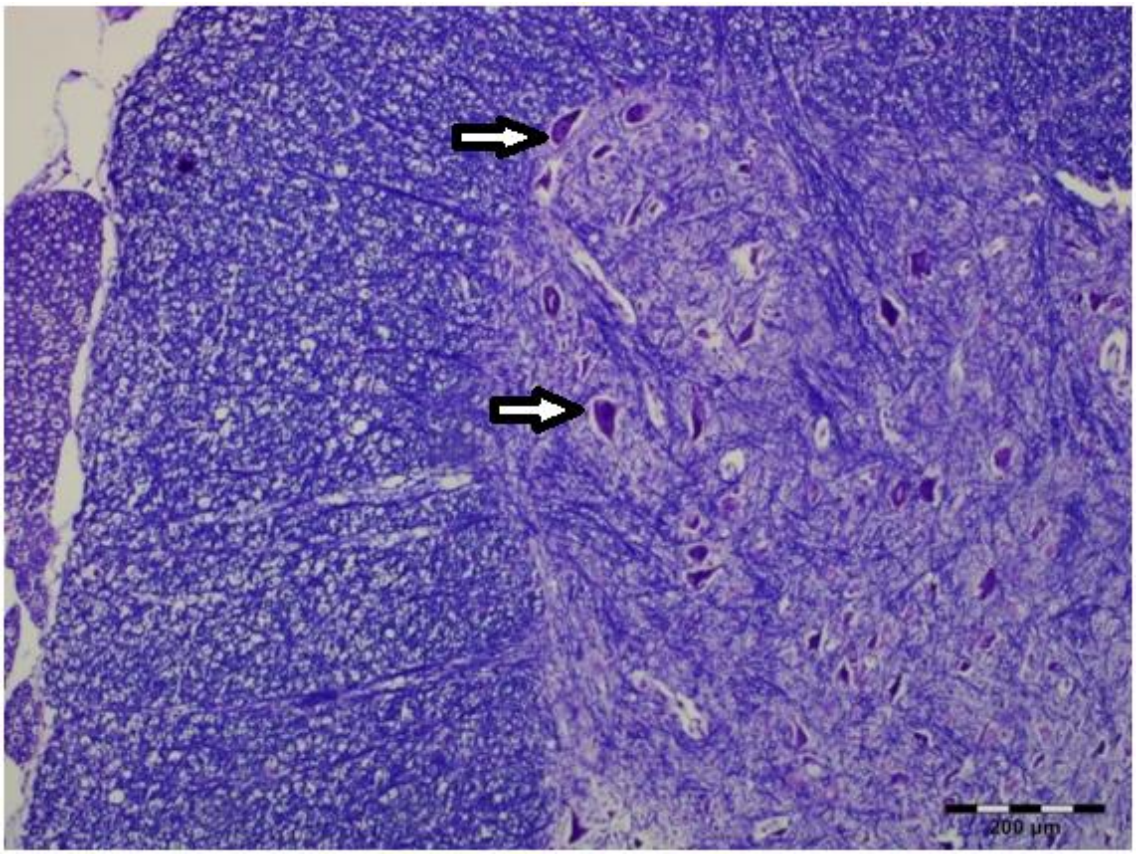
Şekil 4: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Spinal kord gri cevherindeki nöron perikaryonları (oklar), veziküler çekirdekleri ve belirgin çekirdekçikleri ile izlenmektedir. Sinir liflerinin etrafındaki miyelin kılıf mavi renge boyanmıştır. Gri cevherdeki miyelinsiz sinir lifleri pembe renkte izlenmektedir. Bar= 200µm.

4.1.2. Sham operasyon grubu

Spinal kord yaralanmasına maruz bırakılmayıp sadece laminektomi yapılan bu gruptaki sıçanlardan 24 ve 72. saatlerde alınan doku örneklerinin ışık mikroskobik incelenmesinde medulla spinalis yapısı tamamen normal kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi. Gri ve beyaz cevherden oluşan spinal kordun dıştan pia materle çevrili olduğu izlendi. Kordun merkezinde yer alan gri cevherde nöron perikaryonları, nöroglialar, sinir lifleri ve kan damarları ayırt edildi. Nöron perikaryonları, akson ve glia hücrelerinin histolojik yapılarının normal olduğu izlendi. Nöron perikaryonları veziküler çekirdekleri ve çekirdek merkezinde yer alan belirgin çekirdekçikleri ve sitoplazmalarında bulunan Nissl cisimcikleri ile ayırt edildi. Beyaz cevherde yer alan gliya hücreleri ve miyelinli sinir liflerinin de normal yapılarını korudukları izlendi (Şekil 5 ve 6).



Şekil 5: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Gri cevherdeki sinir hücre gövdeleri (oklar) koyu mor renkte boyanmıştır. Hücre çekirdekleri veziküler tipte olup açık renkte boyanmıştır ve merkezi bölgesinde çekirdekçik içermektedir. Gliya hücreleri hem gri hem de beyaz cevherde koyu mor renkte boyanmış küçük çekirdekleri ile ayırt edilmektedir. Bar= 100µm.

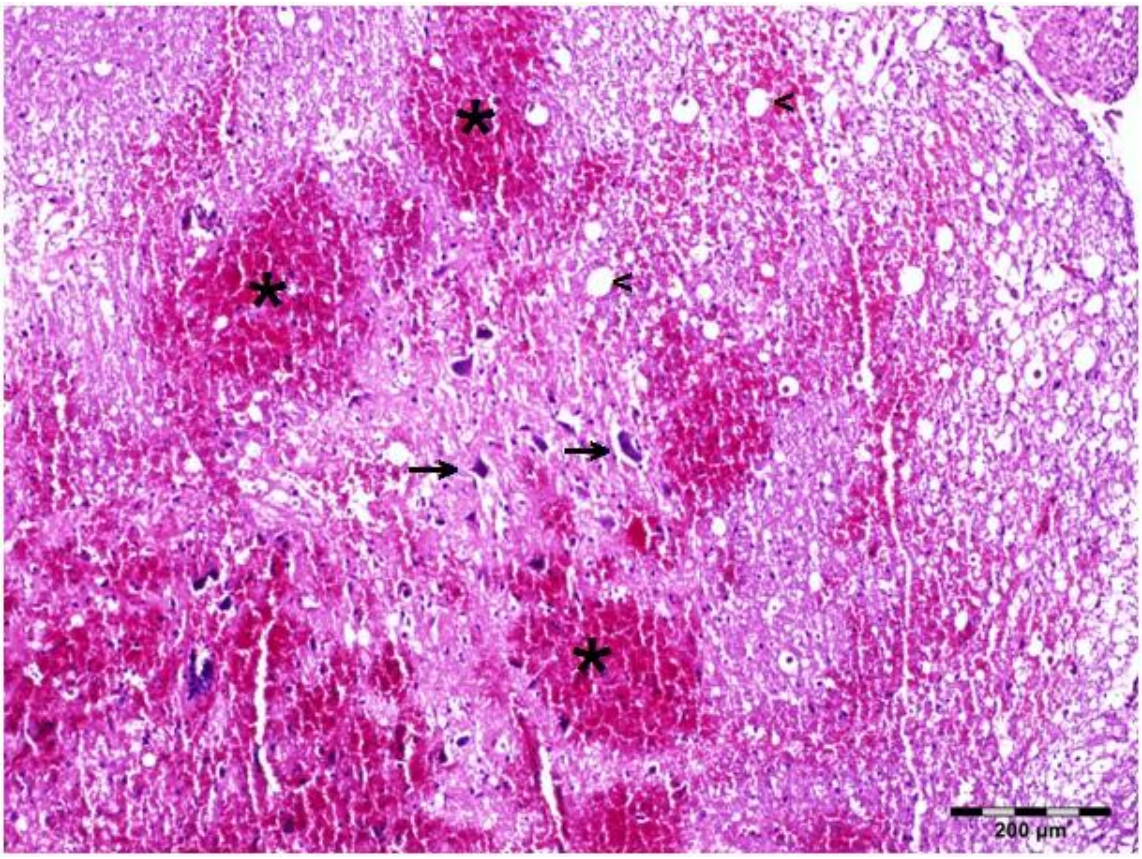


Şekil 6: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord doku örneğinin ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Gri cevherdeki nöron perikaryonları koyu mor renkte, miyelinsiz sinir lifleri pembe renkte izlenmektedir. Beyaz cevherde bulunan miyelinli sinir liflerinin etrafındaki miyelin kılıf koyu mavi renkte boyanmıştır. Bar= 200µm.

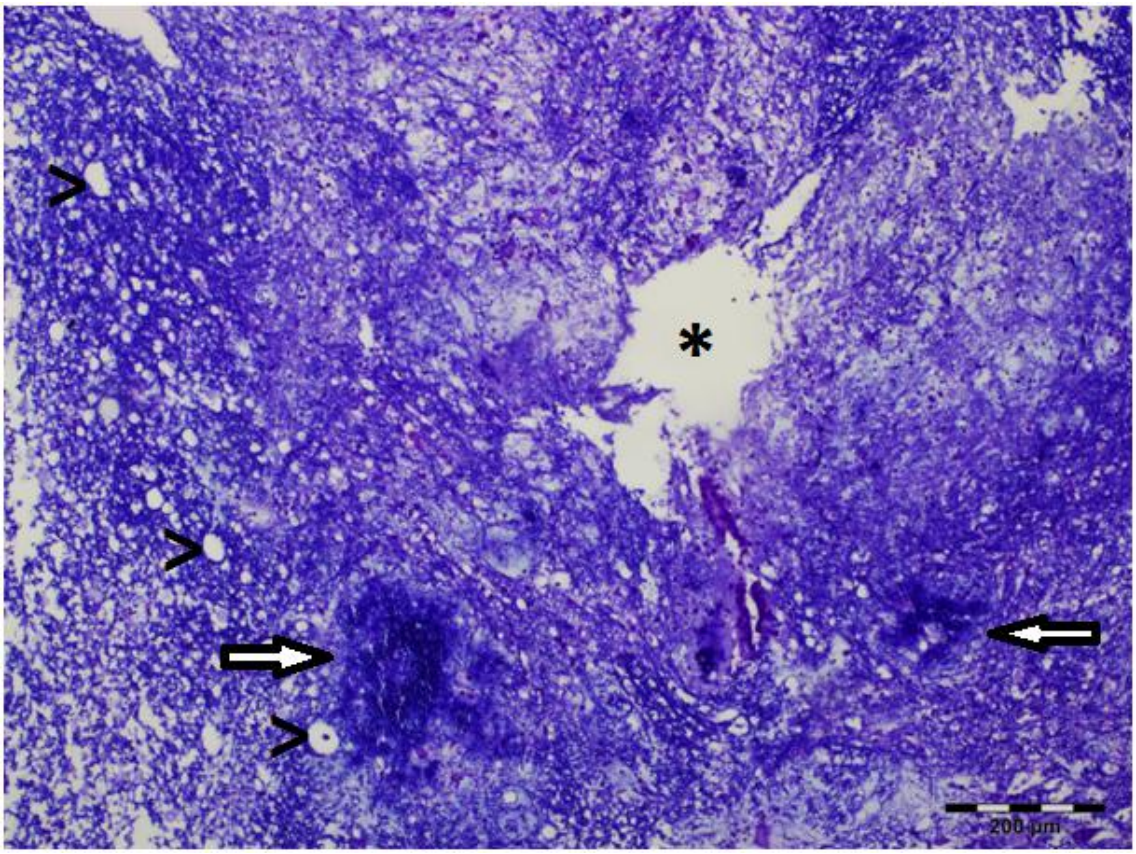
4.1.3. Deney Kontrol Grubu

Spinal kordda T2-T7 arasında klip kompresyon yöntemi ile spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra hiçbir tedavi yöntemi uygulanmayıp serum fizyolojik verilen gruba ait deneklere ait spinal kord doku örnekleri ışık mikroskobik değerlendirmeler için yaralanmadan sonra 24. ve 72. saatlerde elde edildi. Yaralanma sonrası 24. saatte elde edilen deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularının ışık mikroskobik incelemelerinde gri ve beyaz cevherin genel histolojik yapıları, nöronlar, glia hücreleri, sinir lifleri ve miyelin kılıf yapılarındaki değişiklikler dikkate alındı. Bu gruba ait hayvanlarda, spinal kord gri cevherinde önemli boyutta ve miktarda kavitasyon alanları dikkati çekmiştir. Gri cevherde nöron gövdelerinde belirgin bir bozulmanın olduğu, çekirdekte kromatin yoğulaşması ve sitoplazmada büzüşmenin varlığı dikkati çekti. Bunun yanısıra hem gri cevherde hem de beyaz cevherde ödem ve hemorajik alanların varlığı izlendi. Özellikle beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde önemli miktarda miyelin kayıplarına rastlandı. Miyelin kayıplarının yoğun olduğu alanlarda dejenere olan akson ve miyelin kılıf artıklarını fagosite etmek üzere makrofajların ve mikroglial hücrelerinin artmış oldukları dikkati çekti (Şekil 7 ve 8).

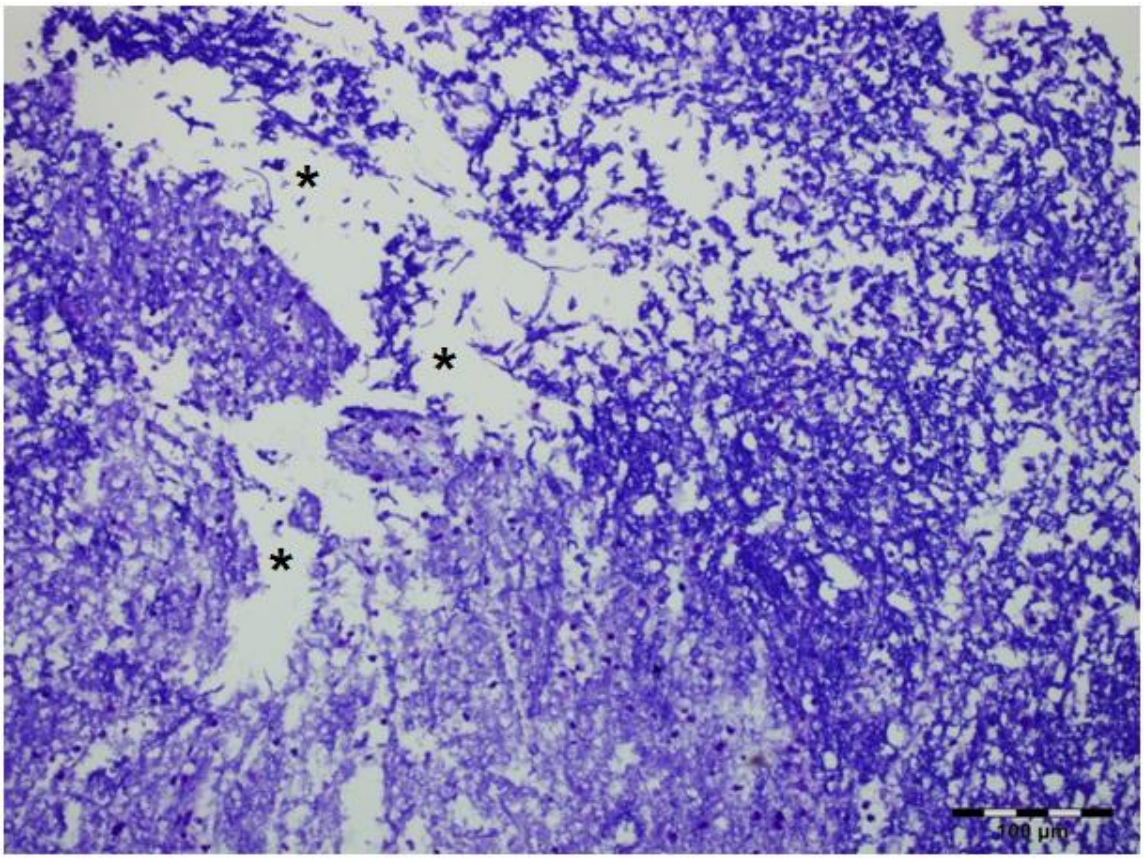
Deney kontrol grubuna ait hayvanlardan yaralanma sonrası 72. saatte edilen doku örneklerinin ışık mikroskobik değerlendirilmesinde, gri ve beyaz cevherde ödematöz ve hemorajik alanların varlığı 24 saatlik gruba benzer şekilde bu grupta da izlendi. Gri cevherde nöronlarda oluşan dejeneratif değişiklikler bu grupta daha belirgindi. Normal görünümlü nöron sayılarının azaldığı, yapısal değişiklik gösteren nöronların çoğunluğu oluşturdukları dikkati çekmekteydi. Nöronlarda özellikle çekirdekte kromatin kümeleşmesi, sitoplazmada bazofiliya azalması ve düzensizlik gözlenmekteydi. Gri ve özellikle de beyaz cevherde aksonlarda oluşan yapısal bozukluklar dikkat çekiciydi. Miyelinli aksonlarda, miyelin kılıfta yapısal bozukluklar ve miyelin kılıf kayıpları yaygın olarak izlendi (Şekil 9).



Şekil 7: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Spinal kordda şiddetli hemorajik alanlar (*) izlenmektedir. Nöron gövdelerinde dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Ödematöz alanlar okbaşı ile gösterilmiştir. Bar= 200 µm.



Şekil 8: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Gri cevherde yoğun kavitasyon alanları (*) görülmektedir. Özellikle gri cevherde olmak üzere hemorajik alanların (oklar) varlığı izlenmektedir. Yaygın ödem alanlarının (ok başları) mevcut olduğu görülmektedir. Bar= 200µm.

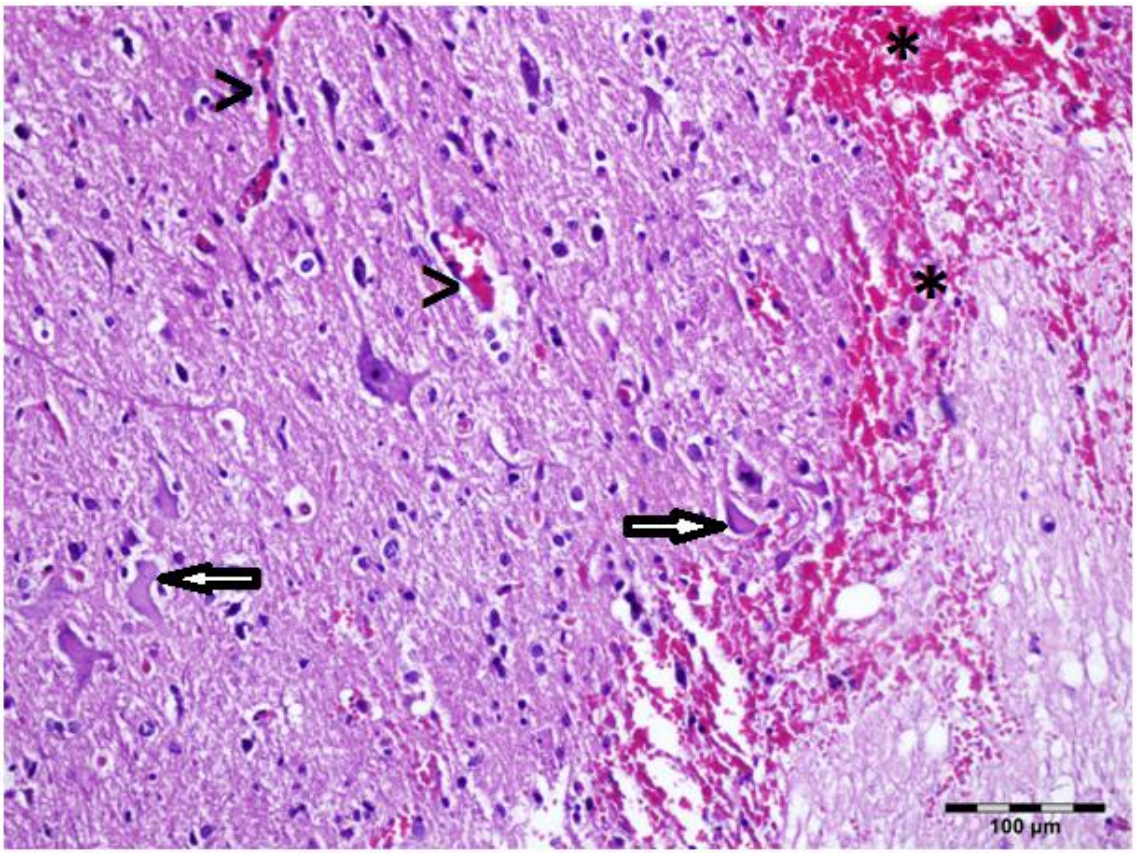


Şekil 9: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver-Barrera. Şiddetli miyelin kaybı gösteren bölgelerin (*) varlığı görülmektedir. Miyelin kayıplarının olduğu bölgelerde makrofajların bulunduğu dikkati çekmektedir. Bar= 100µm.

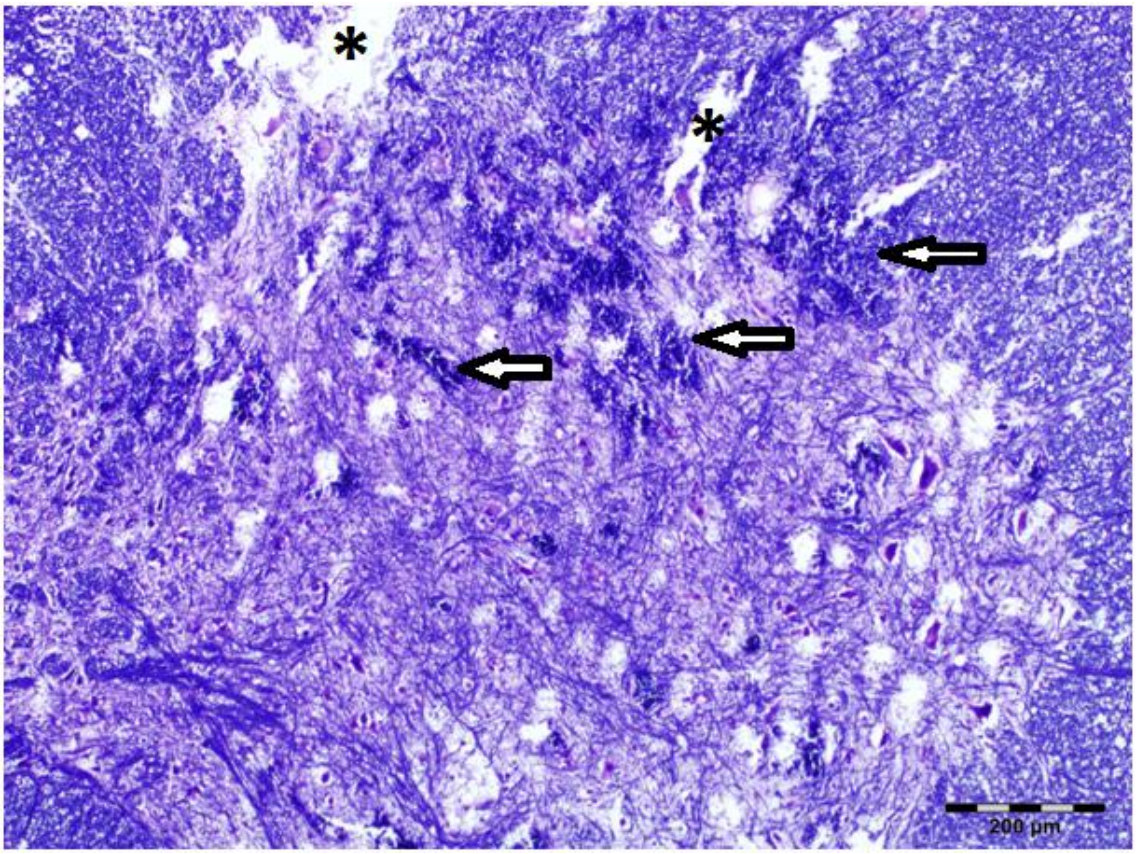
4.1.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup

Spinal kord yaralanmasını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan gruba ait doku örnekleri ışık mikroskobik inceleme amacıyla 24. ve 72. saatlerde elde edildi. 24 saatlik metilprednizolon grubunda spinal kordda yaralanma ile birlikte meydana gelen dejeneratif değişikliklerin, deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı ölçüde azalmış olduğu dikkati çekti. Özellikle kavitasyon alanları önemli oranda azalmıştı. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde hafif ödematöz bölgeler ve hemoraji görülmekle birlikte, bu dejeneratif değişikliklerin özellikle hiçbir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna kıyasla daha sınırlı olduğu görüldü. Nöron perikaryonları ve sinir lifleri bazı bölgelerde dejeneratif değişiklikler göstermekle birlikte bu değişiklikler kontrol grubuna oranla anlamlı derecede azalmıştı. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf bozuklukları ve aksonal harabiyet bu grupta da belirgindi (Şekil 10 ve 11).

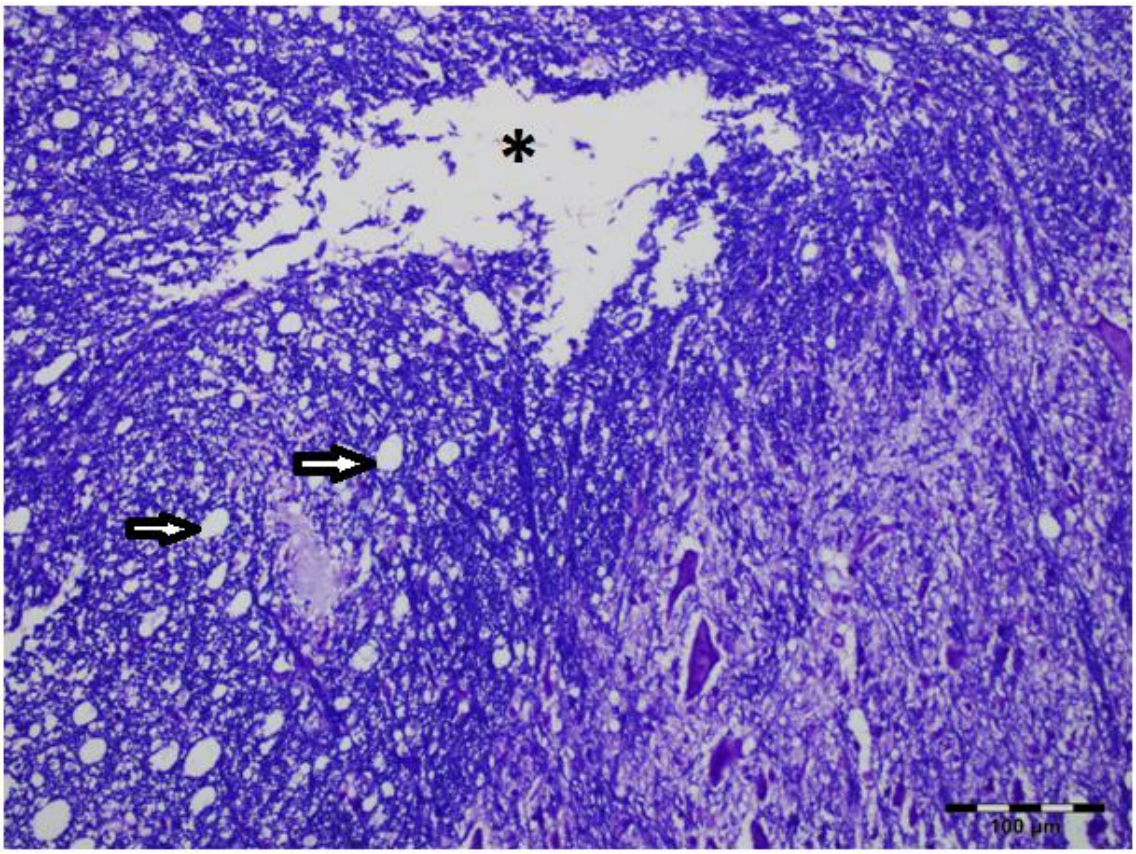
Metilprednizolon tedavisini takiben 72. saatte alınan doku örneklerinin ışık mikroskobik incelenmelerinde de 24 saatlik gruba yakın bulguların varlığı görüldü. Bu grupta da kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarında deney kontrol grubuna göre belirgin bir azalmanın olduğu, nöron ve sinir liflerinde yapısal değişiklikler görülmesine rağmen, tedavi edilmeyen gruba oranla, bu değişikliklerin daha hafif seyrettiği dikkati çekti. Beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf kaybı, 24 saatlik gruba benzer şekilde, bu grupta da belirgindi. Bununla birlikte fagositik hücreler olan makrofaj ve mikrogliya yoğunluğunun azalması enflamatuvar cevabın azaldığına kanıt olarak kabul edildi (Şekil 12).



Şekil 10: Metilprednizolon grubundan 24. saatte spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Hemorajik alanlar (*) ile işaretli bölgelerde izlenmektedir. Sinir hücre perikaryonlarında dejeneratif değişiklikler ok ile işaretli bölgelerde görülmektedir. Kapiller damarlar ok başları ile gösterilmiştir. Bar= 100µm.



Şekil 11: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Ok ile işaretli bölgelerde hemoraji alanları izlenmektedir. Gri cevherde sinir hücre perikaryonlarının dejeneratif değişiklikler gösterdiği görülmektedir. Sinir liflerinde miyelin kayıpları ve ödematöz alanlar (*) ile gösterilmiştir. Bar= 200µm.

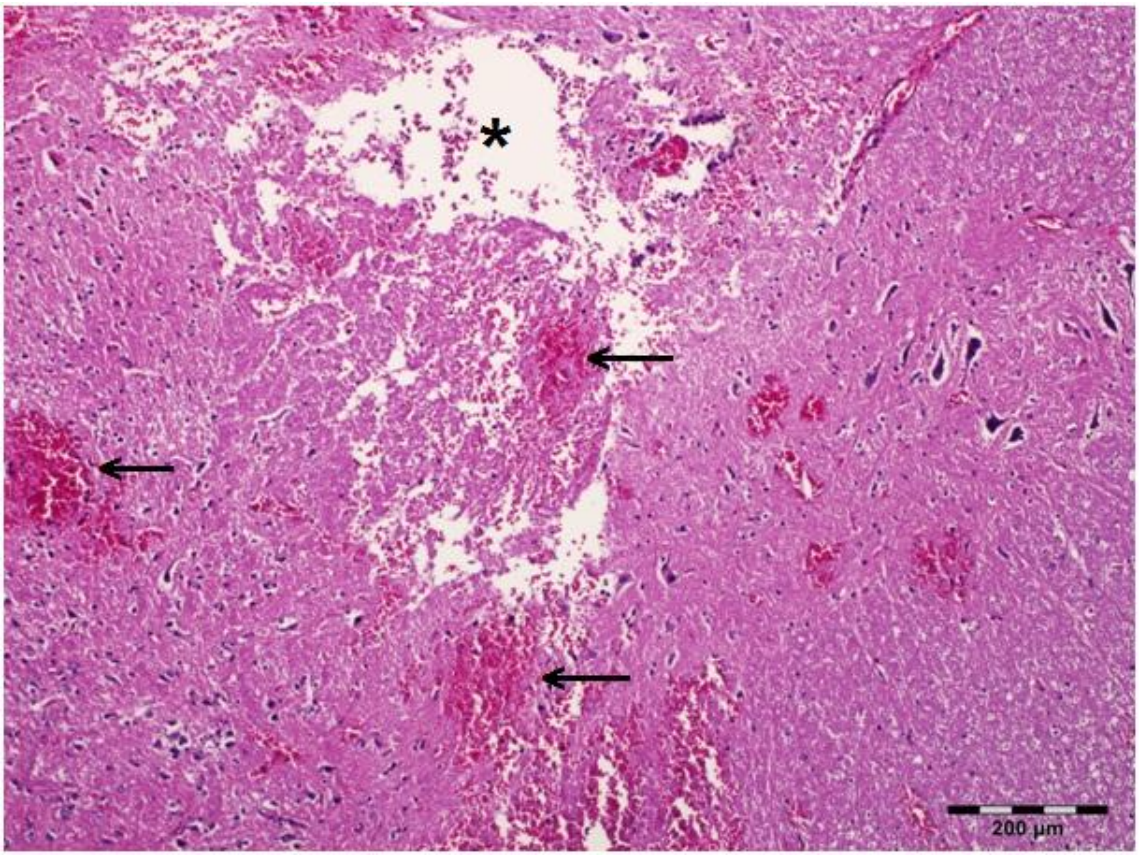


Şekil 12: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Ödematöz alanlar oklar ile gösterilmiştir. Sinir hücre perikaryonları hafif dejeneratif değişiklikler göstermektedir. Miyelinli liflerde harabiyetin varlığı izlenmektedir. Kavitasyon alanları (*) ile işaretli bölgelerde görülmektedir. Bar= 100µm.

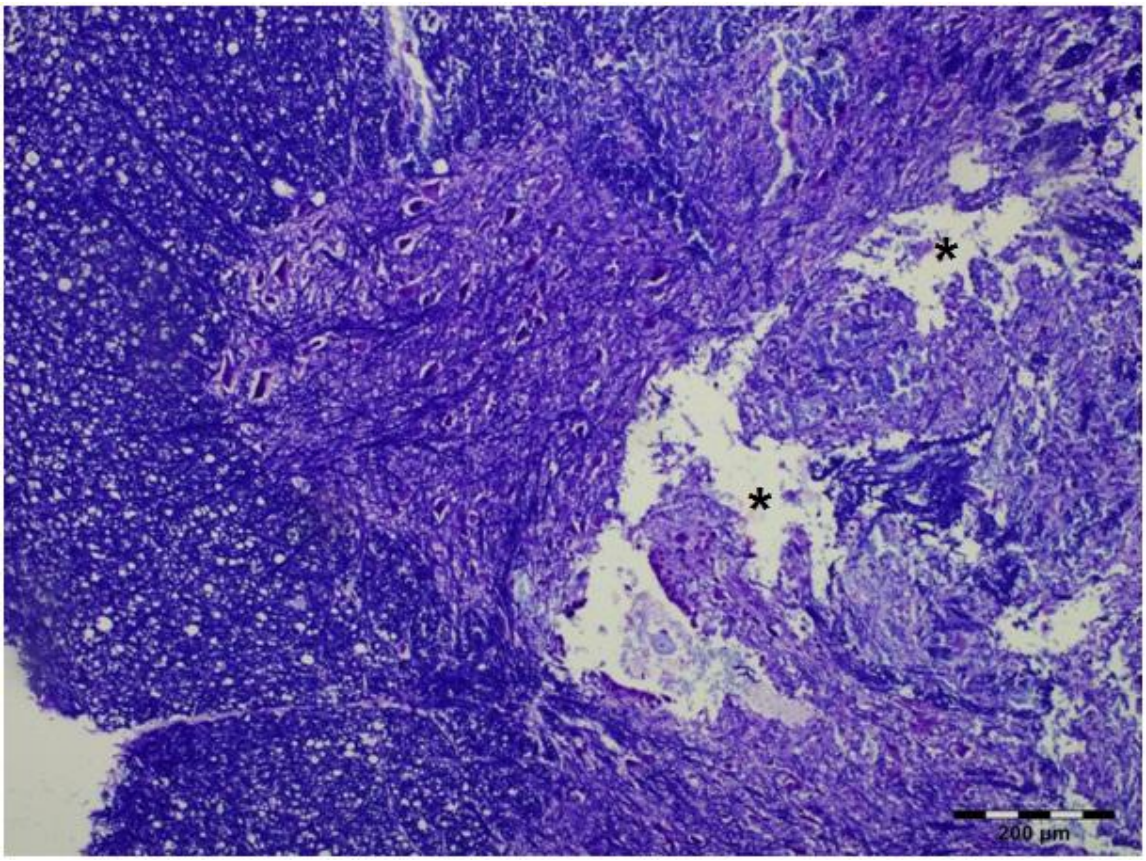
4.1.5. Minosiklin tedavisi uygulanan grup

Spinal kord hasarından sonra minosiklin tedavisi uygulanan hayvanlardan ışık mikroskobik incelemeler için 24 ve 72. saatlerde spinal kord dokuları elde edildi. Yaralanmayı takiben 24 saat minosiklin tedavisi uygulanan grupta, kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarına rastlandı. Ödematöz değişikliklerin özellikle gri cevherde, nöron perikaryonu ve sinir liflerinde yoğun olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte, bu grupta da tedavi edilmeyen deney kontrol grubuna oranla, gri cevherde daha fazla nöronun varlığı ilgi çekici bulundu. Beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde aşırı miyelin kılıf kaybı ile akson harabiyeti varlığını sürdürmekteydi (Şekil 13 ve 14).

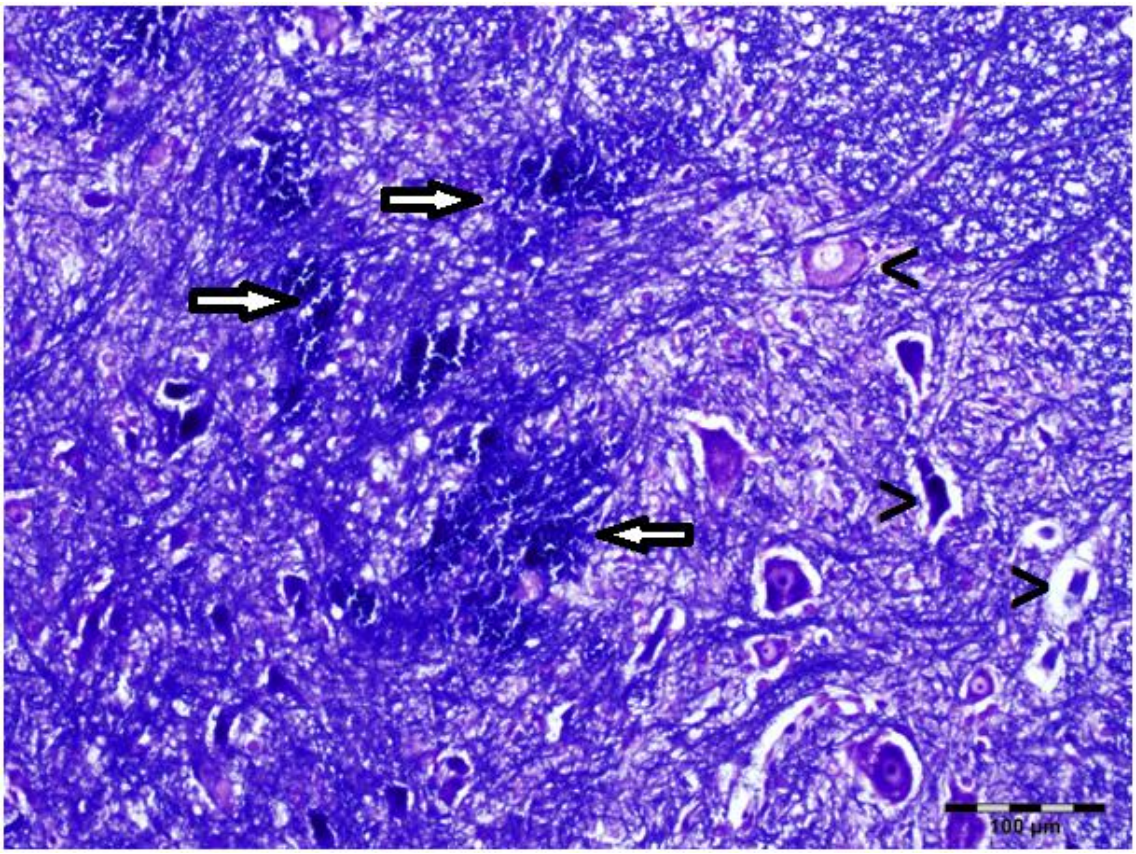
Spinal kord yaralanmasından sonra minosiklin tedavisi uygulanan hayvanlardan 72. saatte alınan spinal kord doku örneklerinin ışık mikroskobik incelenmesinde hemoraji ve ödem alanlarının varlığına rastlansa da, bu alanların 24 saatlik minosiklin grubuna oranla nispeten azalmış olduğu dikkati çekti. Gri cevherdeki nöron perikaryonlarında dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte bu değişikliklerin deney kontrol grubuna oranla nispeten azalmış olduğu görüldü. Gri ve beyaz cevherde aksonlarda dejenerasyon ve miyelin kayıpları görülmesine rağmen, bu yapısal değişikliklerin tedavi edilmeyen deney kontrol grubuna oranla azalmış olduğu dikkati çekti (Şekil 15).



Şekil 13: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Gri cevherdeki nöronlarda dejeneratif değişiklikler, yoğun kavitasyon (*) ve hemoraji alanları (oklar) gösterilmiştir. Bar= 200µm.



Şekil 14: Minosiklin tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Gri cevherde yoğun kavitasyon alanları (*) ile gösterilmiştir. Gri ve beyaz cevherde ödem alanları ve aksonal harabiyet izlenmektedir. Bar= 200µm.

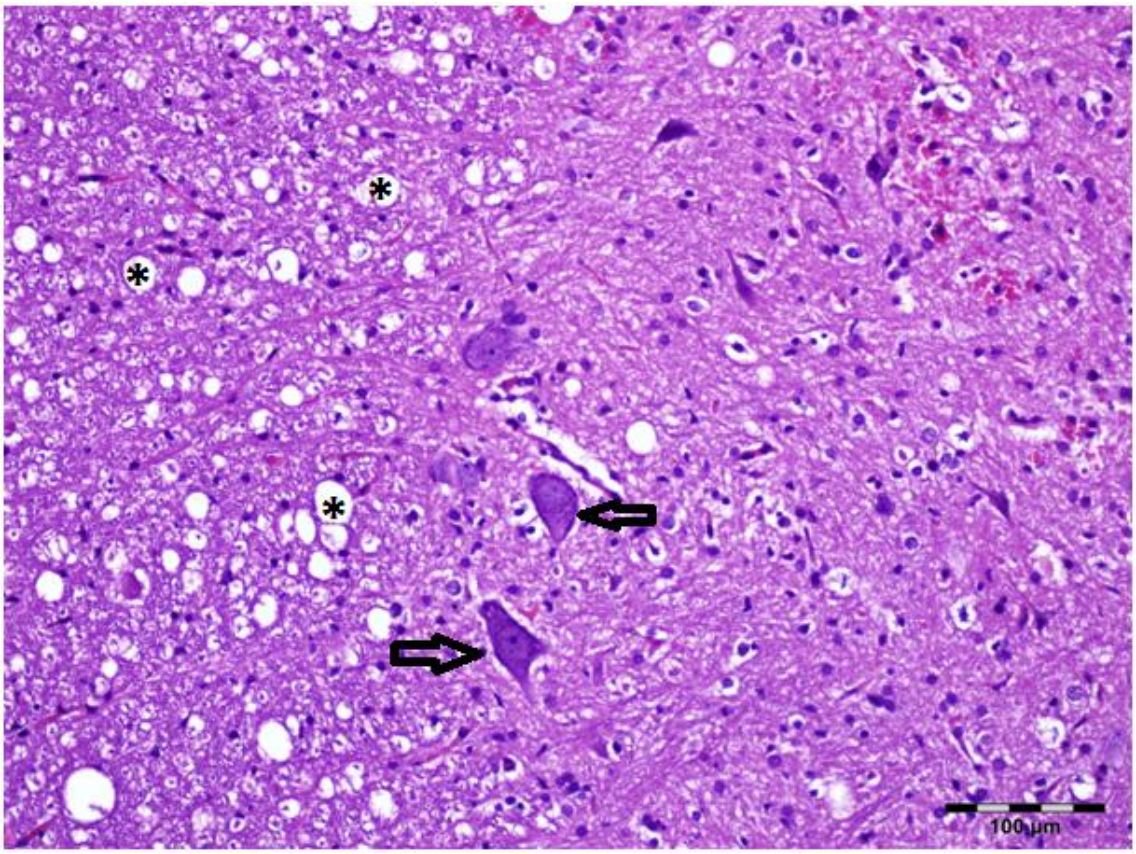


Şekil 15: Minosiklin grubundan 72 saat sonra alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Şiddetli hemorajinin varlığı ok ile işaretli alanlarda ile izlenmektedir. Nöronlarda dejeneratif değişiklikler ok başları ile gösterilmiştir. Bar= 100µm.

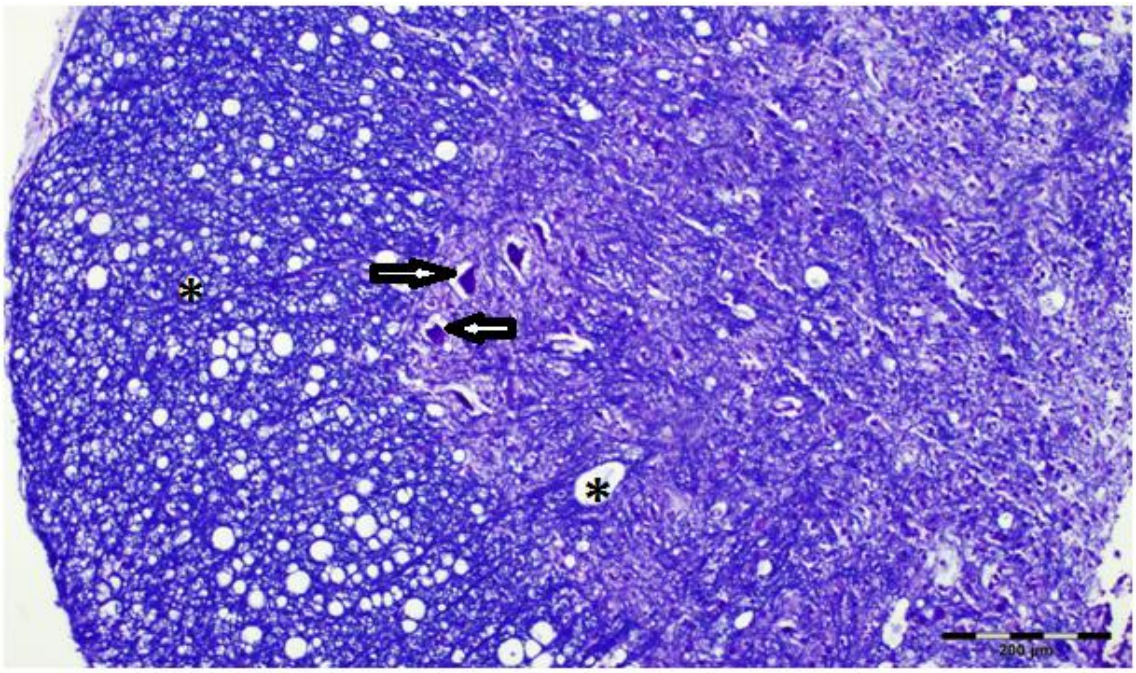
4.1.6. Metilprednizolon+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan grup

Spinal kord yaralanmasını takiben metilprednizolon ve minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruba ait hayvanlardan spinal kord doku örnekleri yaralanmadan sonra 24 ve 72. saatlerde elde edildi. 24 saatlik kombine tedavi grubunda spinal kordda gri ve beyaz cevherde kavitasyon, ödem ve hemorajinin tek başına tedavi edilen diğer grupların verilerine göre önemli ölçüde azalmış olduğu dikkati çekti. Gri cevherde yer alan nöronlarda çekirdek ve sitoplazmada hafif yapısal değişiklikler bu grupta da izlenmekteydi. Gri ve beyaz cevherdeki glia hücreleri de normal yapıda izlendi. Beyaz cevherdeki aksonlarda miyelin kılıf kayıplarının sadece metilprednizolon ve sadece minosiklin ile tedavi edilen gruplara ve deney kontrol grubuna oranla azalmış olduğu görüldü. Bunların yanısıra mikroglialar, makrofajlar ve lökositler gibi enflamatuvar hücrelerin de sayıca azalmış oldukları dikkati çekmekteydi (Şekil 16 ve 17).

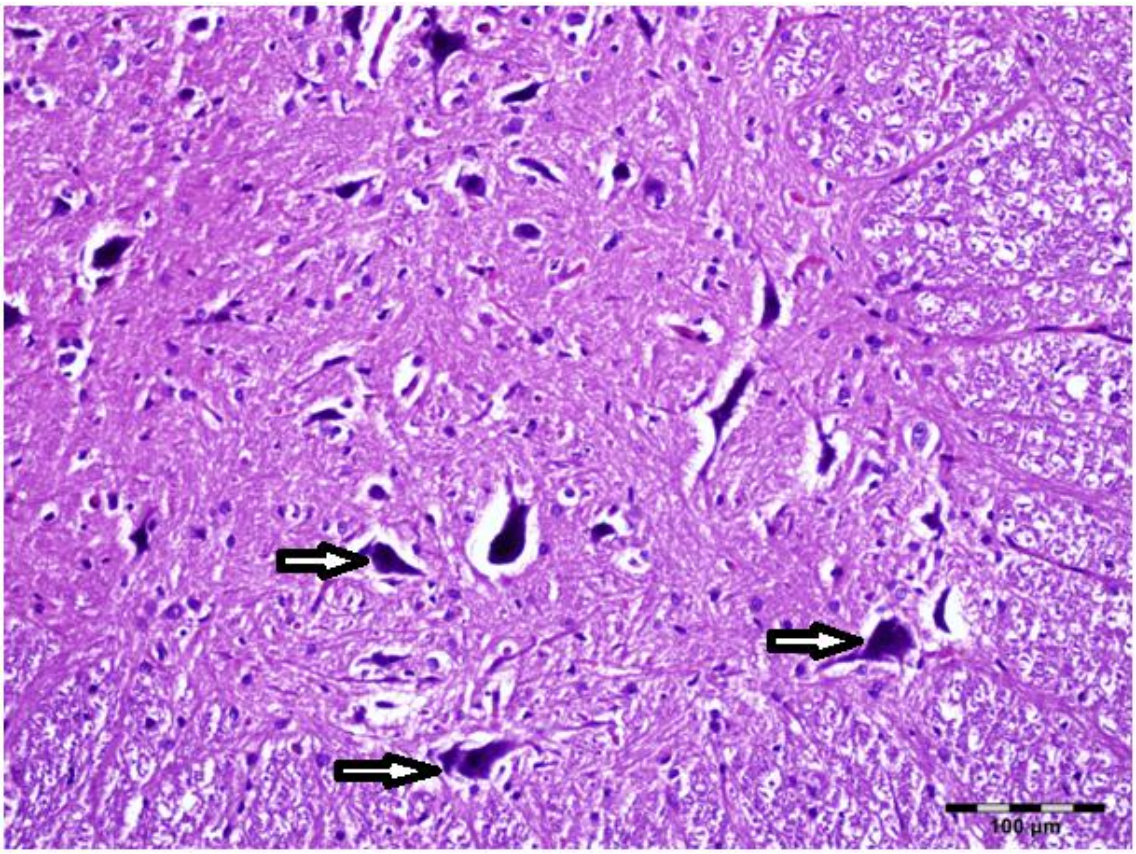
Metilprednizolon ve minosiklin kombine tedavisi uygulanan 72 saatlik grubun ışık mikroskobik değerlendirilmesinde, 24 saatlik kombine tedavi grubuna benzer olarak, spinal kord gri ve beyaz cevherinde normal histolojik yapının genellikle korunmuş olduğu dikkati çekti. Nöron gövdeleri, glia hücreleri ve sinir lifleri fokal yapısal değişiklikler göstermekle birlikte sıklıkla normal yapıdaydı. Kavitasyon ve ödem alanları diğer gruplara oranla anlamlı ölçüde azalmıştı ve hemorajik alanlara çok nadiren rastlanmaktaydı. Makrofajların ve lökositlerin çok az sayıda bulunmaları, enflamatuvar reaksiyonların bu grupta belirgin olarak azaldığının göstergesi olarak değerlendirildi (Şekil 18).



Şekil 16: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. Saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Nöron gövdeleri (oklar), miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri genel olarak normal histolojik yapısını korumaktadır. Hemoraji ve kavitasyon alanları azalmıştır. Ödematöz alanlar (*) ile gösterilmiştir. Bar= 100µm.



Şekil 17: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görünümü. Boya: Kluver Barrera. Gri cevherdeki nöron gövdeleri birçok alanda normal histolojik yapılarını korumaktadır. Ödem (*), kavitasyon ve hemoraji alanları azalmıştır. Sinir hücre gövdeleri ok başları ile gösterilmiştir. Bar= 200µm.

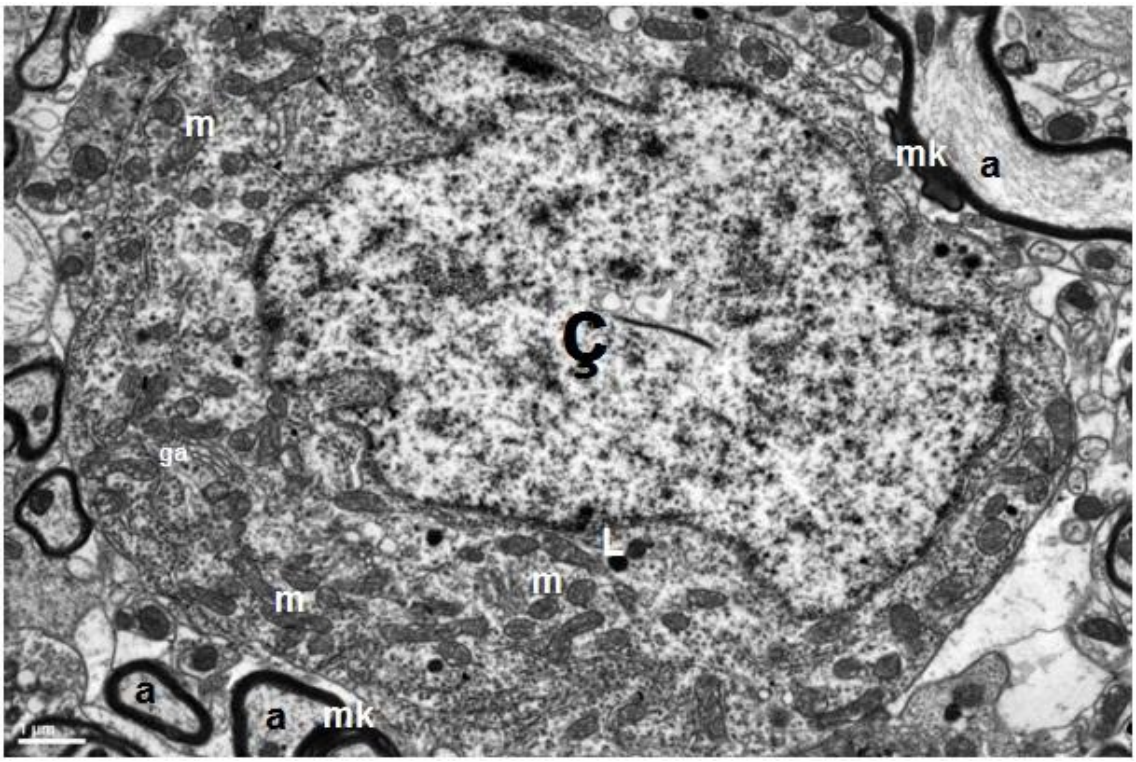


Şekil 18: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 72. Saatte alınan spinal kord dokusunun ışık mikroskobik görüntüsü. Boya: Hematoksilen-Eozin. Gri cevherde kavitasyon ve hemoraji alanları belirgin bir şekilde azalmıştır. Nöron gövdelerinin (oklar) ve sinir liflerinin normal histolojik yapılarını birçok alanda korumuş oldukları izlenmektedir. Bar= 100µm.

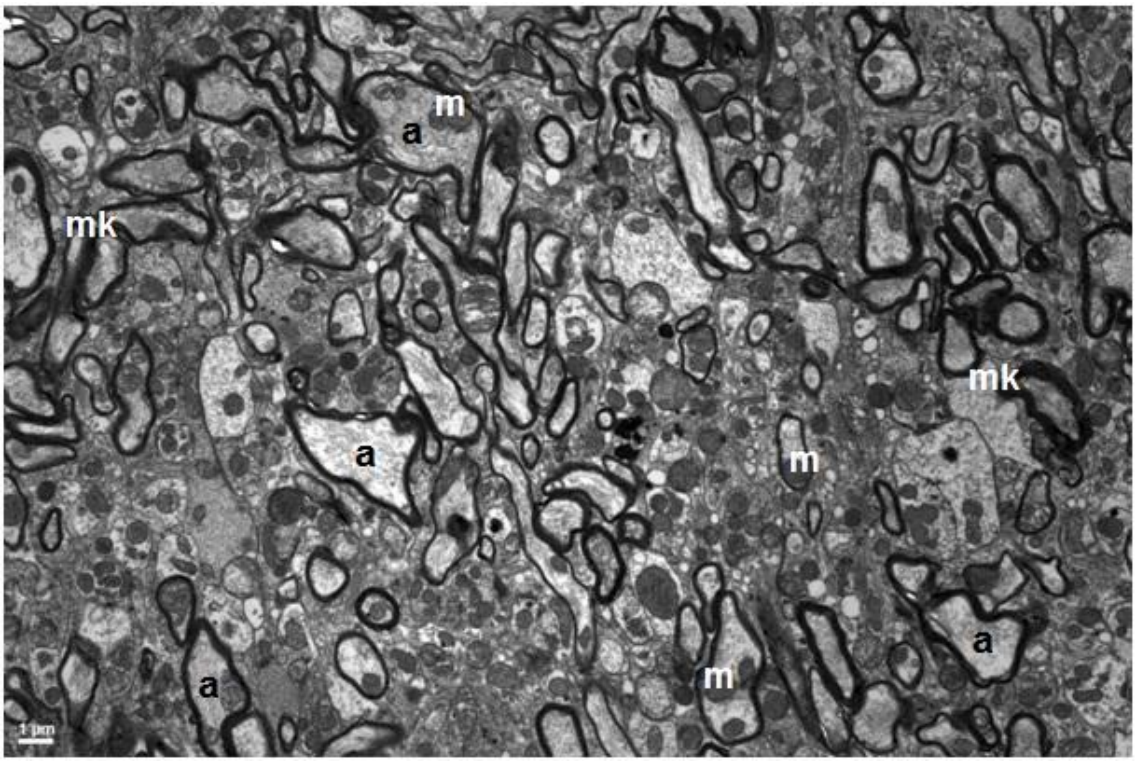
4.2. Elektron Mikroskobik Bulgular

4.2.1. Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanması oluşturulmayan, tamamen normal deneklerden oluşan bu gruba ait spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde gri cevherdeki sinir hücre gövdeleri, miyelinsiz sinir lifleri ve glia hücreleri ile birlikte, beyaz cevherdeki miyelinli aksonlar ve glia hücrelerinin ince yapıları değerlendirildi. Gri cevherde yer alan sinir hücresi perikaryonlarının çekirdek ve bunun etrafını çevreleyen perinüklear sitoplazmadan oluştuğu görüldü. Sferikal olan hücre çekirdeği hücrenin merkezinde yerleşmişti. Veziküler tipteki çekirdek içerisinde iyi ayırt edilebilen bir veya birden fazla çekirdekçiğin varlığı izlenmekteydi. Nöron sitoplazmasında bulunan mitokondriyonların genellikle ovoid veya yuvarlak şekilli oldukları, hem transvers hem de longitudinal tipte kristalara sahip oldukları ayırt edildi. Perinüklear yerleşim gösteren Golgi kompleksi oldukça fazla sayıda, bütün perikaryona dağılmış halde izlendi. Perikaryonun karakteristik bir özelliği olan Nissl cisimciklerinin yaygın olduğu dikkati çekti. Nissl cisimciklerinin, granüler endoplazmik retikülüm ve serbest ribozomlardan oluşan topluluklar olduğu görüldü. Nöron sitoplazması içerisinde ayrıca agranüler (düz) endoplazmik retikülüm sisternaları ve lizozomlar da bulunmaktaydı. Bunların yanında, sitoplazmasında ayrıca yaygın olarak nörotübül ve nörofilamanlar bulunmaktaydı. Nörotübül ve nörofilamanların akson ve dendritler içerisine doğru uzandıkları görülmekteydi (Şekil 19). Spinal kord gri ve beyaz cevherinde yerleşen nöroglia hücrelerinin genellikle sferikal veya ovoid bir çekirdeğe ve çekirdeği çevreleyen perinüklear ince bir sitoplazmik halkaya sahip oldukları görüldü. Sitoplazmalarında mitokondriyonlar, Golgi kompleksi, mikrotübüller, birkaç serbest ribozom ve granüler endoplazmik retikulum içerdikleri izlendi. Miyelinli sinir liflerinde oligodendrositlerce yapılan miyelin kılıfın düzenli bir lamellar yapıya sahip olduğu izlendi. Akson sitoplazmalarında, mitokondriyonlar, birkaç SER elemanı, nörotübül ve nörofilamanlar dikkati çekti. Kan damarları hem gri hem de beyaz cevherde yaygın bir şekilde bulunmaktaydı. (Şekil 20).



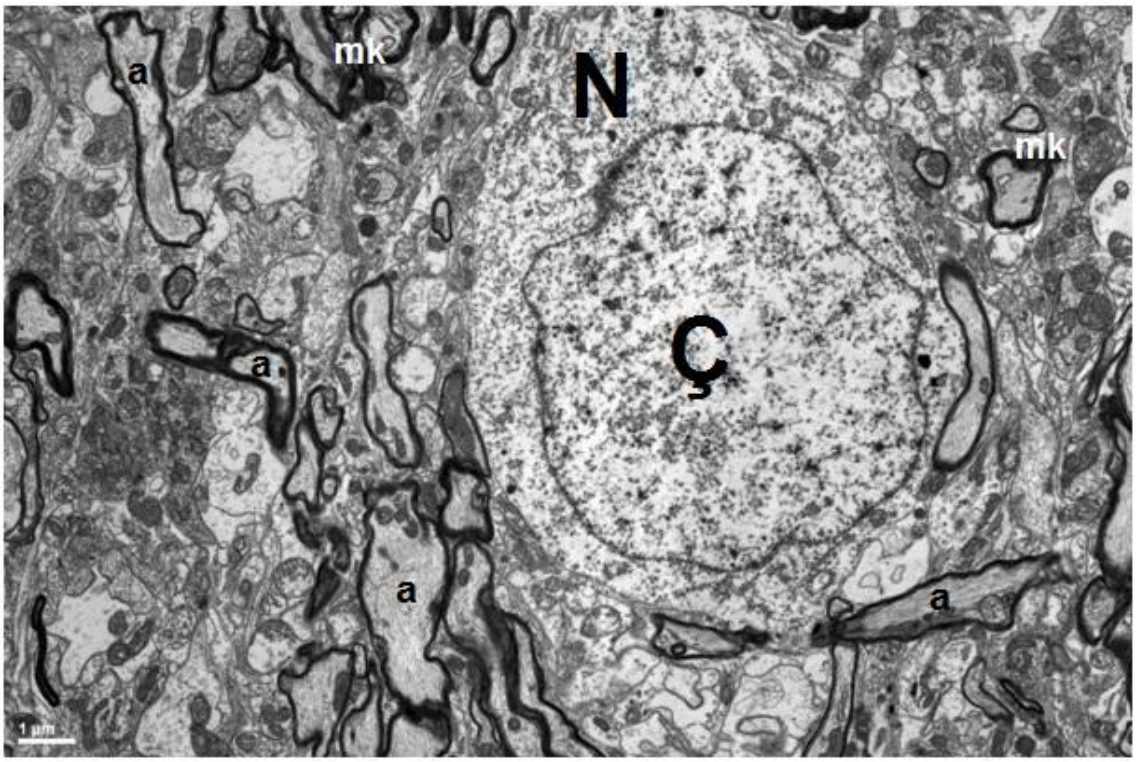
Şekil 19: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Sinir hücresi perikaryonunun çekirdek (Ç) ve sitoplazmasıyla tamamen normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Sitoplazmada normal yapıda granüler endoplazmik retikülüm (GER), golgi kompleksi (ga) mitokondriyonlar (m) ve lizozomlar izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Bar= 1 μm.



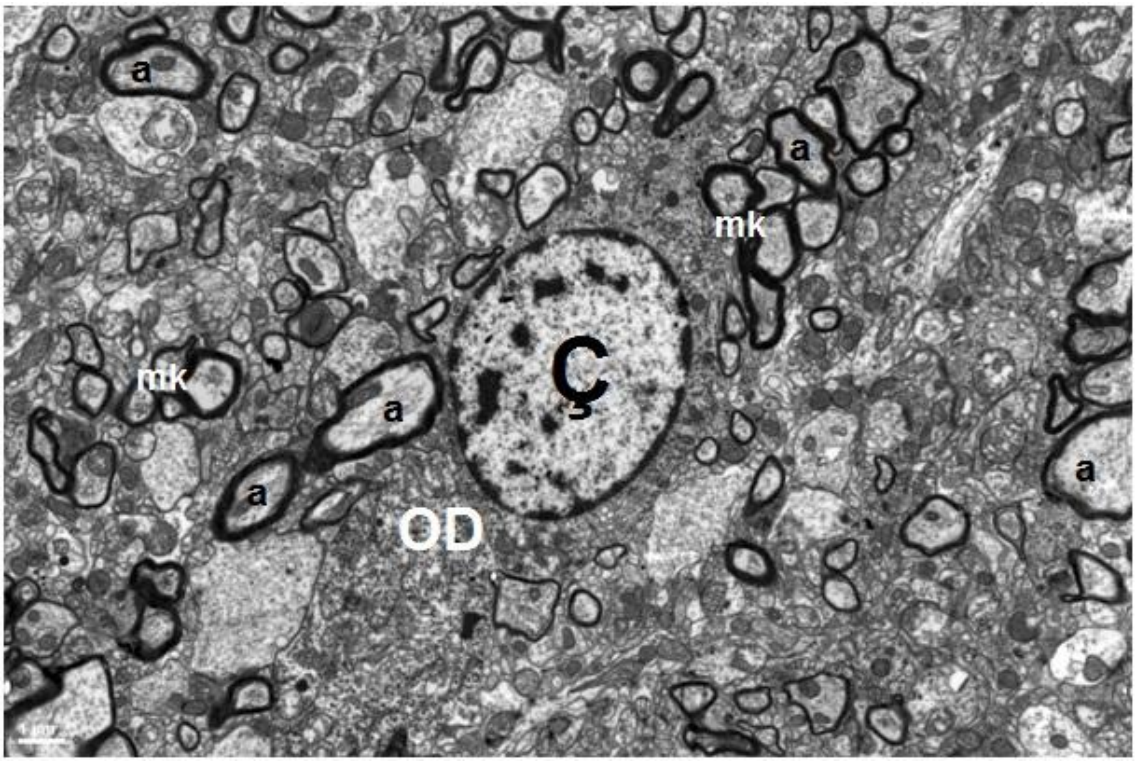
Şekil 20: Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Aksoplazmada mitokondriyonlar (m), nörotübül ve nörofilamanlar izlenmektedir. Bar= 1 µm.

4.2.2. Sham operasyon grubu

Spinal kord yaralanması oluşturulmayan, yalnızca laminektomi oluşturulan bu gruba ait deneklerde, spinal kord doku örnekleri 24. ve 72. saatlerde elde edilerek, elektron mikroskobik olarak değerlendirildi. Bu grupta spinal kord ince yapısının sağlam gruptakine benzer şekilde, korunmuş olduğu dikkati çekti. Spinal kord gri cevherindeki nöron perikaryonlarının sferikal, merkezi yerleşimli veziküler bir çekirdek ve çekirdeğin ortasında yer alan bir veya daha fazla sayıda çekirdekçiğe sahip olduğu görüldü. Çekirdek etrafında bulunan sitoplazmada iyi gelişmiş GER, transvers ve longitüdinal tipte kristalara sahip mitokondriyonlar, çekirdek yakınında yerleşen gelişmiş bir Golgi kompleksi, nörotübüller ve nörofilamanların bulunduğu görüldü. Nöroglia hücrelerinin de ovoid veya sferikal bir çekirdeğe ve çekirdek etrafında ince bir sitoplazmaya sahip oldukları izlendi. Sitoplazmada mitokondriyonlar, GER ve mikrotübüllerin varlığına rastlandı. Miyelinli aksonların etrafında bulunan miyelin kılıfın düzenli lamellar yapısını koruduğu görüldü. Akson sitoplazmalarında mitokondriyonlar, nörotübül ve nörofilamanların yer aldığı ayırt edildi. Laminektomi oluşturulan ve spinal kord doku örneklerinin 72. saatte alındığı grupta da 24 saatlik gruba benzer ise elektron mikroskobik bulgular elde edildi. Bu grupta da gri cevherde yer alan nöronların, gliya hücrelerin ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları, beyaz cevherde bulunan gliya hücreleri ile miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin ince yapılarının korunduğu gözlendi (Şekil 21 ve 22).



Şekil 21: Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan sinir hücresinde (N) çekirdek ve sitoplazmik organellerin normal yapıda olduğu izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Bar= 1 µm.

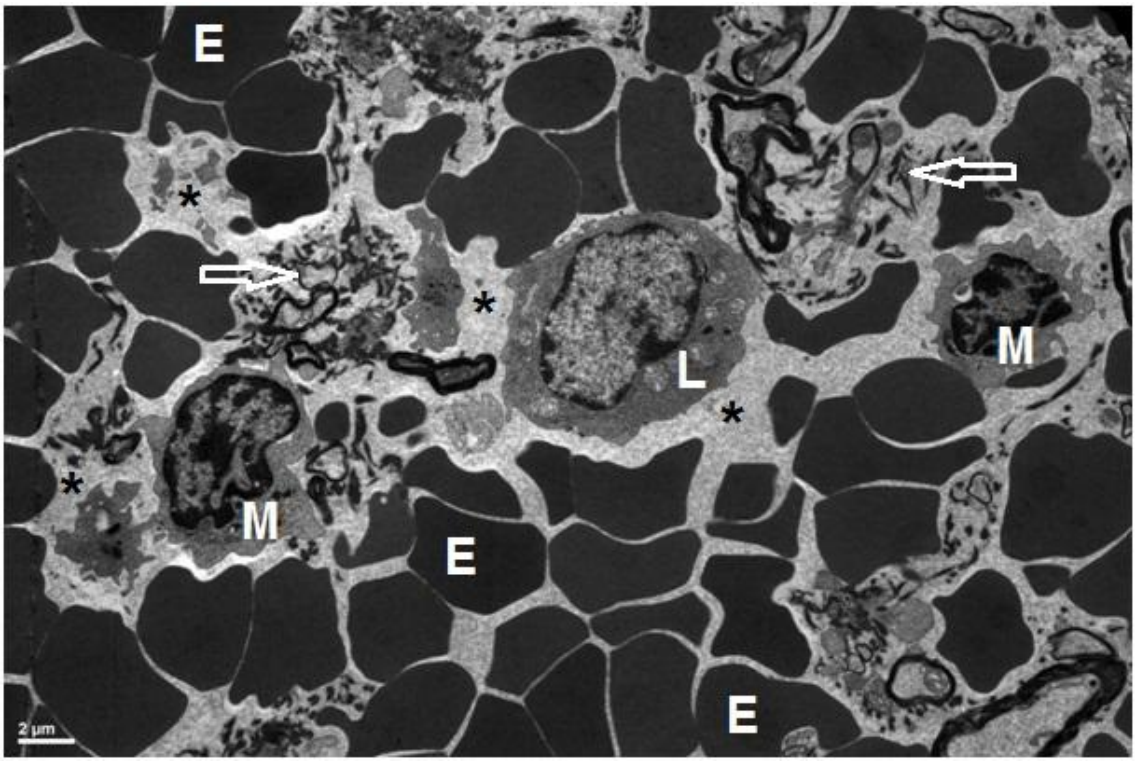


Şekil 22: Sham operasyon grubundan elde edilen spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan oligodendrositte (OD), çekirdek, (Ç) ve sitoplazmanın normal olduğu izlenmektedir. miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın normal yapısal özelliklerini korudukları görülmektedir. Bar= 1 µm.

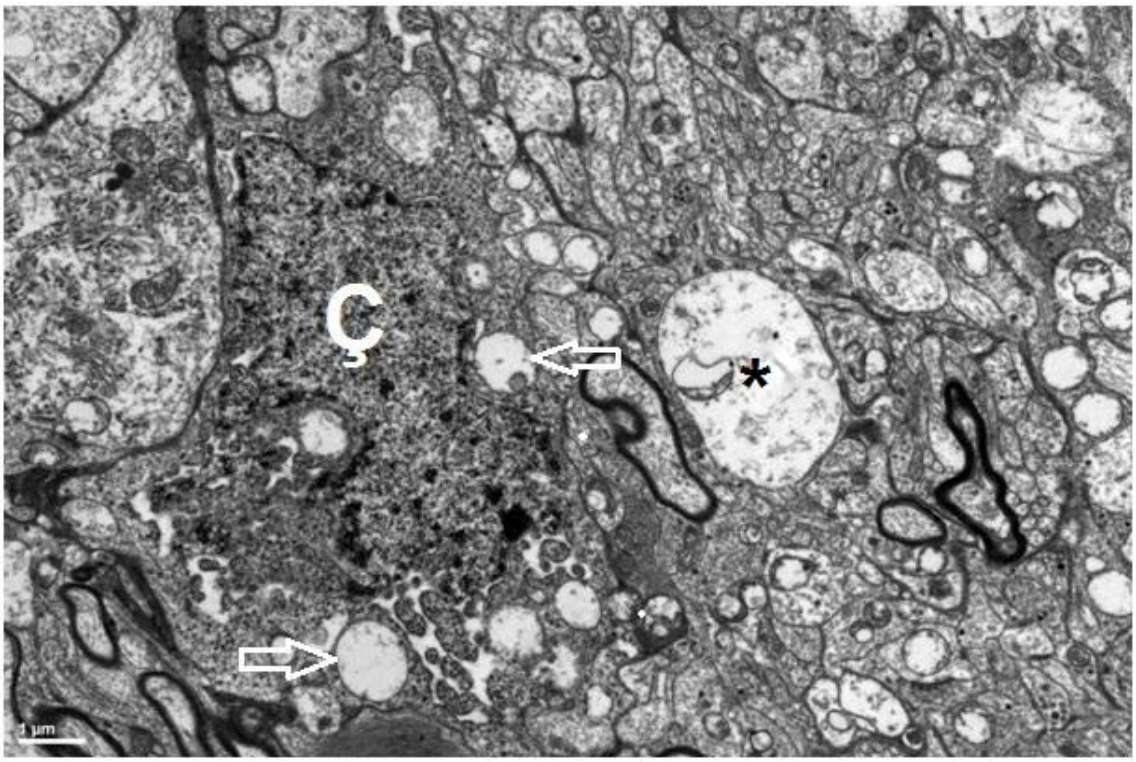
4.2.3. Deney Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanması sonrasında tedavi uygulanmayan deney kontrol grubundaki deneklerden 24 ve 72. saatlerde alınan spinal kord doku örnekleri elektron mikroskobik olarak değerlendirildi. 24 saat sonra alınan doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde spinal kordda gri ve beyaz cevherde yaygın ödem ve hemorajik alanların varlığı gözlendi. Ödematöz alanların gri cevherde yoğun olarak sinir hücreleri etrafında bulunduğu dikkati çekti. Beyaz cevherde yaygın ödematöz alanların yanında özellikle kan damarlarının yakın çevresinde hemorajik alanların varlığı dikkati çekti. Gri cevherde yer alan nöron perikaryonlarında çekirdekte kromatin kümelenmesi, sitoplazmada granüler endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme ve vakuolizasyon, mitokondriyonlarda genişleme, kristalarında harabiyet, lizozomlarda artış dikkati çeken ortak bulgulardı. Bunların yanında gliya hücreleri ve sinir liflerinde yapısal değişikliklerin oluştuğu dikkati çekti. Bu grupta özellikle beyaz cevherde meydana gelen dejeneratif değişiklikler belirgindi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın düzenli konsantrik lamellar yapılarının bozulduğu, miyelin kılıf lamellerin aksonal zon içerisine invagine olduğu, bazı sinir liflerinde ise sinir yüzeyine doğru evagine olduğu, akson içerisinde mitokondriyonlarda belirgin olmak üzere organel harabiyetinin oluştuğu belirlendi. Hem gri cevherde hem de beyaz cevherde özellikle oligodendrositlerde çekirdekte kromatin kümelenmesi, sitoplazmada vakuolizasyon ve organel harabiyetlerinin oluştuğu dikkati çekti. Spinal kord travmasından sonra yaralanma alanına hızla gelen enflamatuvar hücrelerin miktarında artış olduğu, bu kapsamda makrofajlar, lökositler ve mikrogliaların yaygın olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 23 ve 24).

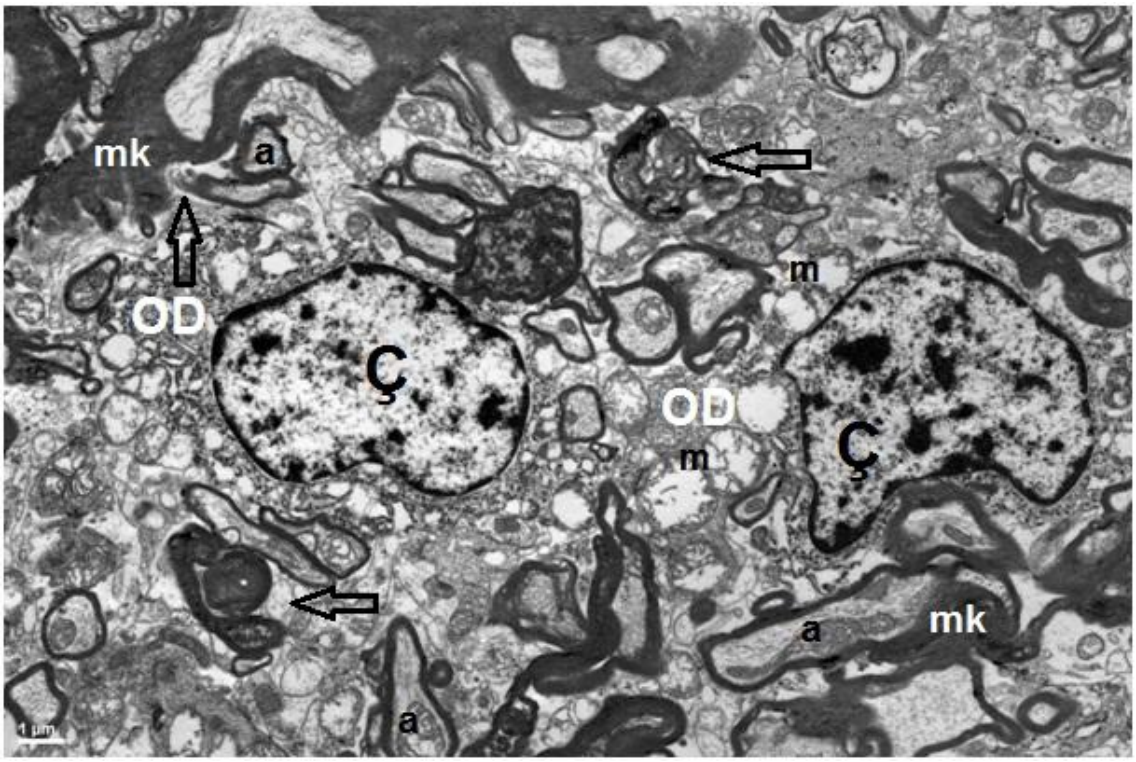
Yaralanma sonrası 72. saatte bu gruptan alınan doku örneklerinin elektron mikroskobisinde de 24 saatlik deney kontrol grubunda olduğu gibi spinal kordda yaygın ultrastrüktürel değişiklere rastlandı. Bu grupta da çoğu alanda ödem ve hemorajinin varlığı dikkati çekti. Gri cevherde bulunan nöron perikaryonları ve glia hücrelerinde çekirdekte kromatin artışı, sitoplazmada organel harabiyeti, miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf harabiyeti ile aksoplazmada organellerde yapısal bozukluklar gözlenen ortak bulgulardı (Şekil 25, 26 ve 27).



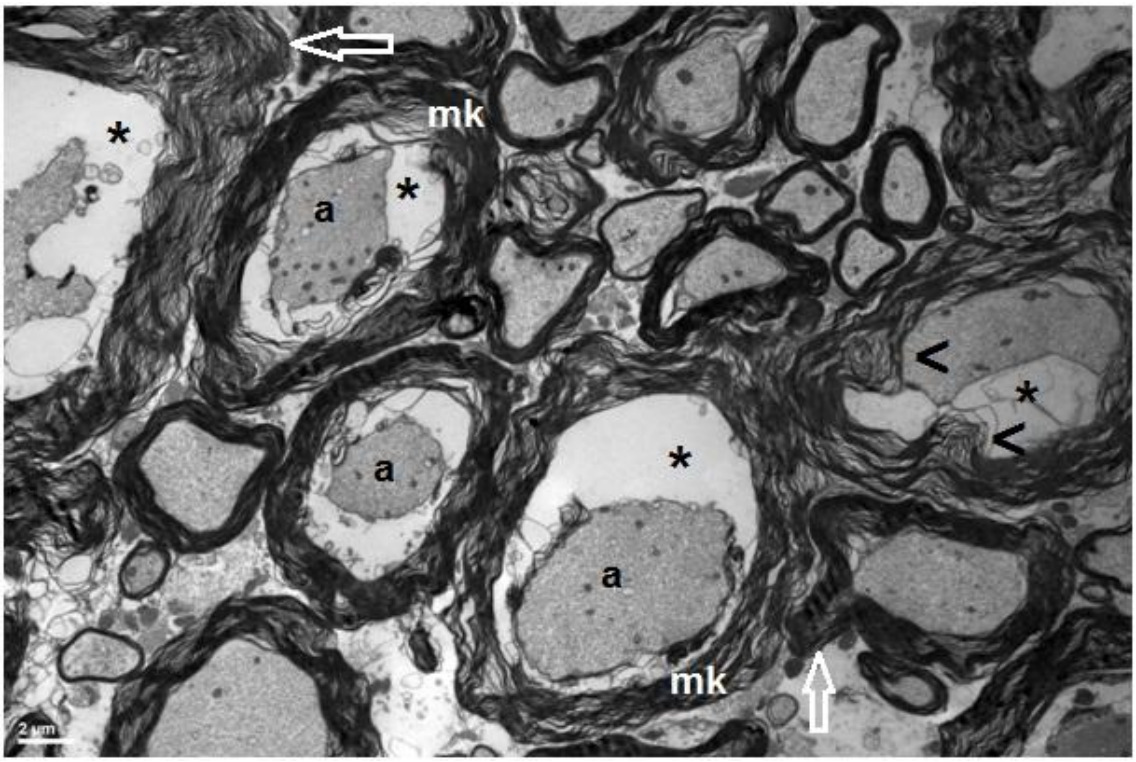
Şekil 23: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Yaralanma alanında yaygın ödem (*) ve hemorajik alanmların varlığı izlenmektedir. Ortamda çok sayıda eritrosit (E) ile enflamatuvar hücrelerden makrofajlar (M) ve lenfositlerin (L) bulunduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca bu alanda ileri derecede dejenere olan sinir liflerine ait miyelin kılıf artıklarının varlığı da (oklar) dikkati çekmektedir. Bar= 2 µm.



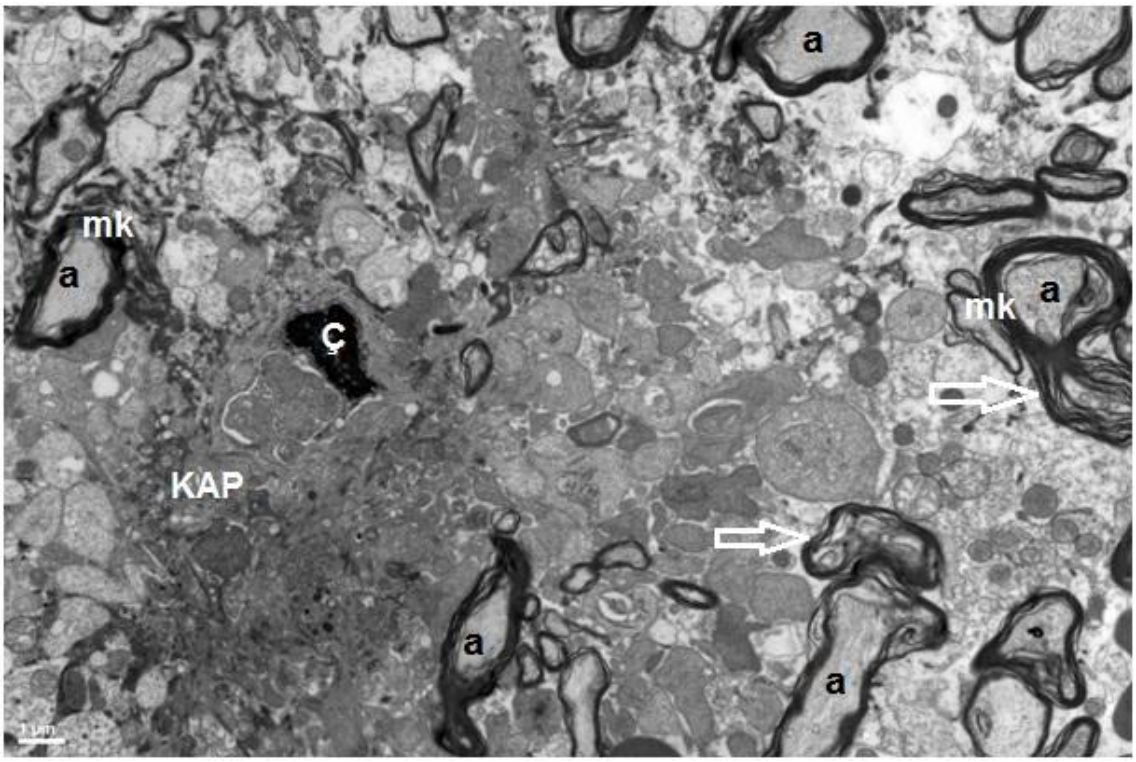
Şekil 24: Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan sinir hücresinde çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada vakuolizasyon (oklar) dikkati çekmektedir. Ayrıca nöropil içerisinde intrasitoplazmik ödemi temsil eden, gliya hücrelerine ait sitoplazmik genişlemelerin (*) varlığı da izlenmektedir. Bar= 2 µm.



Şekil 25: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan oligodendrositlerde (OD) özellikle sitoplazmada mitokondriyonlarda belirgin olmak üzere organel harabiyetlerinin varlığı dikkati çekmektedir. Miyelinli sinir liflerinde orta dereceliden ileriye kadar değişen akson (a) ve miyelin kılıf (mk) harabiyetlerinin (oklar) varlığı görülmektedir. Çekirdek (Ç) ve mitokondriyon (m) gösterilmiştir. Bar= 1µm



Şekil 26: Deney kontrol grubundan 72. Saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde, aksonlarda (a) büzüşme, miyelin kılıfta (mk), miyelin lamellerinde ayrışma, miyelin kılıfın aksonal zona doğru yapmış olduğu invajinasyonlar (okbaşı) ile sinir lifi dışına doğru yapmış olduğu miyelin kılıf evaginasyonlarının (oklar) varlığı dikkati çekmektedir. Ayrıca aksona büzüşmeye bağlı olarak akson ile miyelin kılıf arasında, içlerinde membranöz yapıların bulunduğu geniş boşlukların (*) varlığı da izlenmektedir. Bar= 2 µm.

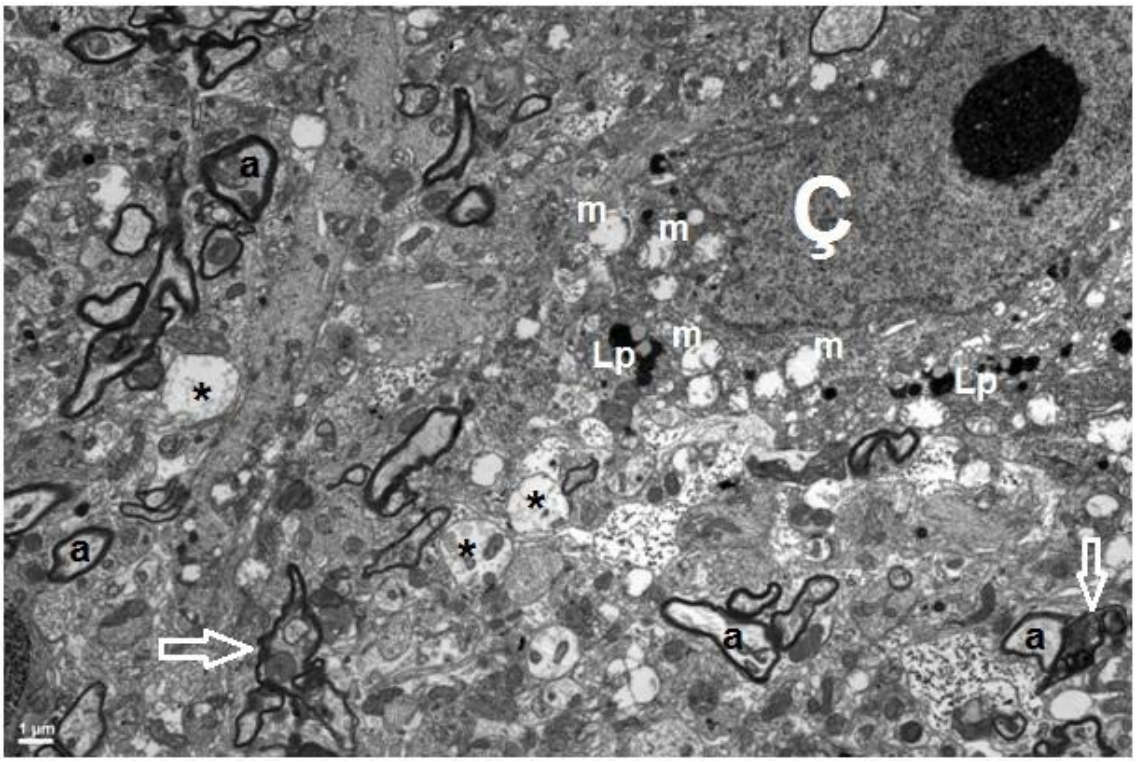


Şekil 27: Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Yaralanma alanında kapiller damarda (KAP) oklüzyonun varlığı dikkati çekmektedir. Kapiller endotel hücresinde çekirdeğin (Ç) ileri derecede hiperkromatik hale dönüştüğü görülmektedir. Alanda miyelinli sinir liflerinde aksonlarda (a) büzüşme, miyelin kılıfta (mk), miyelin lamellerinde ayrışmaların (oklar) oluştuğu görülmektedir. Ayrıca miyelin kılıf artıkları ile ödem alanlarının varlığı (*) izlenmektedir. Bar= 1 µm.

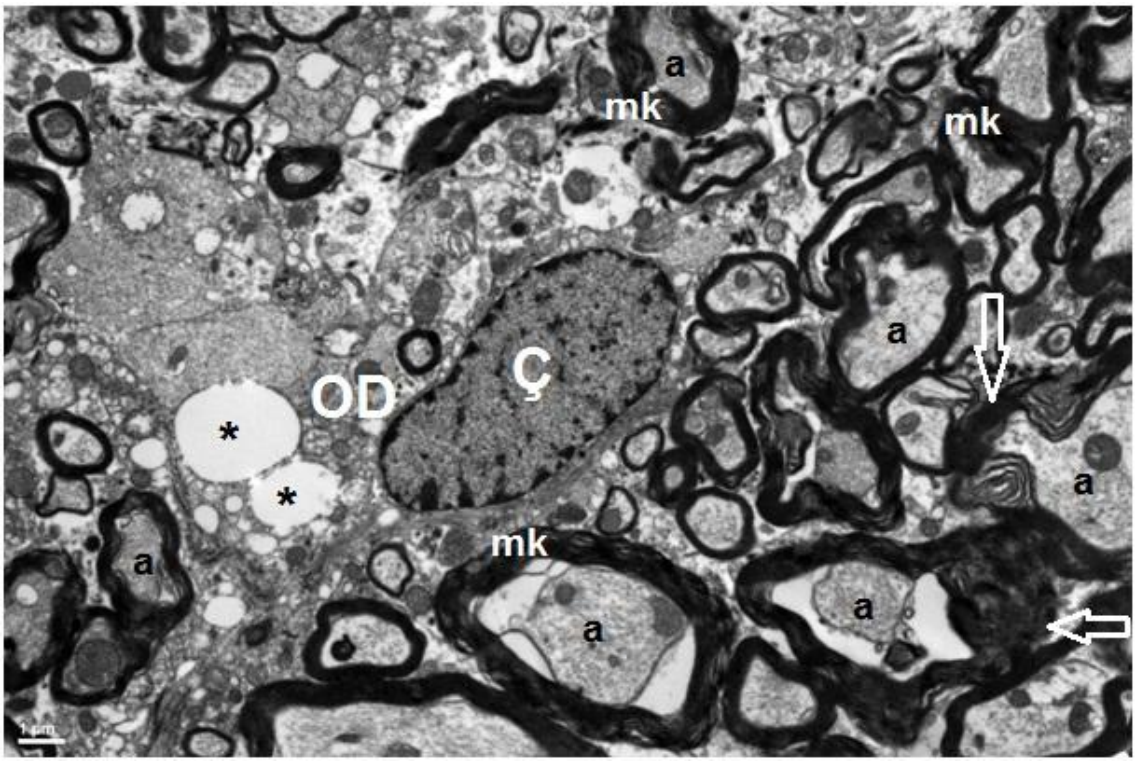
4.2.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup

Deneysel spinal kord yaralanmasından sonra tek başına metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan doku örnekleri 24 ve 72. saatlerde elektron mikroskobik olarak incelenmeleri amacıyla elde edilmiştir. 24. saatte alınan spinal kord dokularının incelenmesinde, ultrastrüktürel değişikliklerin deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nispeten azalmış olduğu dikkati çekti. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde ödem ve hemorajik alanlar bu grupta da görülmesine rağmen, bu alanların tedavi uygulanmayan gruba göre daha sınırlı olduğu görüldü. Özellikle gri cevherde bulunan nöronlarda görülen dejeneratif değişikliklerin daha hafif seyrettiği, hücresel bütünlüğün daha iyi korunduğu dikkati çekti. Nöron çekirdeğinde kromatin kümelenmelerinin varlığı izlenmekle beraber, sitoplazmik organellerin yapılarının nispeten normale yakın olduğu gözlendi. Hem gri hem de beyaz cevherde yer alan nöroglia hücrelerinde hafiften orta dereceye kadar değişen yapısal değişiklikler izlendi. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde dejenerasyon ve miyelin kılıf harabiyeti görülmesine rağmen, dejeneratif değişikliklerin daha sınırlı olduğu dikkati çekti (Şekil 28 ve 29).

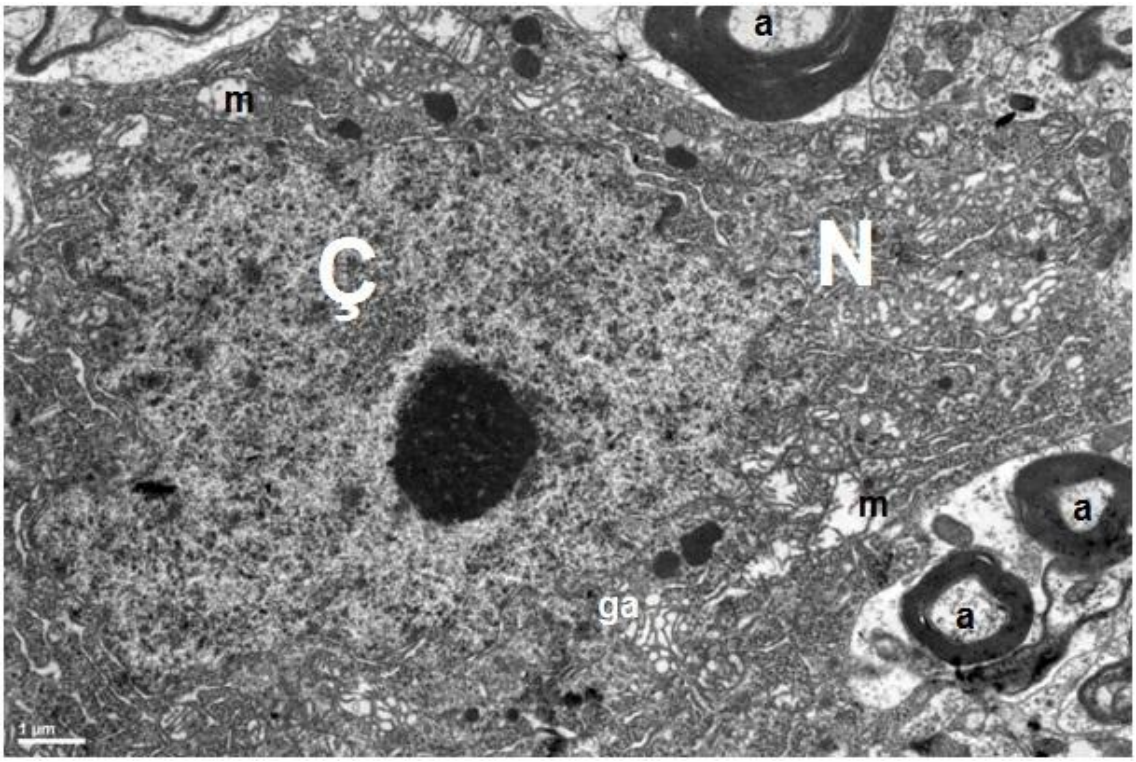
Tedaviden 72 saat sonra alınan spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde de 24 saatlik gruba benzer yapısal değişikliklerin varlığı izlendi. Bununla birlikte yapısal bütünlük bu grupta 24. saate göre daha belirgindi. Ödematöz ve hemorajik alanlar daha sınırlı alanlarda izlendi. Gri cevherde yer alan nöronlarda ödem, büzülme gibi dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte, deney kontrol grubuna oranla ultrastrüktürel değişikliklerin nispeten azaldığı dikkati çekti. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın tipik konsantrik lamellar yapısının bozulduğu ve akson içerisine doğru miyelin kılıf invajinasyonlarının oluştuğu görülmekle birlikte bu değişikliklere 24 saatlik gruba göre daha az rastlanması ilgi çekiciydi. Metilprednizolon tedavisinin aynı zamanda yaralanma bölgesinde makrofajlar, mikroglialar ve lökositlerin proliferasyon ve infiltrasyonunu azalttığı da dikkati çekti (Şekil 30 ve 31).



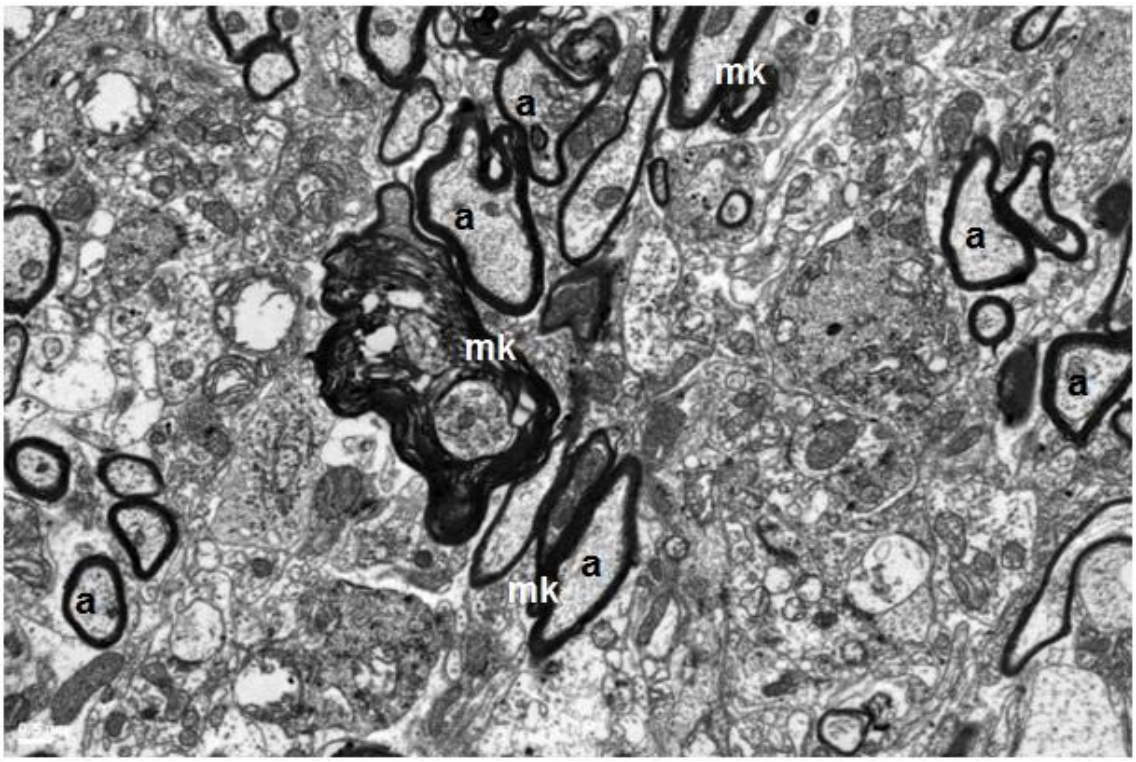
Şekil 28: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöron çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) genişleme ve kristalarında harabiyet dikkati çekmektedir. Ayrıca nöroplazmada çok miktarda lipofuksin pigmentlerinin (Lp) varlığı izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıf harabiyetleri görülmektedir (oklar). Ödem alanları (*) ve akson (a) gösterilmiştir. Bar= 1 µm.



Şekil 29: Metilprednizolon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan oligodendrositte (OD), çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada vakuolizasyon (*) gözlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde aksonlarda (a) büzüşme, miyelin kılıfta (mk), miyelin lamellerinde ayrışma ve dejenerasyon (oklar) dikkati çekmektedir. Bar= 1 μm.



Şekil 30: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöronda (N), çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) genişleme ve kristalarında harabiyet dikkati çekmektedir. Ayrıca nöron sitoplazmasında granüler endoplazmik retikülüm (GER) ve golgi (ga) sisternalarında hafif genişleme ve lizozomlardaki belirgin artış izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde aksonların (a) nispeten yapılarını korudukları görülmektedir. Bar= 1 µm.

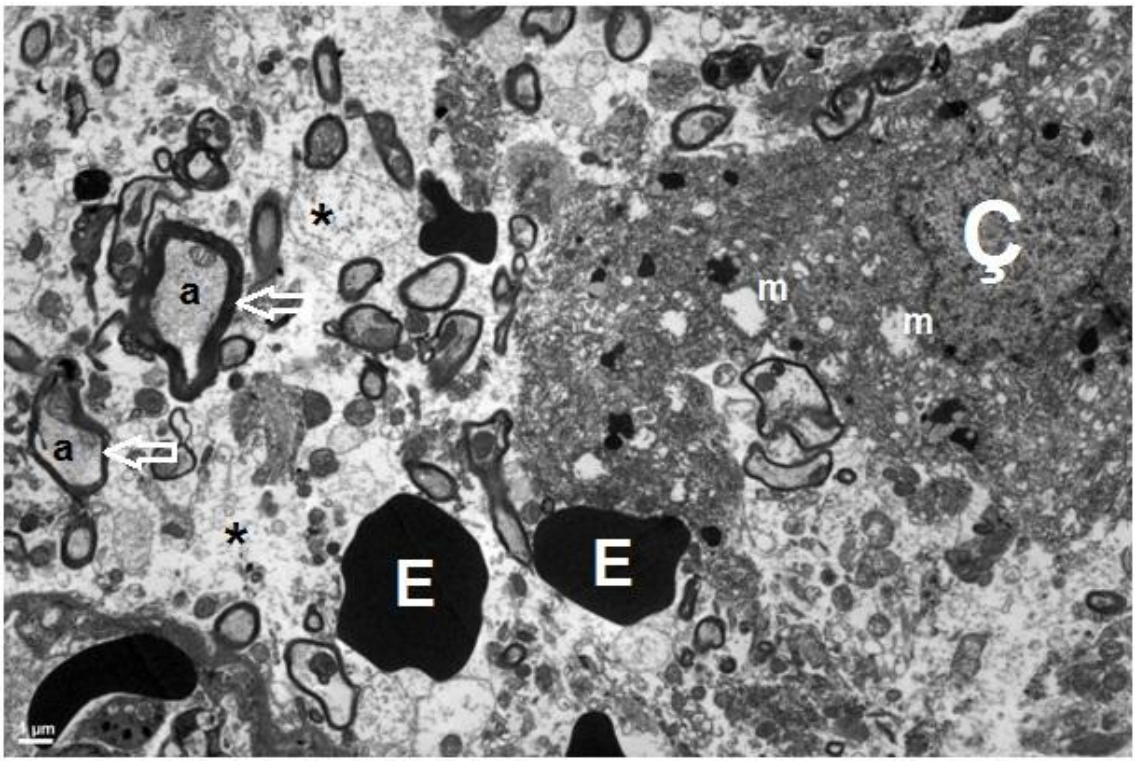


Şekil 31: Metilprednizolon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde özellikle büyük çaplı miyelinli sinir liflerinde, akson (a) ve miyelin kılıfta (mk) yapısal değişikliklerin belirgin olduğu görülmektedir. Bar= 0,5 µm.

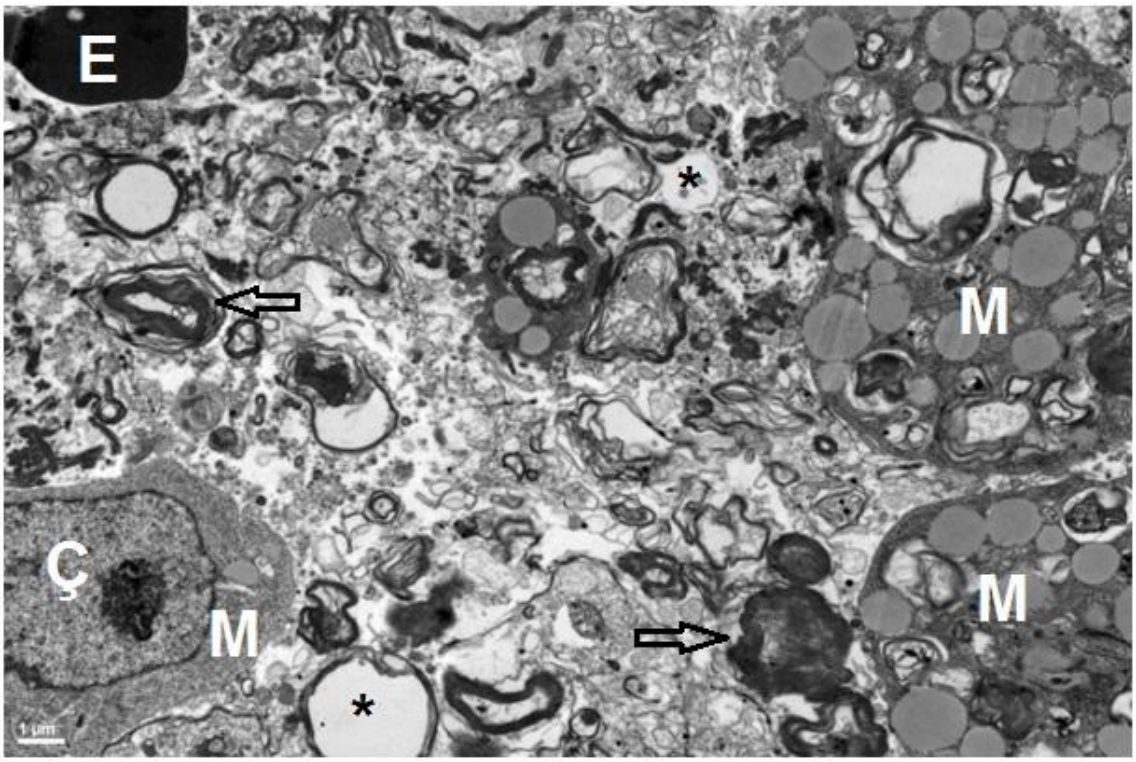
4.2.5. Minosiklin tedavisi uygulanan grup

Spinal kord yaralanmasını takiben minosiklin tedavisi uygulanan bu gruptan spinal kord doku örnekleri 24 ve 72. saatlerde alınarak elektron mikroskobu ile değerlendirildi. 24. saatte alınan doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde spinal kord gri ve beyaz cevherinde yaygın ödematöz ve hemorajik alanların varlığına sıklıkla rastlandı. Bununla birlikte, ödematöz ve hemorajik alanların tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna oranla daha sınırlı olduğu gözlendi. Gri cevherde yer alan sinir hücre perikaryonlarında çekirdekte heterokromatin miktarı artışı, mitokondriyonlarda genişleme, kristalarında bozulma ve düzensizlikler ile sitoplazmik vakuolizasyon izlendi. Bunun yanında gliya hücrelerinde de çekirdek ve sitoplazmik organellerde ultrastrüktürel değişiklikler görüldü. Beyaz cevherde bulunan miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfı içeren yapısal değişiklikler izlendi. Miyelin kılıfta, miyelin lamellerinin normal organizasyonunda bozulma, fokal miyelin kılıf dejenerasyonları ile miyelin kılıfın aksonal zon içerisine doğru invajinasyonlar gözlendi. Bunların yanında, aksoplazmada yer alan mitokondriyonlarda yapısal değişiklikler ile nörotübül ve nörofilamanlarda dejenerasyon ilgi çekiciydi (Şekil 32 ve 33).

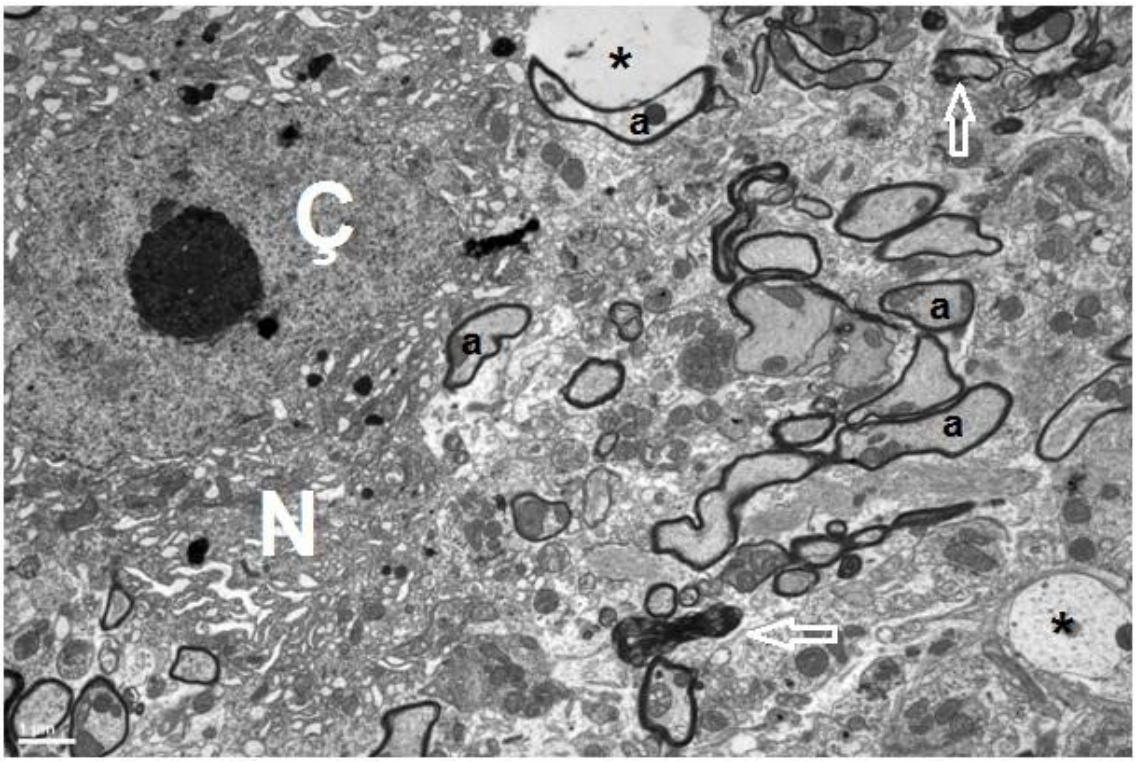
Spinal kord yaralanmasını takiben 72 saat minosiklin tedavisi uygulanan gruptan alınan doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, 24 saatlik minosiklin uygulanan gruba göre, ödem ve hemorajik alanların belirgin olarak azalmış olduğu görüldü. Nöronlarda bazı alanlarda yapısal değişiklikler görülmesine rağmen çoğu alanlarda hücrelerde çekirdek ve sitoplazmik yapıların korunduğu görüldü. Bunların yanı sıra, özellikle beyaz cevherde bulunan miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf ve aksonlarda yapısal değişiklikler izlenmekle birlikte, 24 saatlik gruba göre yapısal bütünlüğün nispeten korunduğu izlenmekteydi (Şekil 34 ve 35).



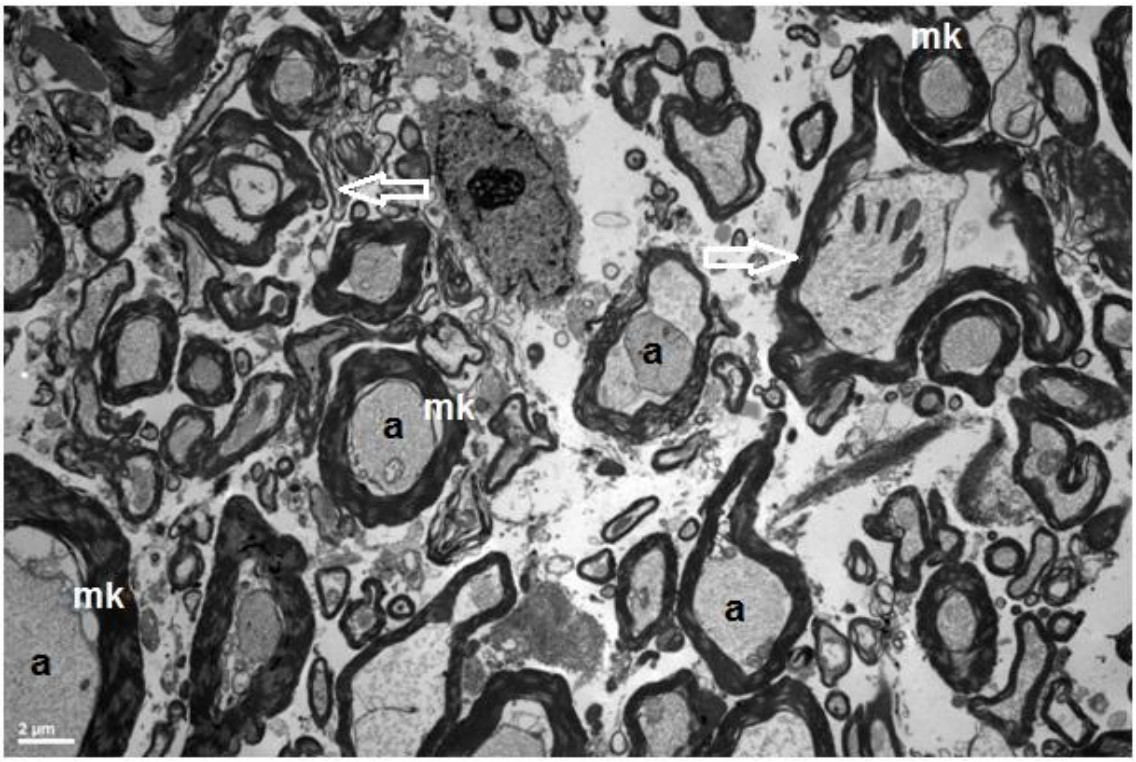
Şekil 32: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöron çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) genişleme ve krista harabiyeti ile lizozomlarda artış dikkati çekmektedir. Ayrıca ortamda ortamda yaygın ödem alanları (*) ile hemorajinin varlığı izlenmektedir. Miyelinli sinir lifleri (oklar) ve eritrositler (E) ile gösterilmiştir. Bar= 1 µm.



Şekil 33: Minosiklin grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde ileri derecede sinir lifi harabiyetinin (oklar) varlığı dikkati çekmektedir. Dejenerasyona uğrayan sinir liflerini fagosite eden enflamatuvar hücrelerden makrofajların (M) varlığı dikkati çeklmektedir. çekirdek (Ç), eritrosit (E) ve ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 1 µm.



Şekil 34: Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöronda (N) çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada granüler endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme ve lizozomlarda artış dikkati çekmektedir. Miyelinli snir liflerinin çoğunlukla normal yapılarını korudukları, ancak bazı liflerde miyelin kılıf harabiyetlerinin varlığı (oklar) görülmektedir. Ödem alanları (*). Bar= 1 μm.

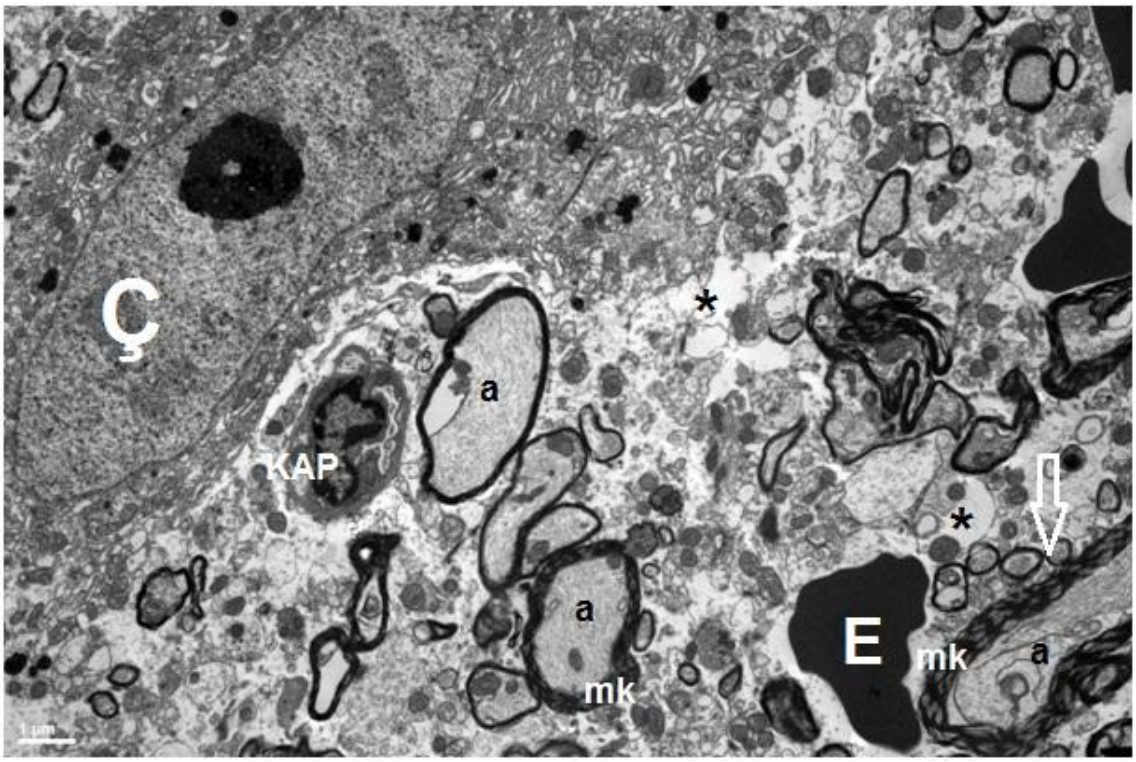


Şekil 35: Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinin bazılarında aksonlarda (a) büzüşme ve miyelin kılıf (mk) harabiyetlerinin (oklar) varlığı izlenmektedir. Ödem alanları (*). Bar= 2 µm.

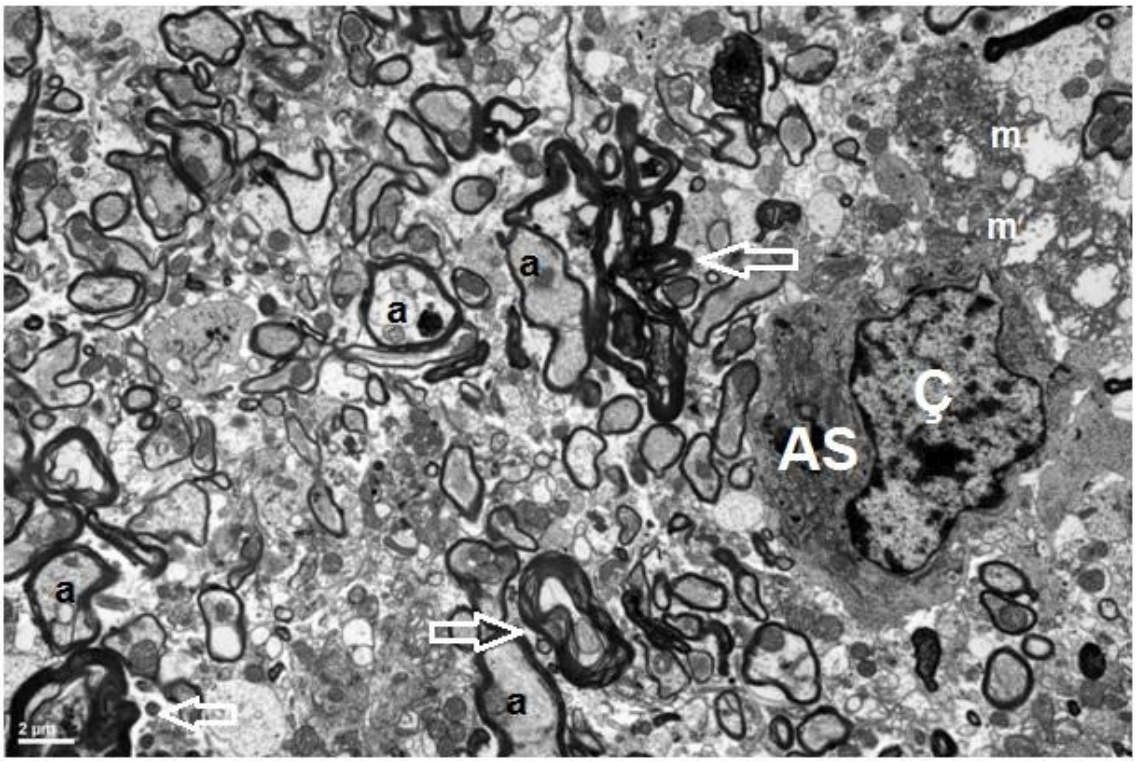
4.2.6. Metilprednizolon+Minosiklin Kombine Tedavi Grubu

Spinal kord yaralanmasından sonra metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan deneklerden 24. ve 72. saatlerde alınan spinal kord doku örnekleri elektron mikroskobik seviyede değerlendirildi. 24 saat sonra elde edilen doku örneklerinin incelenmesinde, gri ve beyaz cevherde ödem ve hemorajik alanların bu grupta da yer aldığı gözlendi. Gri cevherde yer alan nöronlarda çekirdek ve sitoplazmik organellerin yapılarının tedavi edilmeyen ve tek başına tedavi uygulanan 24 saatlik gruplara göre daha iyi durumda olduğu belirlendi. Bununla birlikte nöron sitoplazmalarında mitokondriyonlarda genişleme ve kristalarında kısmen veya tamamen parçalanma ile lizozomlarda artış dikkati çekmekteydi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıfın lamellar yapısında düzensizlik, lamellar ayrılma ve aksonlarda genişleme ve aksoplazmada mitokondriyonlarda genişleme ve kristalarında parçalanmalar izlendi. Gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organellerde hafif yapısal değişiklikler bulunmakla birlikte, genelde yapının korunduğu gözlendi. Travma sonrası ortama göç eden makrofajlar ve diğer lökositler ile mikrogliyal hücreler dejenerasyonun belirgin olduğu alanlarda dikkati çekmekteydi (Şekil 36 ve 37).

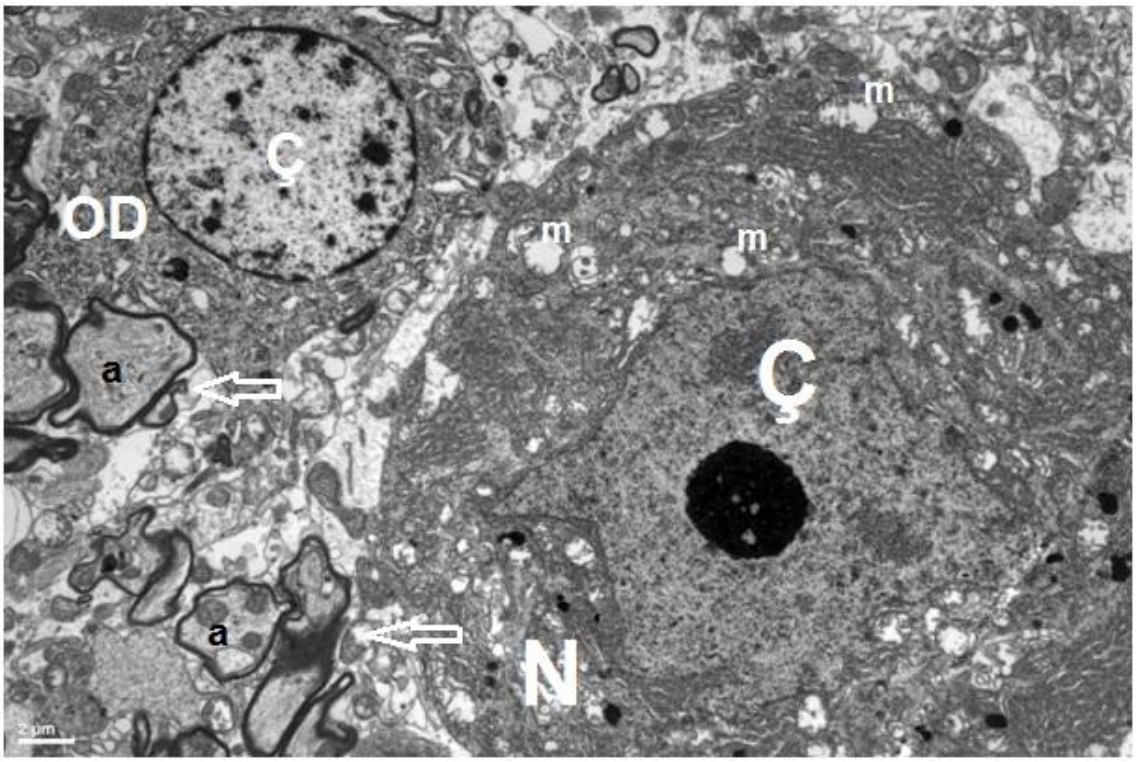
Kombine tedavi alan ve yaralanmadan 72 saat sonra elde edilen doku örneklerinin elektron mikroskobik incelenmesinde, nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde yapısal görünüm 24 saatlik gruba benzemekle birlikte, özellikle nöronlarda ve gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organellerin ince yapısının normale yakın olması ilgi çekici bulundu. Nöronlarda veziküler çekirdek içerisinde yer alan çekirdekçik belirgin olarak izlenmekteydi. Nöroplazmada granüler endoplazmik retikülüm sisternaları oldukça düzenli olarak yer almaktaydı. Mitokondriyonlar, golgi kompleksi, lizozomlar, nörotübül ve nörofilamanların genellikle normal yapılarını korudukları gözlendi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf lamellerinde fokal yapısal bozukluklar özellikle geniş çaplı sinir liflerinde bu grupta da belirgindi. Bununla birlikte aksonlarda yapısal bütünlük korunmaktaydı. Enflamatuvar hücrelere bu grupta da rastlanmakla birlikte sayıları azalmıştı (Şekil 38 ve 39).



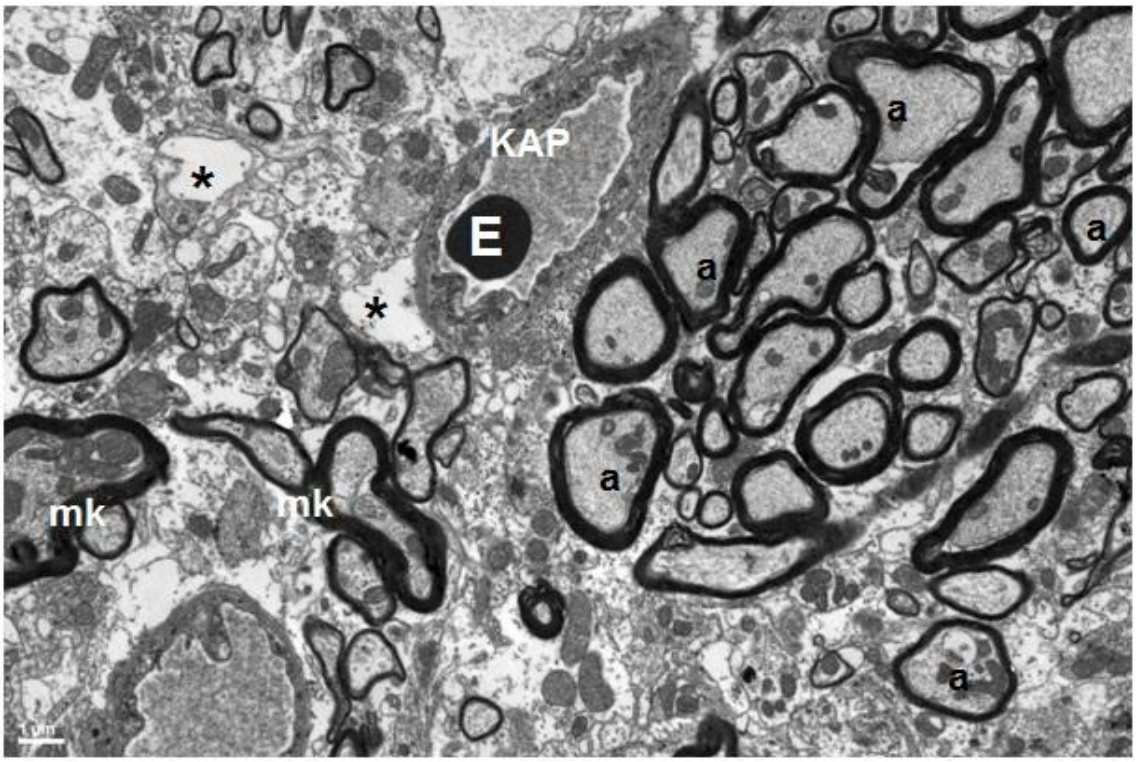
Şekil 36: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöron çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı ve sitoplazmada granüler endoplazmik retikülümda hafif genişlemeler izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde hafiften orta dereceye kadar değişen akson (a) ve miyelin kılıf (mk) değişiklikleri görülmektedir. Sinir liflerinin bazılarında miyelin kılıf lamellerinde ayrışma (oklar) izlenmektedir. Ortamda hafif ödem ve sınırlı hemorajik alanlar dikkati çekmektedir. Kapiller damar (KAP) ve eritrosit (E) ve ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 1 µm.



Şekil 37: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan astrositte (AS), çekirdekte (Ç) kromatin artışı, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) genişleme ve kristalarında parçalanma gözlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında akson (a) ve miyelin kılıf değişiklikleri (oklar) gözlenmektedir. Bar= 2 µm.



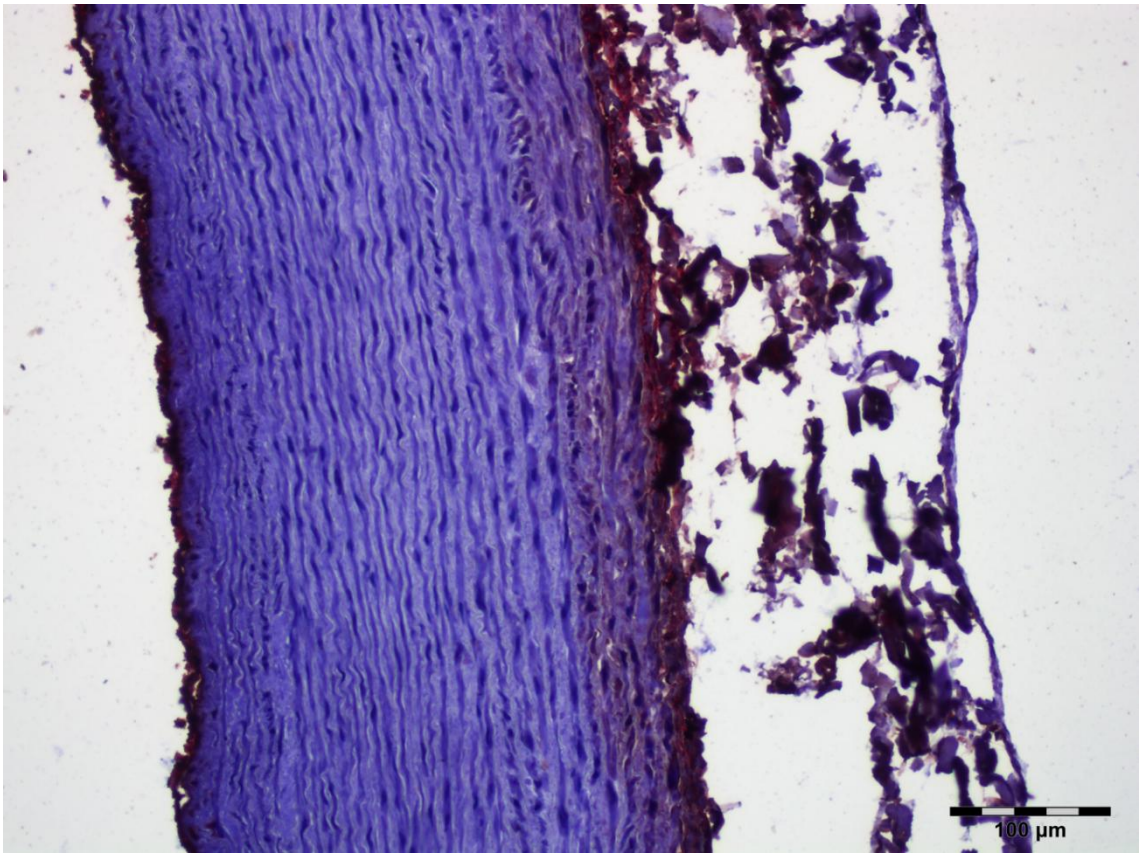
Şekil 38: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Gri cevherde yer alan nöronda (N), çekirdekte (Ç), kromatin artışı ile, sitoplazmada mitokondriyonlarda (m) hafif genişleme ve krista kayıpları izlenmektedir. Ayrıca nöron yakınında yer alan perinöronal oligodendrositte (OD), çekirdek (Ç) ve sitoplazmanın nispeten normal yapısını koruduğu dikkati çekmektedir. Miyelinli sinir lifleri (oklar) ve akson (a) gösterilmiştir. Bar= 2 µm.



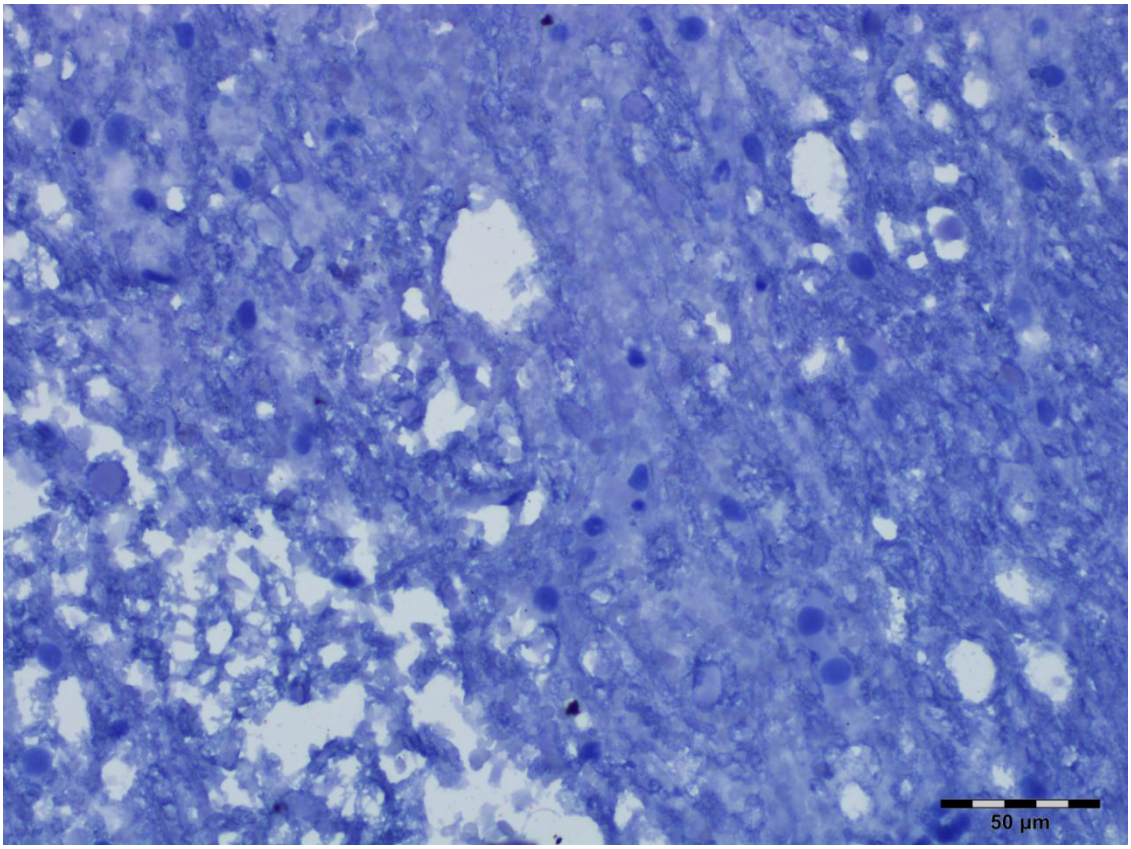
Şekil 39: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskobik görünümü. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) genellikle normal yapıda oldukları dikkati çekmektedir. Bununla birlikte kapiller damarların (KAP) çevresinde belirgin olmak üzere hafif ödem alanlarının (*) varlığı izlenmektedir. Eritrosit (E). Bar= 1 µm.

4.3. İmmunohistokimya Bulguları

TNF-α immünoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol geniş çaplı arter duvarında işaretlenmiştir (Şekil 40). Ayrıca primer antikor damlatılmayan spinal kord doku kesiti negatif kontrol amacıyla boyanmıştır (Şekil 41).

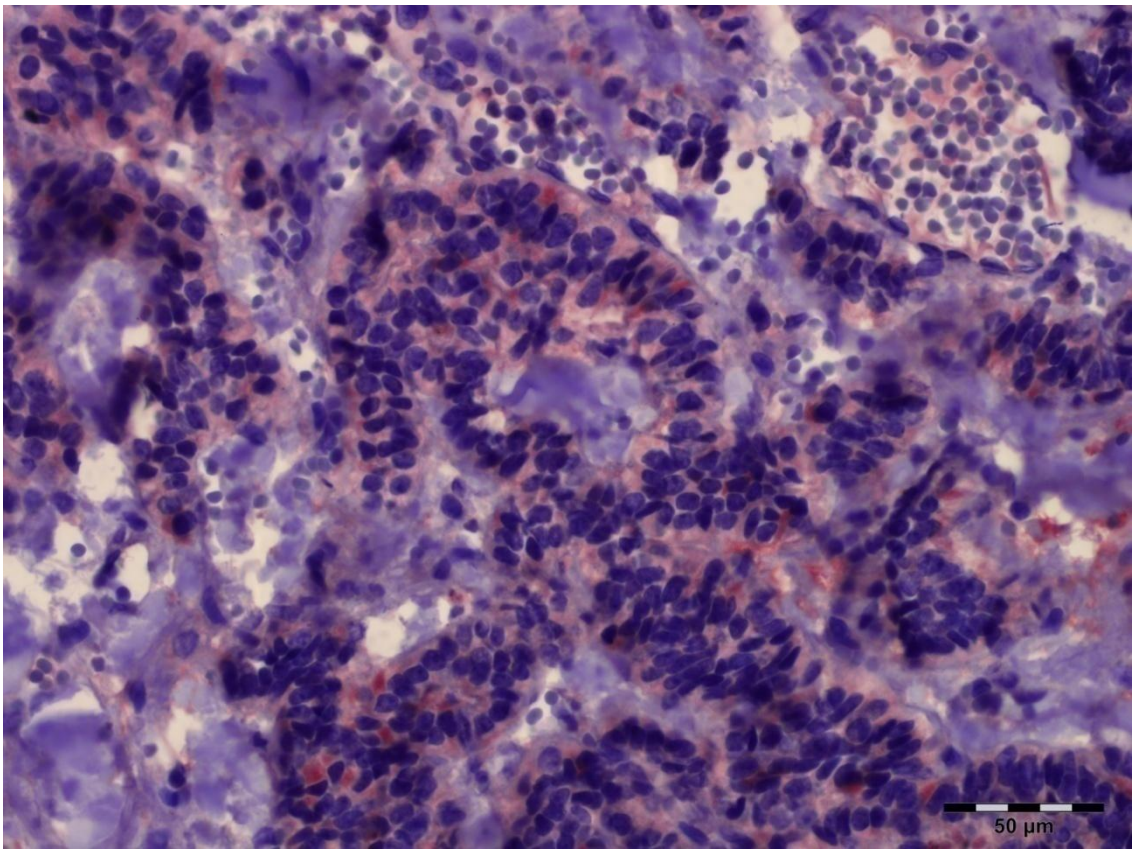


Şekil 40: Pozitif kontrolde TNF-α immunoreaktivitesi. Geniş çaplı arterin tunika intima ve adventisya tabakalarında TNF-α immunoreaktivitesi görülmektedir. Bar= 100 µm.

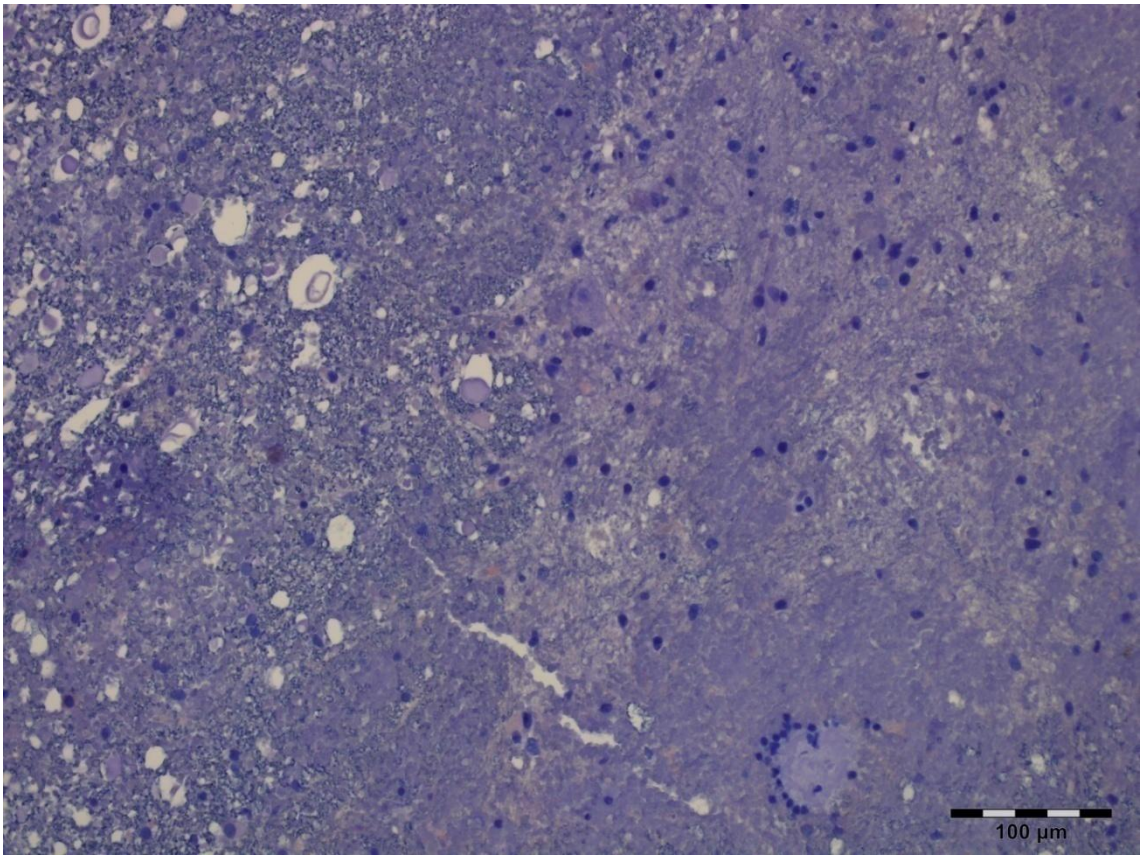


Şekil 41: Negatif kontrolde TNF-α immunoreaktivitesi. TNF-α için, primer antikor damlatılmamış spinal kord doku kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar= 50 µm

IL-6 immünoreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol hepatoduodenal tümör dokusunda işaretlenmiştir (Şekil 42). Ayrıca primer antikor damlatılmayan spinal kord doku kesiti negatif kontrol amacıyla boyanmıştır (Şekil 43).



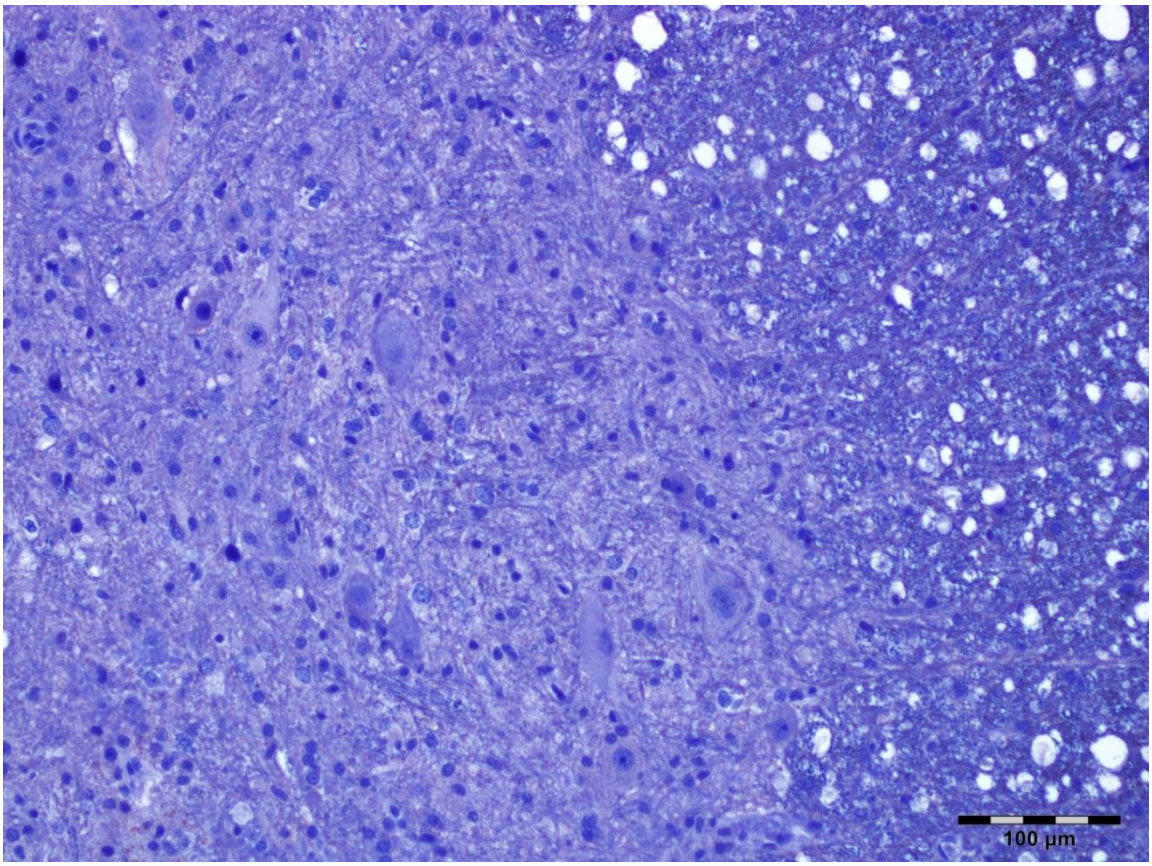
Şekil 42: Pozitif kontrolde IL-6 immunoreaktivitesi. Hepatoduodenal tümör dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi izlenmektedir. Bar= 50 µm.



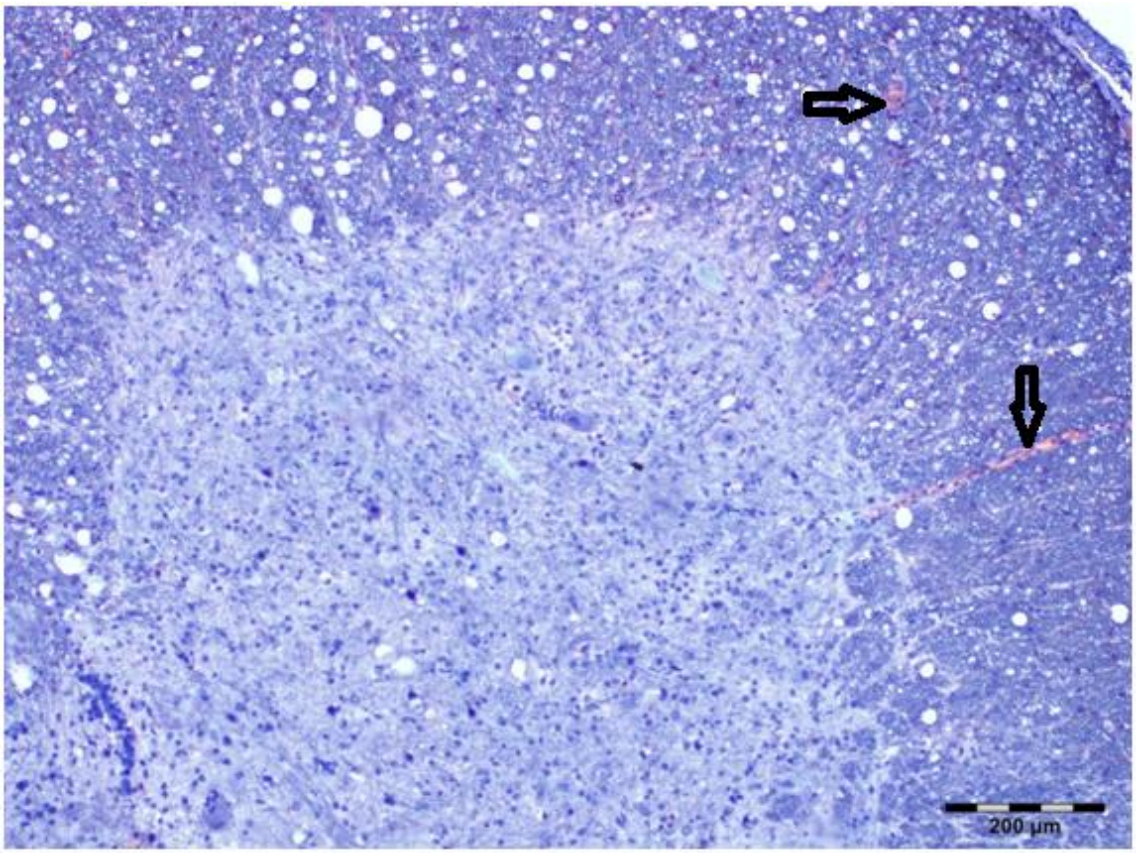
Şekil 43: Negatif kontrolde IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 için, primer antikor damlatılmamış spinal kord doku kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar= 100 µm.

4.3.1. Kontrol grubu

Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmayan tamamen sağlam deneklerden elde edilen spinal kord doku örneklerinde TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarını göstermek amacıyla immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Bu gruba ait medulla spinalis kesitlerinde gri cevherde yerleşen sinir hücre perikaryonları ile hem gri hem de beyaz cevherde yerleşim gösteren glia hücre sitoplazmaları ve sinir liflerinde her iki sitokinin de çok düşük miktarlarda eksprese olduğu görüldü. Kan damarlarının duvarlarını döşeyen endotel hücrelerinde de hem TNF-α, hem de IL-6 ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 44 ve 45).



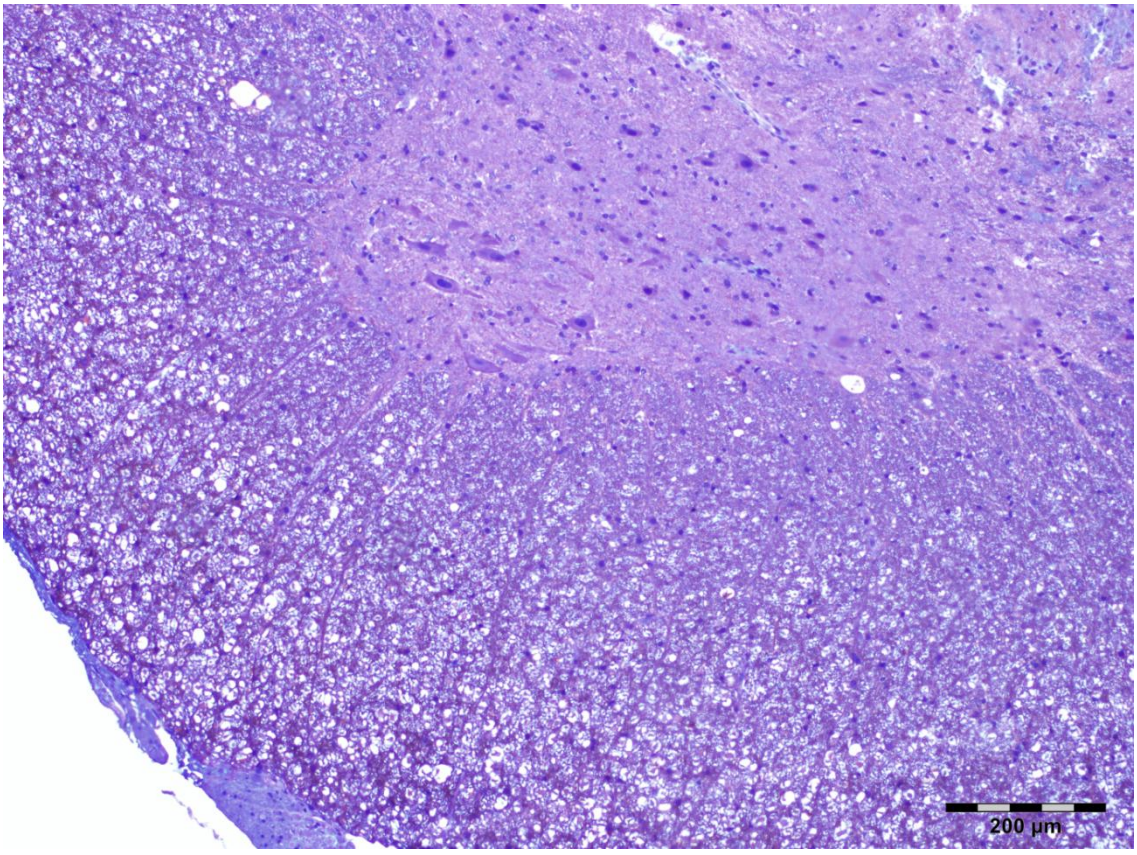
Şekil 44: Kontrol grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Tamamen sağlam bırakılan kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin nöron perikaryonları, glia hücreleri ve sinir liflerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.



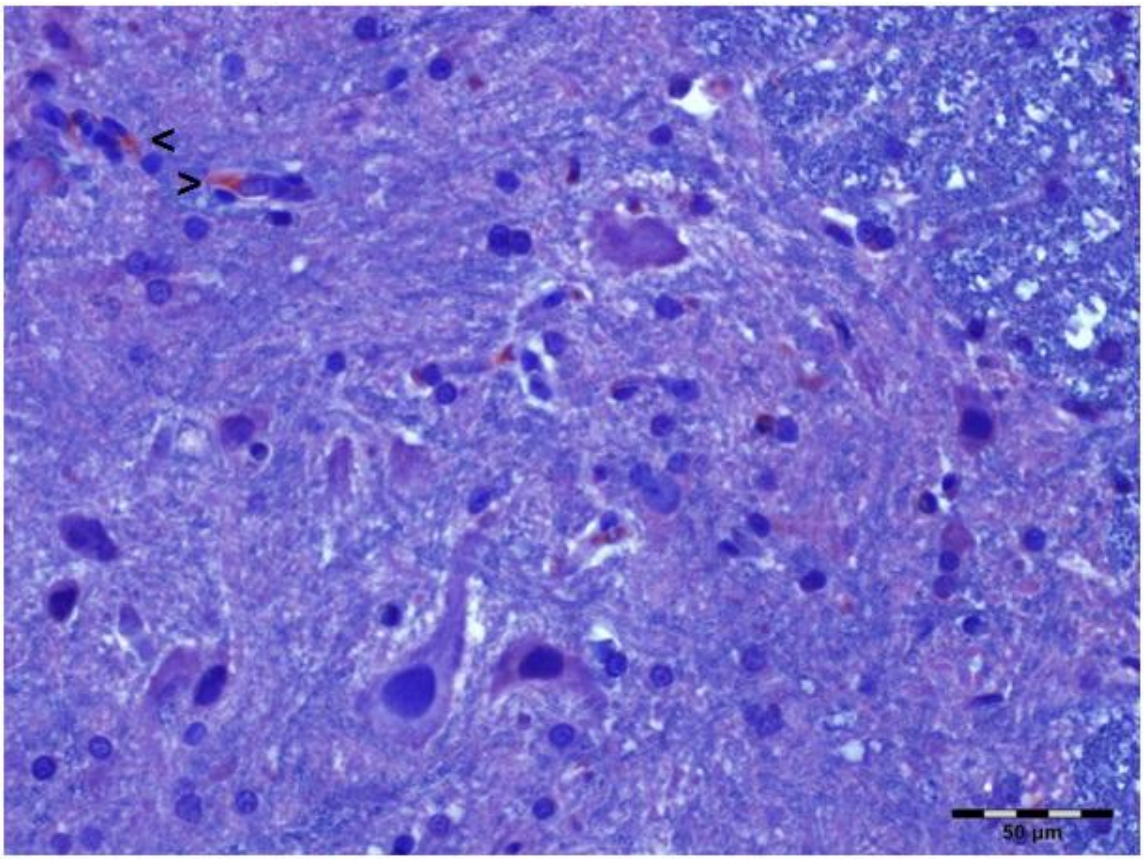
Şekil 45: Kontrol grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin (oklar) minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar= 200 µm.

4.3.2. Sham operasyonu grubu

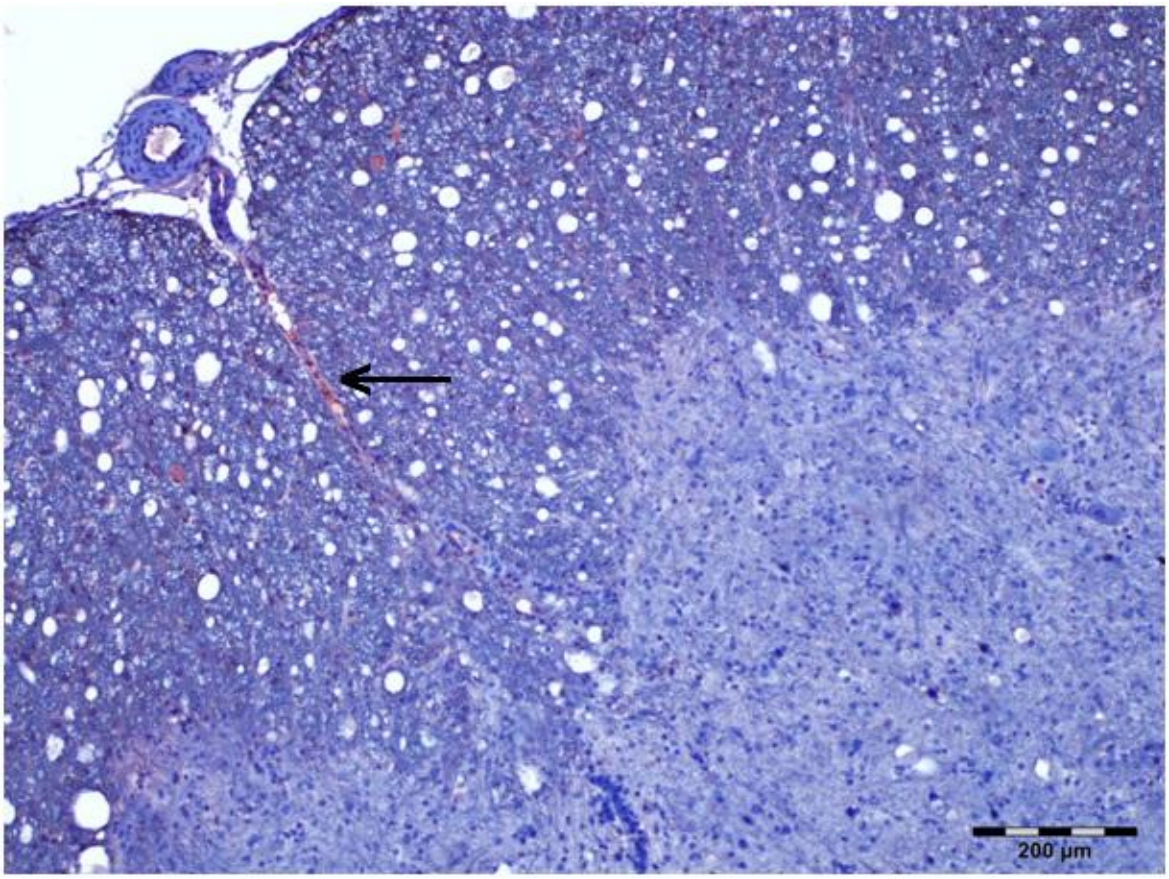
Spinal kord yaralanmasına maruz bırakılmayıp sadece laminektomi uygulanan bu gruba ait spinal kord doku örnekleri, 24 ve 72. saatte alınarak, TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. 24 saatlik laminektomi grubunda medulla spinalis gri ve bayaz cevherinde hem TNF-α hem de IL-6 ekspresyonlarının, kontrol grubuna benzer şekilde, minimal düzeyde olduğu gözlendi. Gri cevherde yerleşen sinir hücre perikaryonlarında, glia hücreleri, sinir lifleri ve kan damarlarının duvarlarını döşeyen endotel hücrelerinin sitoplazmalarında sitokin ekspresyonlarının çok düşük düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 46 ve 47). Laminektomi oluşturulduktan 72 saat sonra elde edilen medulla spinalis doku örneklerinde ise her iki sitokinin ekspresyonu da yok denecek kadar azdı (Şekil 48).



Şekil 46: Sham operasyon grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Sham operasyon grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin gri cevherde yerleşen nöron perikaryonlarında, glia hücrelerinde ve beyaz cevherdeki miyelinli sinir liflerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 200 µm.



Şekil 47: Sham operasyon grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Sham operasyon grubundan 24. saatte alınan spinal kord doku örneğinde IL-6 immunreaktivitesinin ok başları ile işaretli alanlarda, mikroglia hücrelerinde minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar= 50 µm.

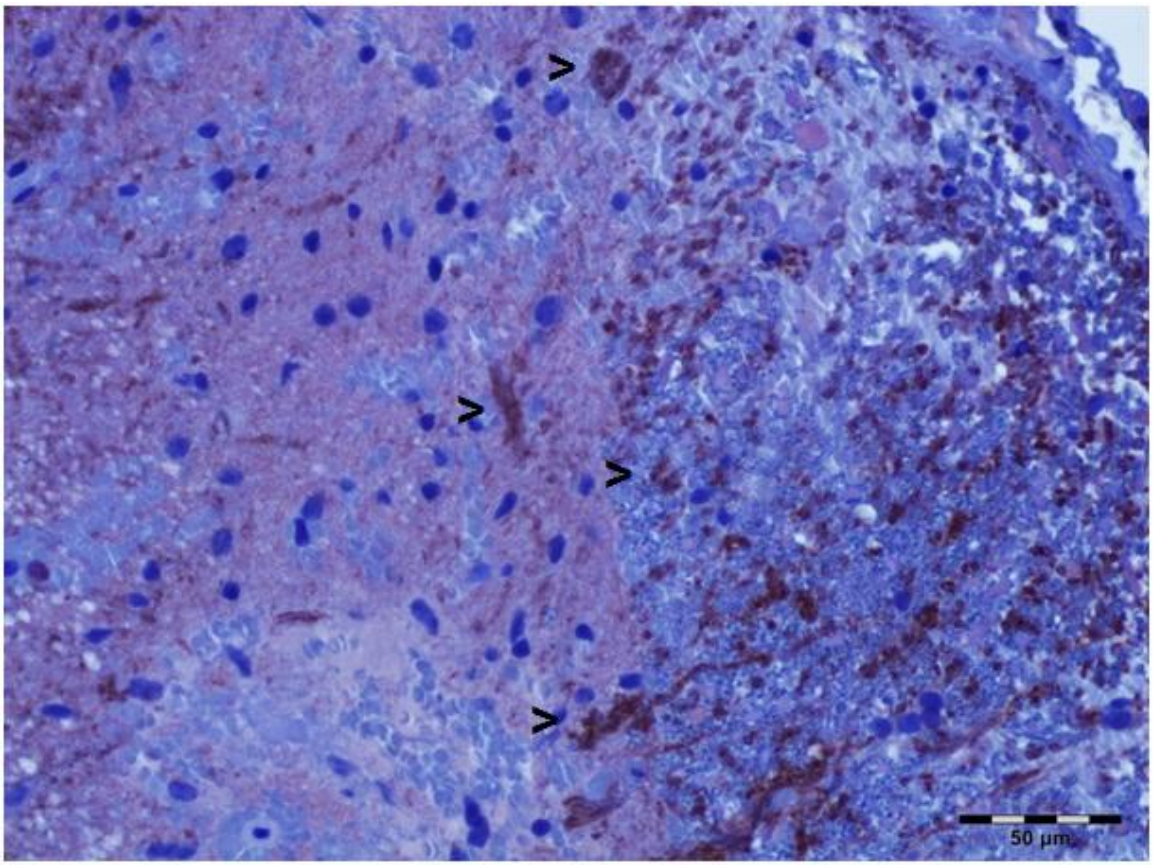


Şekil 48: Sham operasyon grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Sham operasyon grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin gri ve beyaz cevher bölgelerinde minimal düzeyde olduğu izlenmektedir. Ok ile işaretli bölgede kapiller endotelinde IL-6 ekspresyonu izlenmektedir. Bar= 200 µm.

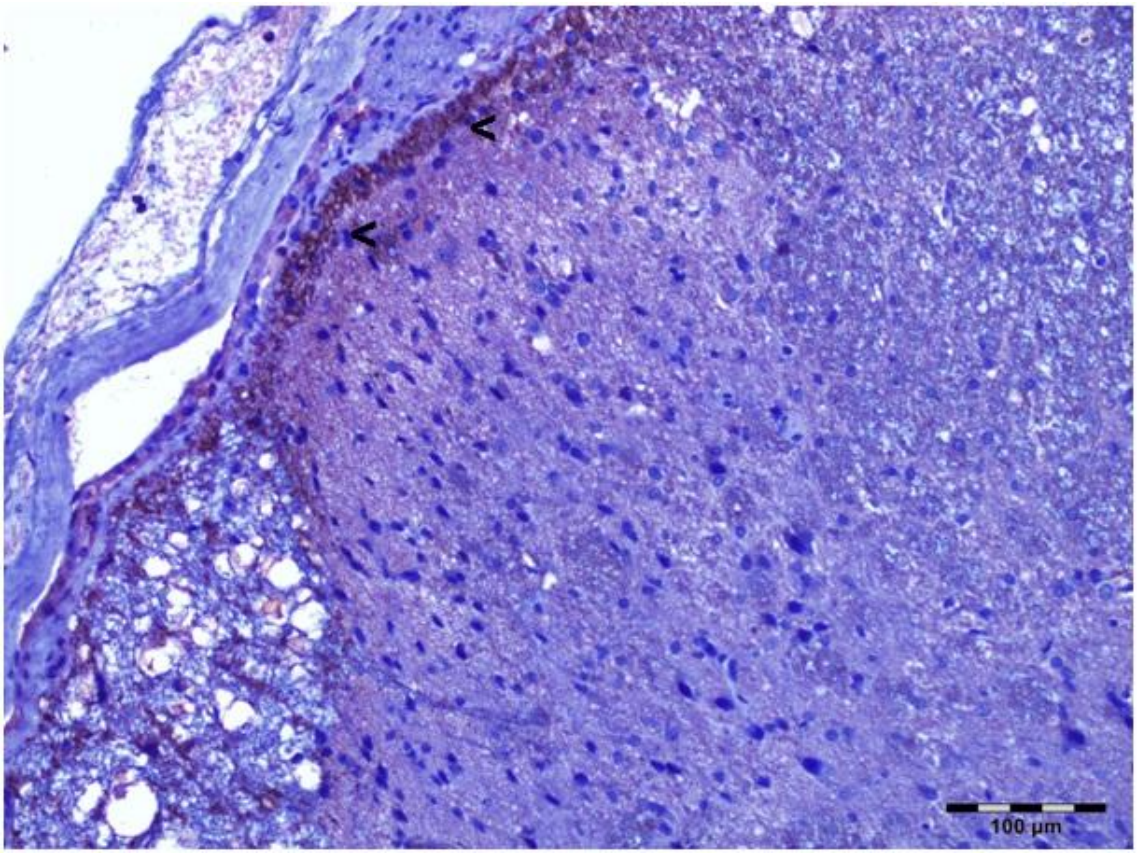
4.3.3. Deney Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanmasından sonra hiçbir tedavi uygulanmayan, sadece serum fizyolojik verilen bu gruba ait deneklerden, 24 ve 72. saatte alınan doku örnekleri, TNF-α ve IL-6 ekspresyonunu göstermek amacıyla immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi. 24. saatte deney kontrol grubundan alınan spinal kord doku örneklerinde, TNF-α ekspresyonunun özellikle gri cevherde yoğun olduğu görüldü. Dejenerasyonun şiddetli olduğu gri cevher bölgelerindeki nöron perikaryonlarında ve özellikle mikroglialar olmak üzere, glia hücrelerinin sitoplazmalarında, TNF-α ekspresyonun belirgin olarak artış gösterdiği dikkati çekti. Bu hücrelerin yanında, ortamda yer alan makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerde de TNF-α ekspresyonunun yoğun olduğu dikkati çekti. TNF-α ekspresyonu, nöronlar, glia hücreleri ve enflamatuvar hücreler yanında, aynı zamanda özellikle dejenerasyonun belirgin olduğu gri cevherin bölgelerindeki kan damarları endotel tabakasında da izlendi. Sağlam gri cevher bölegelerinde nöron ve glia hücrelerinde ve beyaz cevherdeki aksonlarda bu ekspresyonun hafif olduğu dikkati çekti (Şekil 49).

Aynı gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokularının immunohistokimyasal olarak incelenmesinde, TNF-α ekspresyonunun şiddetli dejenerasyona uğrayan gri cevher bölgelerinde 24 saatlik gruba oranla azalmış olduğu dikkati çekti. Bu grupta nöron perikaryonlarında, mikroglia hücrelerinin sitoplazmalarında ve sinir liflerinde TNF-α ekspresyonunun giderek azalmış olduğu ayırt edildi. (Şekil 50).



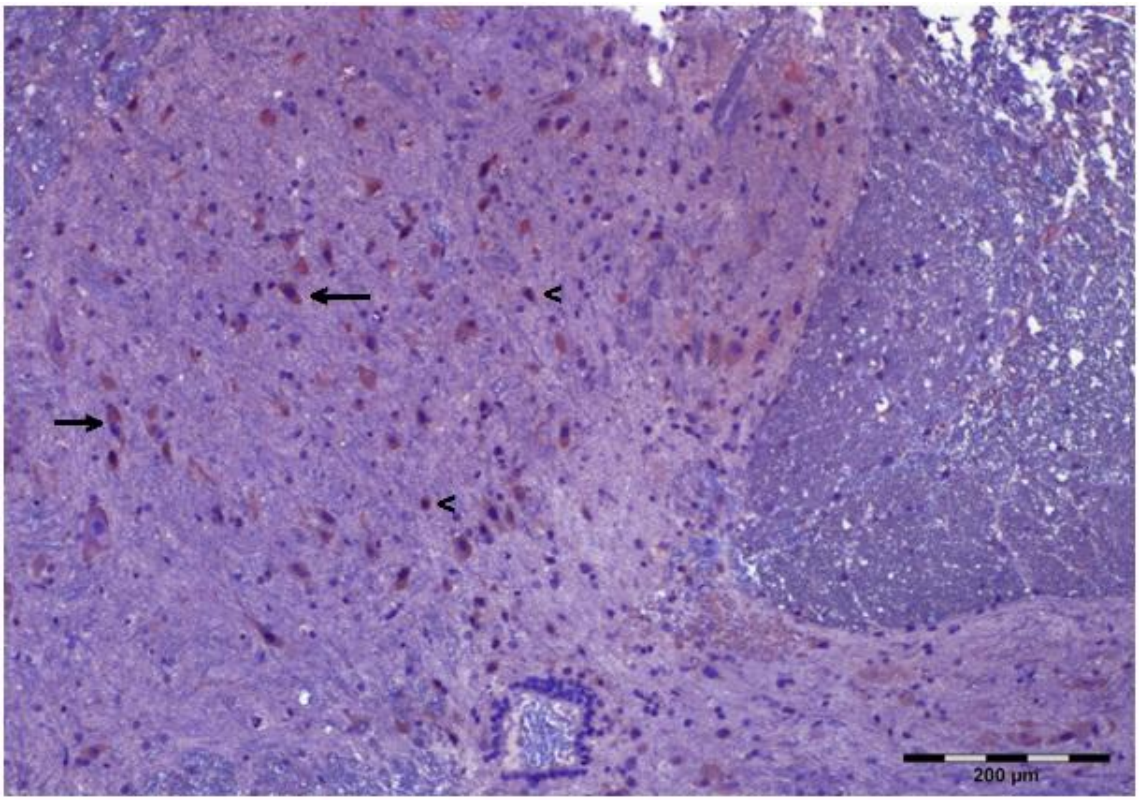
Şekil 49: Deney kontrol grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Deney kontrol grubundan 24 saat sonra alınan doku örneğinde TNF-α immunoreaktivitesi ok başları ile işaretli alanlarda görülmektedir. Gri cevherdeki nöron perikaryonlarında, glia hücrelerinde ve makrofajlarda TNF-α immunoreaktivitesinin yoğun olduğu izlenmektedir. Bar= 50 µm.



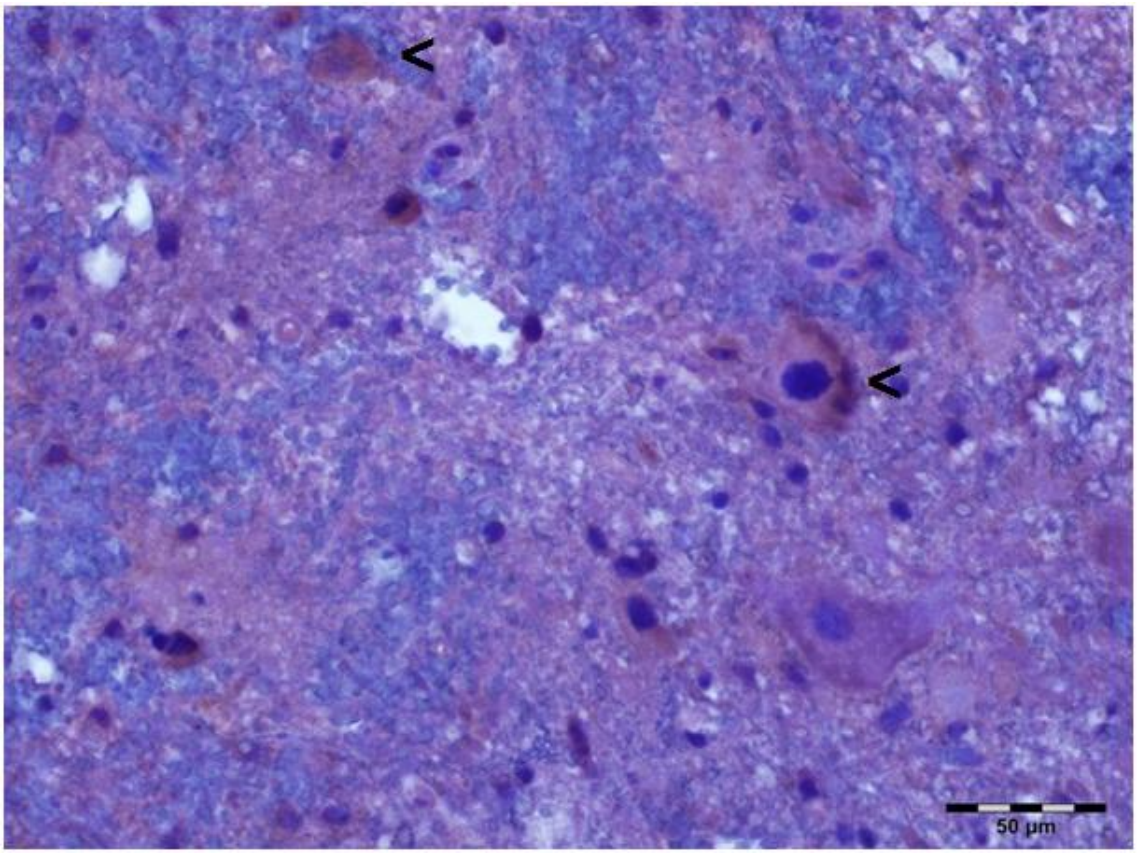
Şekil 50: Deney kontrol grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan doku örneğinde TNF-α ekspresyonu görülmektedir. TNF-α immunoreaktivitesi ok başları ile gösterilmiştir. Nöron perikaryonlarında ve glia hücrelerinde bu immunoreaktivitenin 24 saatlik gruba oranla azalmış olduğu dikkati çekmektedir. Bar= 100 µm.

Deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularının IL-6 ekspresyonunu göstermek amacıyla yapılan immunohistokimyasal değerlendirmesinde, 24. saatte bu ekspresyonun özellikle gri cevherde bulunan nöron perikaryonlarında çok yoğun olduğu görüldü. IL-6 ekspresyonu aynı zamanda hem gri hem de beyaz cevherde yer alan sinir liflerinde de izlendi. Özellikle gri cevherde hemorajinin şiddetli olduğu alanlarda kan damarlarının duvarında çok belirgin IL-6 ekspresyonunun varlığı ayırt ediciydi. Dejenerasyonun şiddetli olduğu merkezi gri cevher bölgelerinde makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerde IL-6 için yoğun pozitif boyanmaların olduğu dikkati çekti (Şekil 51).

Aynı gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokularının IL-6 ekspresyonu için immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi sonucu, IL-6 ekspresyonun gri cevherdeki nöron ve glia hücrelerinde, 24 saatlik gruba oranla azalmış olduğu izlendi. Bununla birlikte nöron perikaryonları, sinir lifleri, glia hücrelerinde, IL-6 ekspresyonu ayırt edilmekteydi. Hemoraji ve ödemin yoğun olduğu gri cevher bölgelerinde kan damarlarının duvarını döşeyen endotel hücrelerinin de IL-6 için pozitif olduğu dikkati çekti (Şekil 52).



Şekil 51: Deney kontrol grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Deney kontrol grubundan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin özellikle ok ile işaretli alanlarda nöron perikaryonlarında yoğun olduğu izlenmektedir. Glia hücrelerinin sitoplazmalarında da (ok başları) IL-6 ekspresyonu artmıştır. Bar= 200 µm.

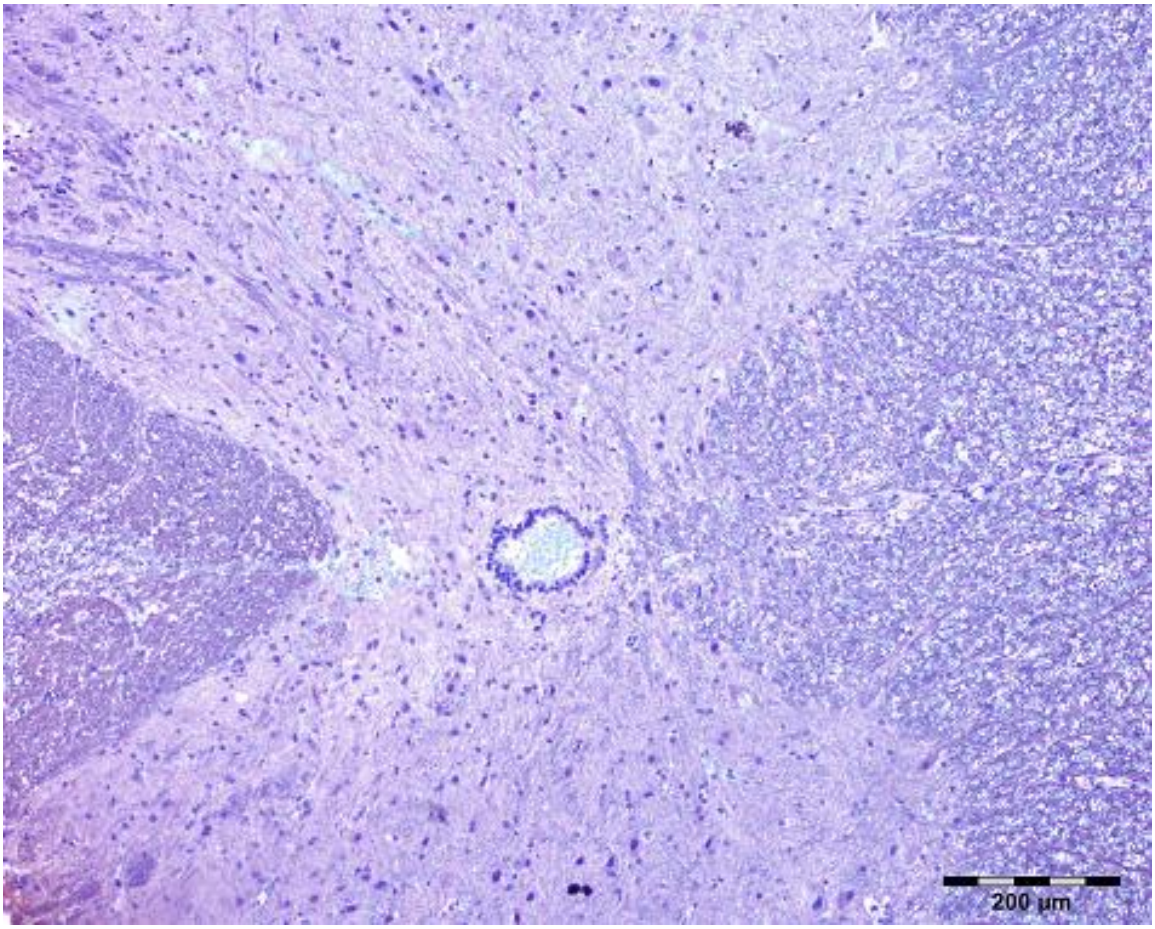


Şekil 52: Deney kontrol grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Deney kontrol grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin 24 saatlik gruba göre azalmakla birlikte, nöron perikaryonlarında ok başı ile işaretli alanlarda yoğun olduğu görülmektedir. Bar= 50 µm.

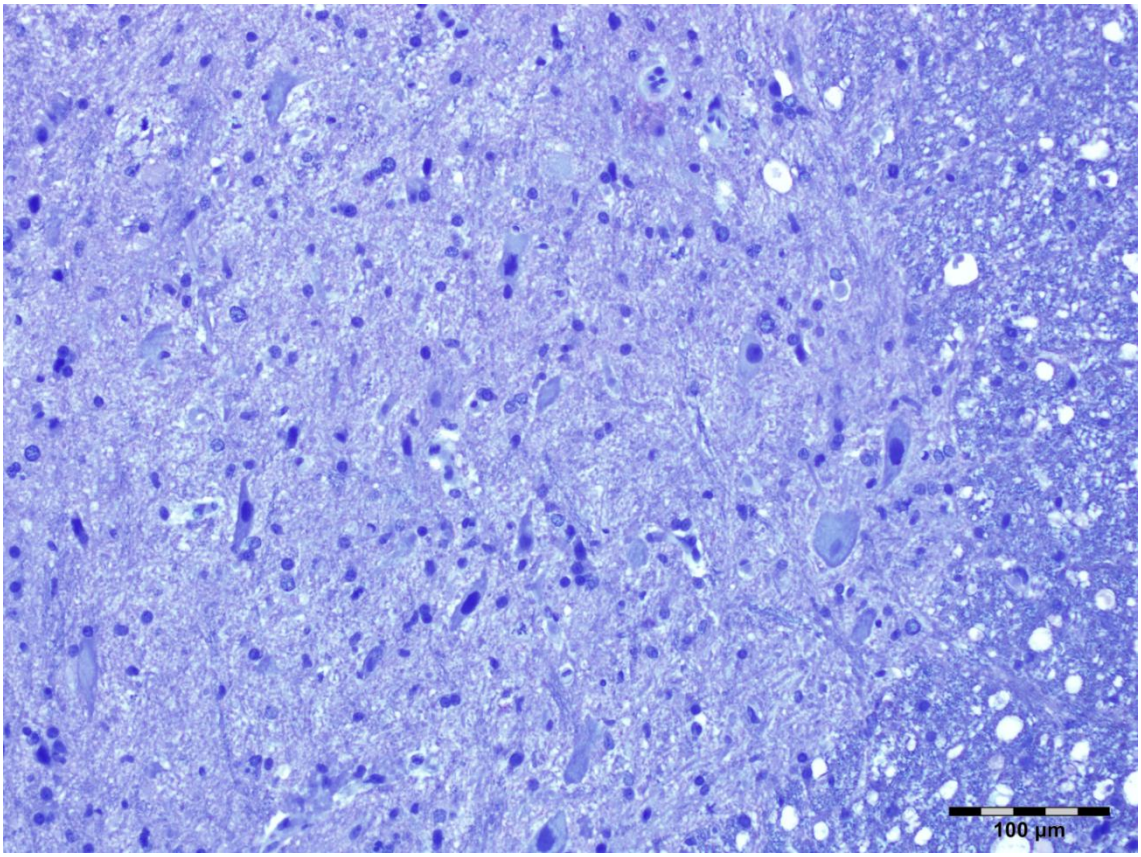
4.3.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup

Spinal kord yaralanması oluşturulduktan sonra sadece metilprednizolon tedavisi uygulanan bu gruba ait doku örnekleri 24 ve 72. saatlerde alınarak TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla immunohistokimyasal yöntemlerle hazırlanarak incelendi. Yaralanmadan 24 saat sonra elde edilen spinal kord doku örneklerinin TNF-α ekspresyonu için immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde, metilprednizolon tedavisinin TNF-α immunreaktivitesini önemli oranda düşürdüğü gözlendi. Deney kontrol grubu ile kıyaslandığında, özellikle gri cevherdeki nöron perikaryonlarında TNF-α ekspresyonunun anlamlı olarak azalmış olduğu dikkati çekti. Aynı şekilde hem gri hem de beyaz cevherde yerleşen glia hücrelerinde, özellikle mikroglialarda bu ekspresyonun önemli oranda düştüğü görüldü. Dejenerasyonun şiddetli olduğu hemorajik alanlarda kan damarlarında da TNF-α immunoreaktivitesi belirgin olarak azalmıştı (Şekil 53).

Aynı gruba ait 72. saatte elde edilen spinal kord doku örneklerinde ise gerek gri cevherdeki sinir hücre gövdelerinde, gerekse glia hücreleri ve sinir liflerinde, TNF-α immunoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu dikkati çekti (Şekil 54).



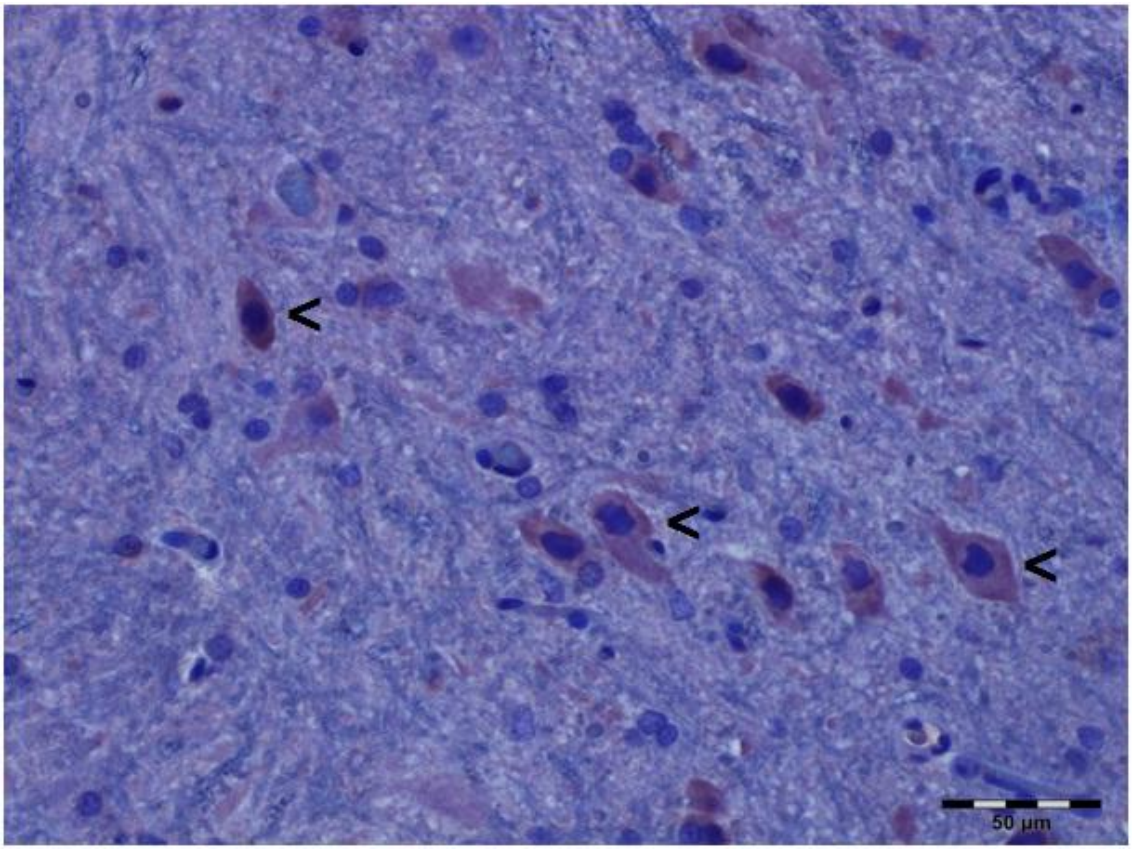
Şekil 53: Metilprednizolon grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin deney kontrol grubuna oranla gri cevherdeki nöron perikaryonlarında, glia hücrelerinde ve beyaz cevherdeki miyelinli sinir liflerinde belirgin bir şekilde azalmış olduğu görülmektedir. Bar= 200 µm.



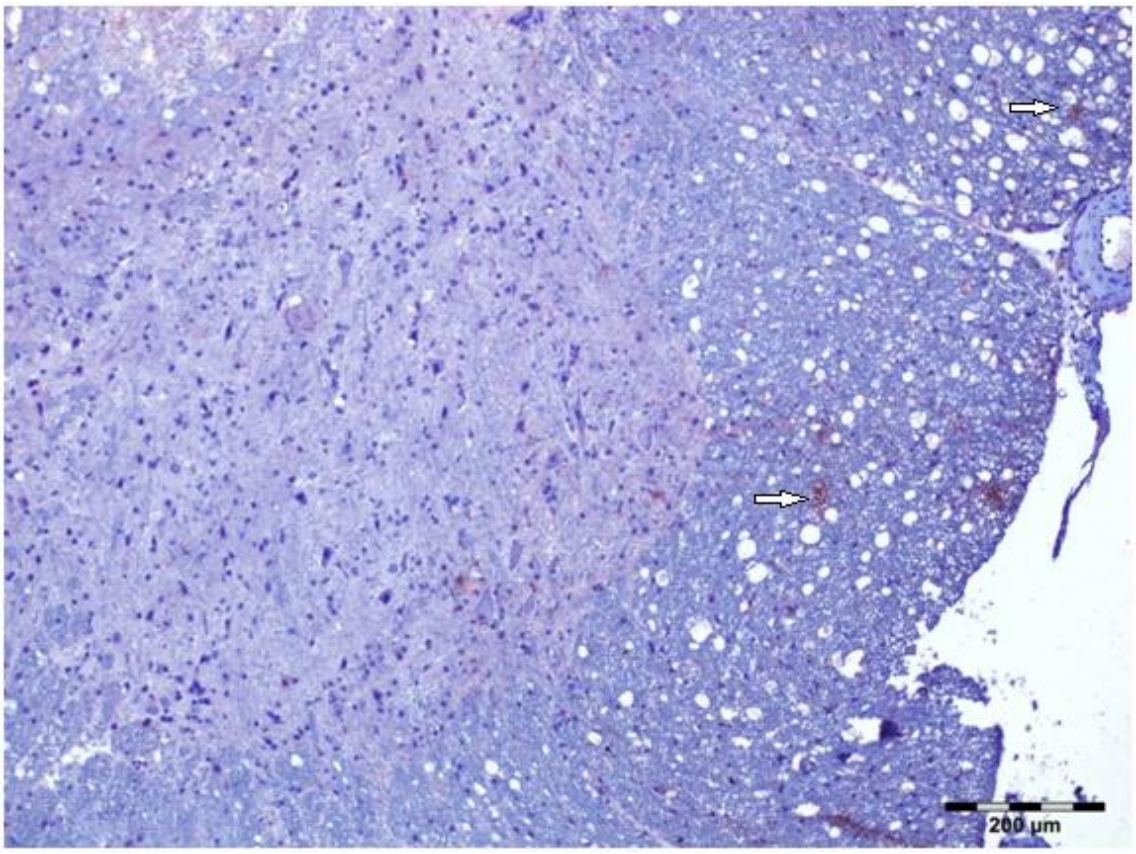
Şekil 54: Metilprednizolon grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.

Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte elde edilen dokular, IL-6 ekspresyonu açısından immunohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, yaralanma sonrası yoğun olarak eksprese olan IL-6'nın, metilprednizolon tedavisi ile bir miktar azalmakla birlikte özellikle gri cevherdeki nöron gövdelerinde bu ekspresyonun hala belirgin olduğu izlendi. Yaralanmayla birlikte hasar alanına göç eden makrofajlar, nötrofiller ile parankim içinde bulunan mikroglia hücrelerinde de IL-6 immunoreaktivitesinin fazla olduğu dikkati çekti (Şekil 55).

Yaralanmadan sonra 72. saatte bu gruptan elde edilen doku örnekleri, IL-6 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde, IL-6 ekspresyonunun, nöron perikaryonları, glia hücreleri, sinir lifleri, kan damarları ile makrofajlar/mikrogliya hücreleri ve nötrofillerde, deney kontrol grubuna ve metilprednizolon tedavisi alan 24 saatlik gruba oranla anlamlı derecede azalmış olduğu dikkati çekti. (Şekil 56).



Şekil 55: Metilprednizolon grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda nöron perikaryonlarında yoğun bir şekilde bulunan IL-6 immunoreaktivitesi ok başları ile işaretli alanlarda izlenmektedir. Bar= 50 µm.

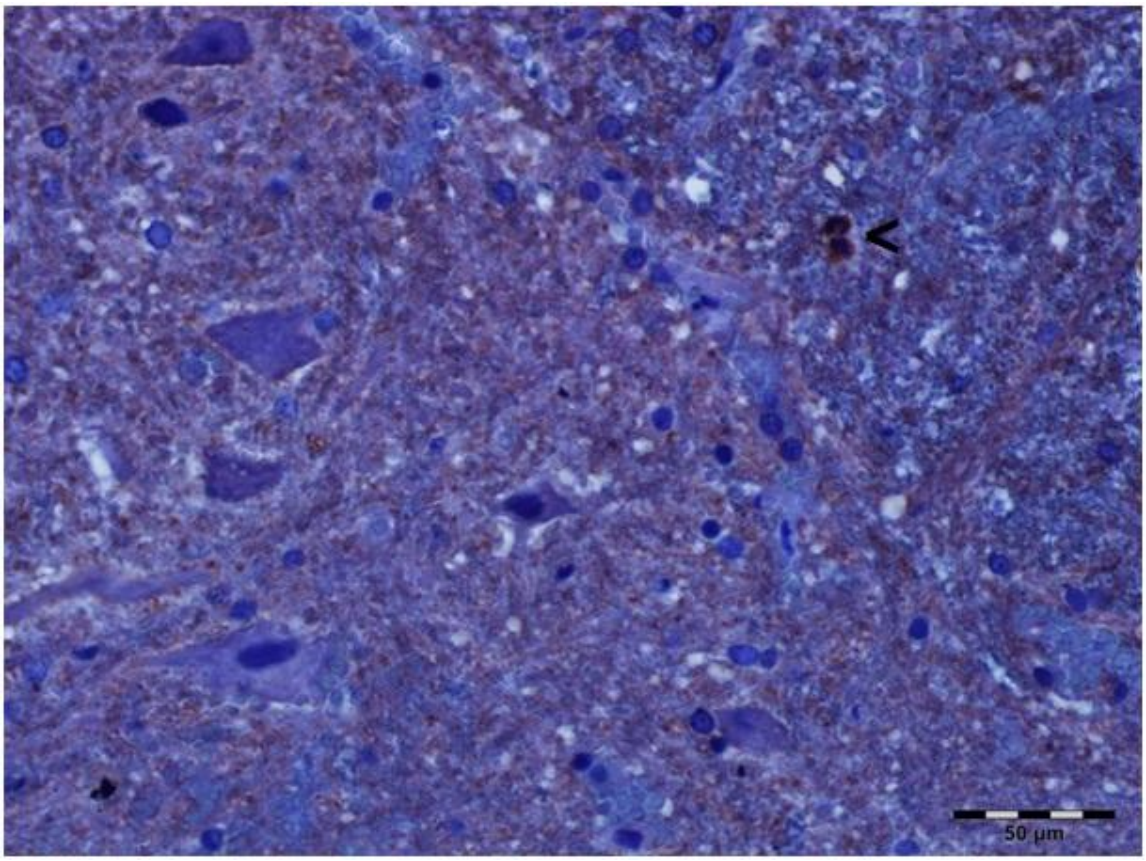


Şekil 56: Metilprednizolon grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 72. saatte alınan spinal kord doku örneğinde IL-6 immunoreaktivitesinin (oklar) deney kontrol ve 24 saatlik metilprednizolon grubuna oranla belirgin bir şekilde azalmış olduğu görülmektedir. Bar= 200 µm.

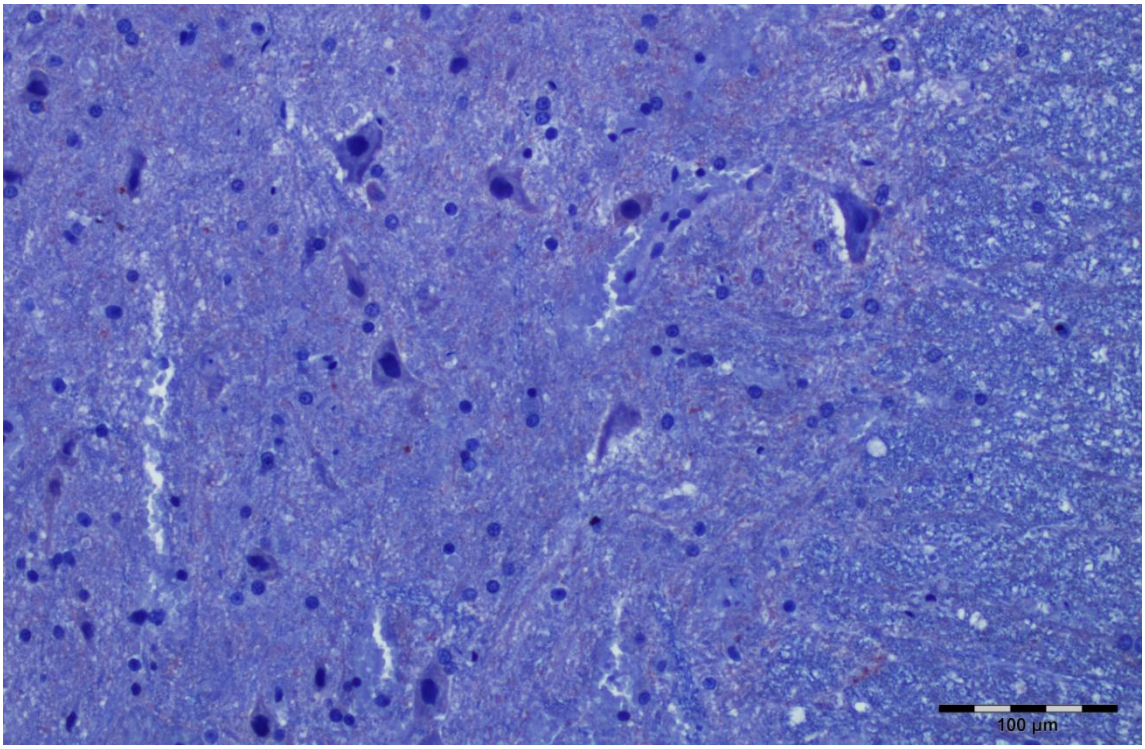
4.3.5. Minosiklin Tedavisi Uygulanan Grup

Spinal kord yaralanmasından sonra minosiklin tedavisi uygulanan gruba ait doku örnekleri 24 ve 72. saatlerde alınarak TNF-α ve IL-6 immunoreaktivitesi açısından değerlendirildi. Yaralanma sonrası 24. saatte alınan spinal kord dokularının TNF-α ekpresyonunun, gri cevherdeki sinir hücre perikaryonlarında, glia hücrelerinde ve sinir liflerinde bulunduğu izlendi. Her ne kadar deney kontrol grubuna göre daha zayıf bir ekspresyon elde edilmiş olsa da, metilprednizolon tedavisi alan grupla karşılaştırıldığında TNF-α immunoreaktivitesinin bu grupta daha belirgin olduğu görüldü (Şekil 57).

Aynı gruba ait, 72. saatte alınan doku örneklerinin TNF-α ekspresyonu açısından immunohistokimyasal değerlendirilmesinde, gri cevherdeki nöron gövdeleri, glia hücreleri ve miyelinsiz sinir liflerinde, beyaz cevherdeki miyelinli sinir liflerinde bu sitokinin immunoreaktivitesinin deney kontrol grubuna ve 24 saatlik minosiklin grubuna oranla belirgin olarak azalmış olduğu görüldü (Şekil 58).



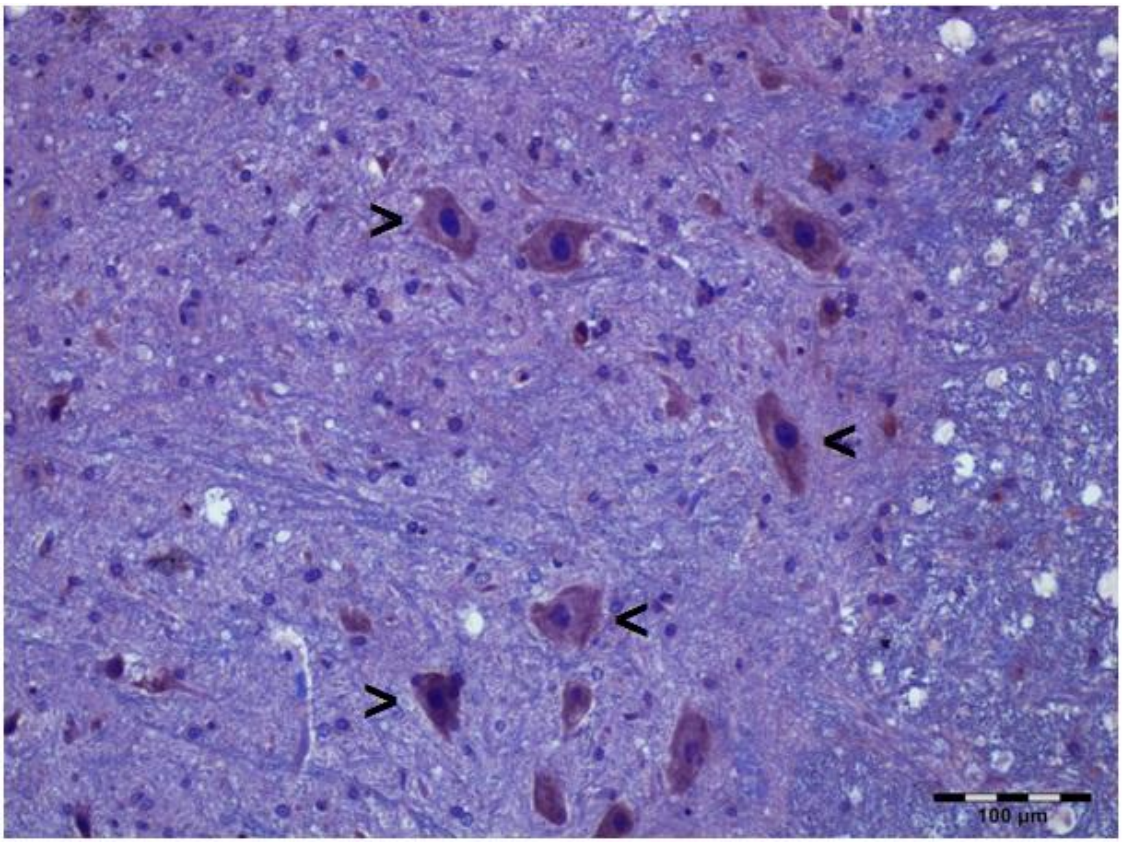
Şekil 57: Minosiklin grubunda 24. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Minosiklin tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte elde edilen spinal kord dokusunda nöron perikaryonları, glia hücreleri ve sinir liflerinde yoğun TNF-α ekspresyonu izlenmektedir. Makrofajlarda TNF-α immunreaktivitesi ok başları ile gösterilmiştir. Bar= 50 µm.



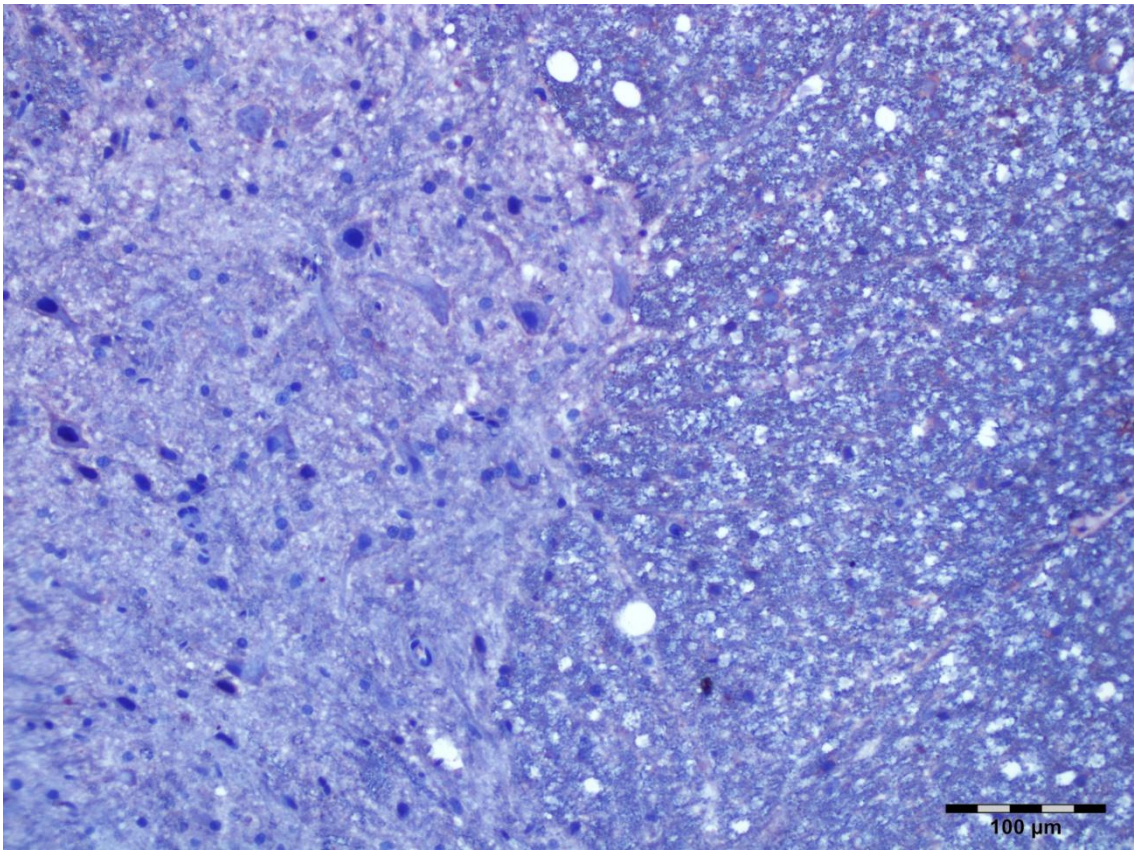
Şekil 58: Minosiklin grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Minosiklin tedavisi uygulanan gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde, ve sinir liflerinde belirgin olarak azalmış olduğu izlenmektedir. Bar= 100 µm.

Spinal kord yaralanması sonrasında minosiklin tedavisi uygulanan bu gruptan 24. saatte alınan doku örnekleri IL-6 immunreaktivitesi açısından değerlendirildiğinde, hem gri cevherdeki sinir hücre perikaryonlarında, glia hücreleri ve miyelinsiz aksonlarda, hem de beyaz cevherdeki glia hücreleri ve miyelinli aksonlarda IL-6 immunoreaktivitesinin deney kontrol grubuna oranla azalmış olmakla birlikte hala yoğun olduğu görüldü. 24 saatlik minosiklin tedavisi uygulanan bu grupla 24 saatlik metilprednizolon grubu arasında IL-6 immunoreaktivitesi açısından anlamlı farklılıklar bulunmadı (Şekil 59).

Minosiklin grubundan 72. saatte alınan spinal kord doku örneklerinde ise, gerek gri cevherdeki sinir hücre perikaryonlarında, gerekse glia hücreleri ve sinir liflerinde IL-6 immunoreaktivitesinin 24 saatlik gruba ve deney kontrol grubuna oranla önemli derecede azalmış olduğu izlendi (Şekil 60).



Şekil 59: Minosiklin grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Minosiklin tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin özellikle nöron perikaryonlarında (ok başları) ve glia hücrelerinde yoğun olduğu izlenmektedir. Bar= 100 µm.

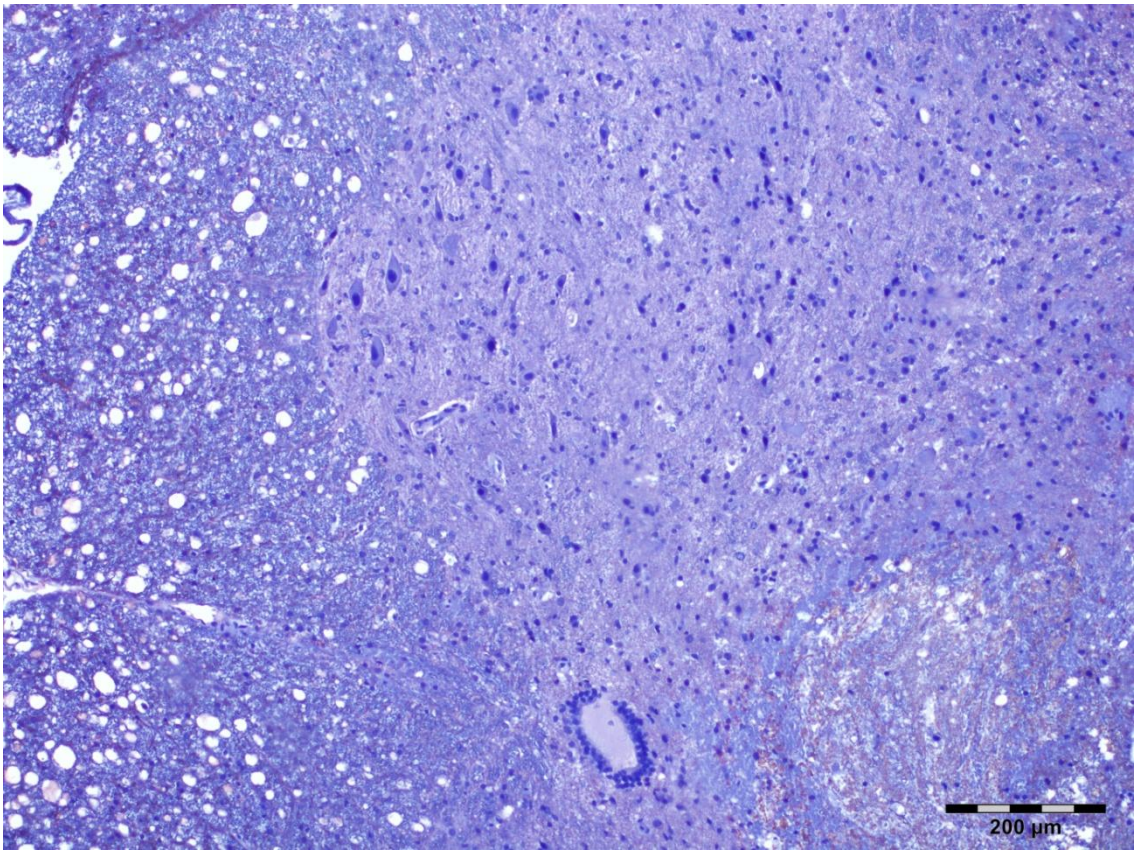


Şekil 60: Minosiklin grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Minosiklin tedavi grubundan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 ekspresyonunun nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde ve sinir liflerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.

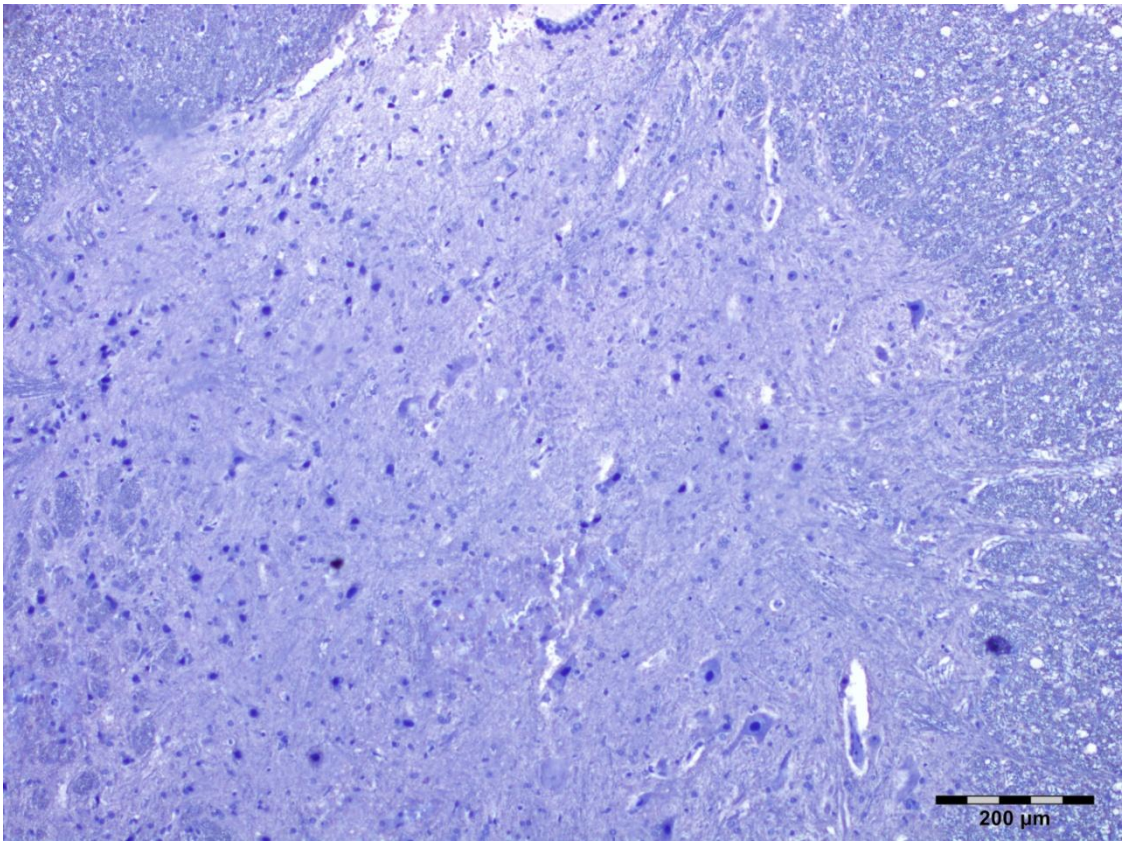
4.3.6. Metilprednizolon+Minosiklin kombine tedavi grubu

Spinal kord yaralanmasından sonra metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan deneklerden 24 ve 72 saat sonra elde edilen doku örnekleri doku örnekleri, TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarını gösterebilmek amacıyla immunohistokimyasal yöntemlerle incelendi. 24 saatlik kombine tedavi grubunun TNF-α ekspresyonlarının değerlendirilmesinde, özellikle gri cevherdeki nöron perikaryonlarında ekspresyonun belirgin bir şekilde azalmış olduğu izlendi. Metilprednizolon ve minosiklin tedavilerinin ayrı ayrı uygulandığı gruplarla kıyaslandığında, TNF-α ekspresyonunun gerek gri cevherdeki nöronlarda ve glia hücrelerinde, gerekse de beyaz cevherdeki miyelinli aksonlarda anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü (Şekil 61).

Aynı gruptan 72. saatte alınan spinal kord doku örneklerinin değerlendirilmesinde, 24 saatlik gruba benzer olarak, TNF-α ekspresyonlarının nöron perikaryonlarında, glia hücrelerinde, kan damarlarını döşeyen endotel hücrelerinde, beyaz ve gri cevherdeki sinir liflerinde, diğer tüm gruplara oranla belirgin olarak azalmış olduğu dikkati çekti (Şekil 62).

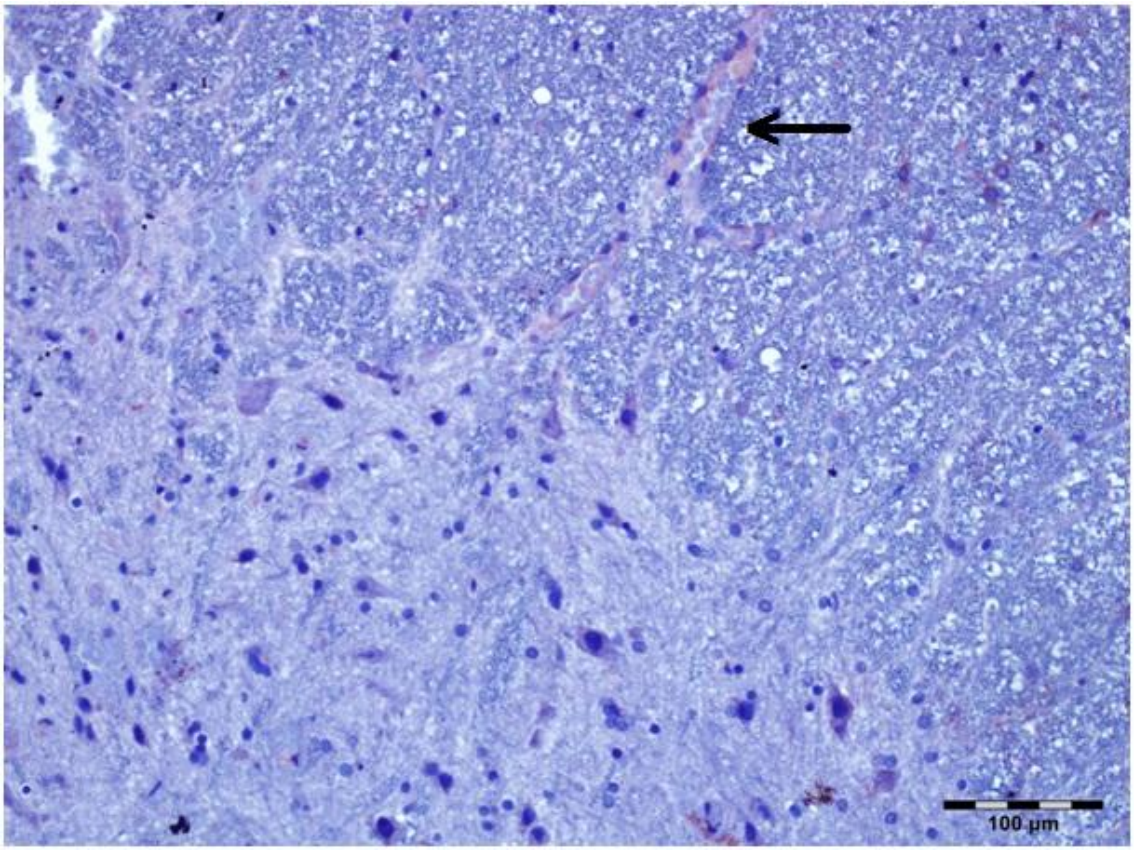


Şekil 61: Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α ekspresyonun tüm 24 saatlik gruplara oranla belirgin bir şekilde azalmış olduğu izlenmektedir. Nöron perikaryonları, glia hücreleri ve sinir liflerinde TNF-α immunoreaktivitesi diğer deney gruplarına göre azalmıştır. Bar= 200 µm.

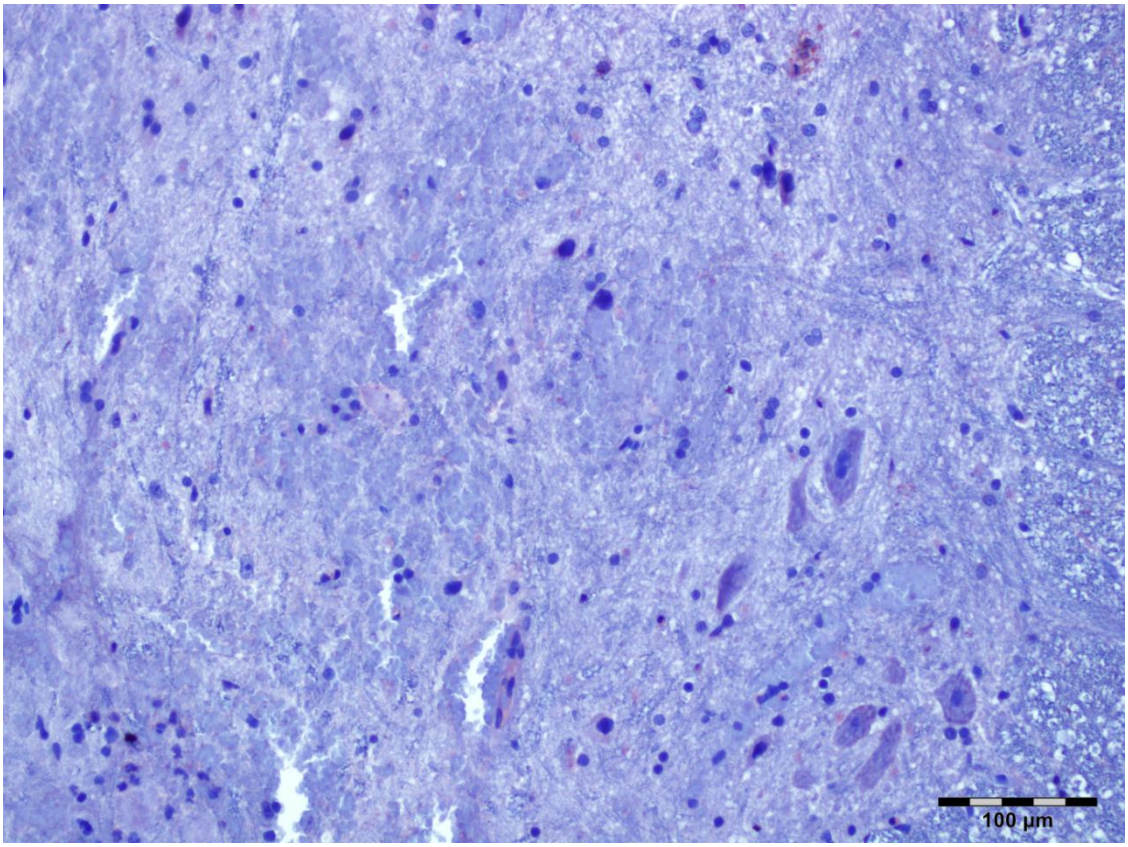


Şekil 62: Metilprednizolon+Minosiklin grubunda 72. saatte TNF-α immunoreaktivitesi. Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda TNF-α immunoreaktivitesinin gri cevherdeki nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde ve sinir liflerinde diğer deney gruplarına göre belirgin bir şekilde azaldığı görülmektedir. Bar= 200 µm.

Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan grubun 24 ve 72. saatlerde IL-6 ekspresyonu açısından değerlendirilmesinde, bu sitokinin, her iki zaman diliminde de nöronlarda, glia hücrelerinde ve sinir lifleri ile kan damarı duvarındaki ekspresyonu, diğer bütün deney gruplarına oranla, belirgin olarak azalmış olduğu gözlendi (Şekil 63 ve 64).



Şekil 63: Metilprednizolon+minosiklin grubunda 24. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruptan 24. saatte alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin gri cevherdeki nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde, ve sinir liflerinde belirgin şekilde azalmış olduğu izlenmektedir. Ok ile işaretli alanda kapiller endotelinde azalmış IL-6 ekspresyonu görülmektedir. Bar= 100 µm.

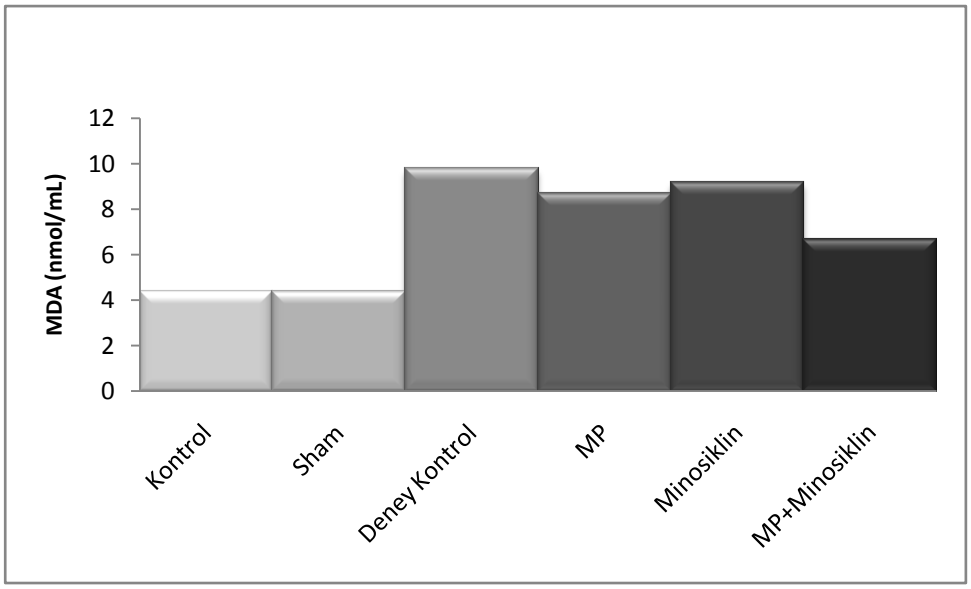


Şekil 64: Metilprednizolon+Minosiklin grubunda 72. saatte IL-6 immunoreaktivitesi. Metilprednizolon+minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruptan 72. saatte alınan spinal kord dokusunda, gri cevherdeki nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde ve miyelinsiz sinir liflerinde IL-6 immunoreaktivitesinin belirgin şekilde azalmış olduğu izlenmektedir. Bar= 100 µm.

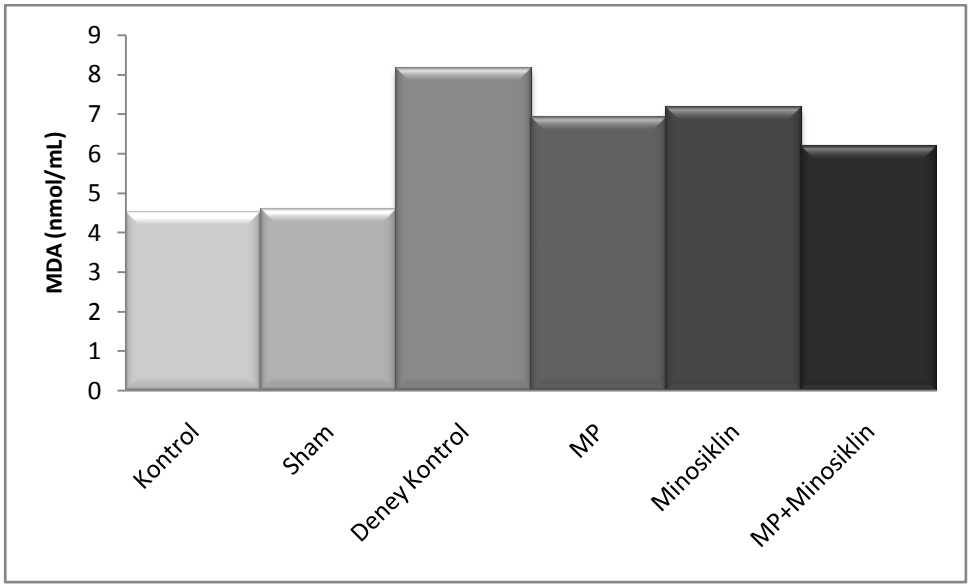
4.4. Biyokimyasal Bulgular

Malondialdehit (MDA) miktarı, lipid peroksidasyonu seviyesinin değerlendirilmesinde önemli bir ölçüttür. Spinal kord yaralanmasından 24 ve 72 saat sonra elde edilen doku örneklerinde ölçülen malondialdehit (MDA) seviyeleri Şekil 65 ve Şekil 66'da gösterilmiştir. Malondialdehit seviyesinin 24 saatlik gruplar arasındaki karşılaştırılmasında; sağlam grupta MDA seviyesi 4,40±0,14 iken, sham operasyon grubunda 4,36±0,24, deney kontrol grubunda; 9,78±0,46, Metilprednizolon (MP) ile tedavi edilen grupta; 8,71±0,12, Minosiklin ile tedavi edilen grupta; 9,17±0,23, ve MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda; 6,69±0,34 olduğu belirlendi. Malondialdehit seviyesinin 72 saatlik gruplar arasındaki karşılaştırılmasında; sağlam grupta MDA seviyesi 4,51±0,11 iken, sham operasyon grubunda 4,59±0,10, deney kontrol grubunda; 8,17±0,48, Metilprednizolon (MP) ile tedavi edilen grupta; 6,90±0,37, Minosiklin ile tedavi edilen grupta; 7,17±0,31, ve MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda; 6,17±0,29 olduğu tespit edildi.

Deney kontrol grubunda, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, MDA seviyesinin anlamlı olarak arttığı bulundu ($p<0.05$). MP ve Minosiklin grupları arasında fark önemsizdi. MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda ise, deney kontrol grubu, yalnızca MP ve yalnızca Minosiklin ile tedavi edilen gruplar ile karşılaştırıldığında, MDA seviyesinin anlamlı olarak azaldığı ($p< 0.05$) dikkati çekti.



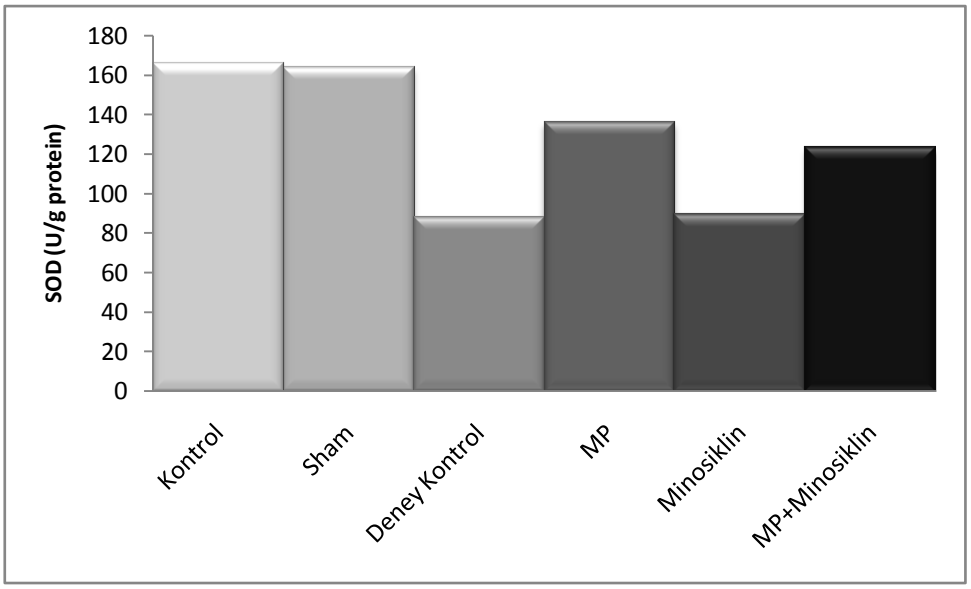
Şekil 65: Bütün gruplardan 24. saatte elde edilen malondialdehit (MDA) seviyeleri



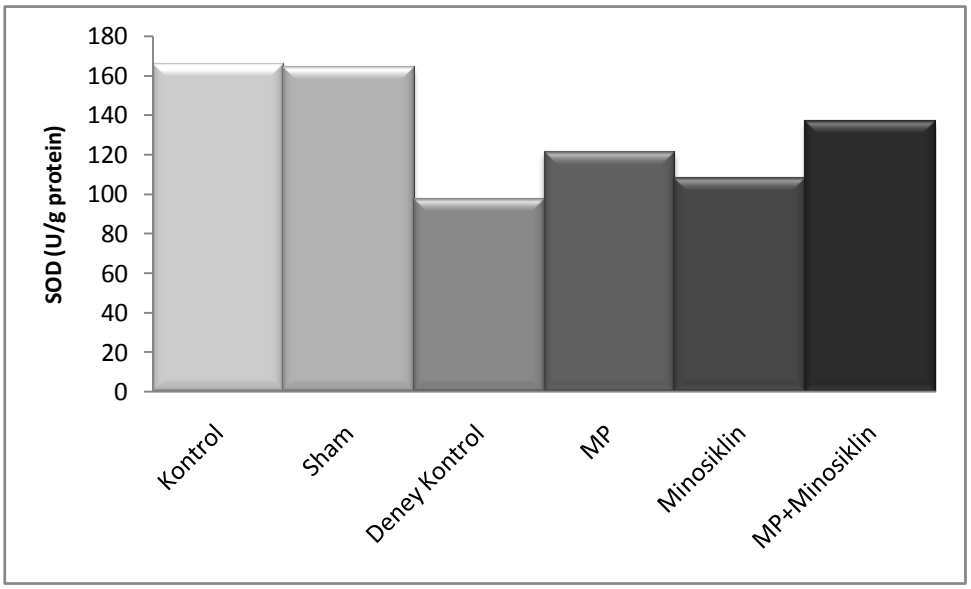
Şekil 66: Bütün gruplardan 72. saatte elde edilen malondialdehit (MDA) seviyeleri

Spinal kord yaralanmasından 24 ve 72 saat sonra elde edilen doku örneklerinde ölçülen superoksit dismutaz enzim (SOD) seviyeleri Şekil 67 ve Şekil 68'de gösterilmiştir. Superoksit dismutaz enzim seviyesinin 24 saatlik gruplar arasındaki karşılaştırılmasında; sağlam grupta SOD seviyesi 166,09±6,70 iken, sham operasyon grubunda 164,12±6,42, deney kontrol grubunda; 87±9,61, Metilprednizolon (MP) ile tedavi edilen grupta; 136,18±9,54, Minosiklin ile tedavi edilen grupta; 89,69±7,31, ve MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda; 123,13±7,98 olduğu belirlendi. Superoksit dismutaz enzim (SOD) seviyesinin 72 saatlik gruplar arasındaki karşılaştırılmasında; sağlam grupta SOD seviyesi 165,91±5,17 iken, sham operasyon grubunda 164,12±6,42, deney kontrol grubunda; 97,58±8,89, Metilprednizolon (MP) ile tedavi edilen grupta; 121,17±9,41, Minosiklin ile tedavi edilen grupta; 107,69±5,54, ve MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda; 136,97±6,18 olduğu tespit edildi.

Deney kontrol grubuna ait SOD seviyesi, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, SOD seviyesinin bu grupta anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p< 0.05$). Tek başına tedavi grupları olan; MP ve Minosiklin grupları arasında fark önemsizdi. MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda, deney kontrol grubu ve yalnızca MP ve yalnızca minosiklin ile tedavi edilen gruplar ile karşılaştırıldığında, SOD seviyesinin anlamlı olarak arttığı ($p< 0.05$) dikkati çekti.



Şekil 67: Bütün gruplardan 24. saatte elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri



Şekil 68: Bütün gruplardan 72. saatte elde edilen süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri

5. TARTIŞMA

Deneysel akut spinal kord yaralanması sonrasında TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarına, MP ve minosiklin tedavisinin tek başına ve kombine etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, sitokin ekspresyonunun spinal kord hasarı oluşturulan gruplarda belirgin olarak artış gösterdiği, bu artışın yaralanmayı takiben 24 saat sonra elde edilen gruplarda daha belirgin olduğu, 72 saat sonra elde edilen doku örneklerinde ise sitokin ekspresyonunda belirgin bir azalmanın ortaya çıktığı, bu azalmanın özellikle tek başına MP tedavisi alan ve kombine tedavi gruplarında çok daha anlamlı olduğu dikkati çekti. Işık ve elektron mikroskobik değerlendirmelerde, spinal kord yaralanması oluşturulan gruplarda hücresel hasarın nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde belirgin olduğu, hücresel değişikliklerin, 72 saat sonra alınan doku kesitlerinde daha da şiddetli olduğu gözlendi. Tedavi gruplarında, tedavinin hücresel hasarın sınırlandırılmasında belirli ölçüde etkili olduğu, travma sonrası tek başına MP tedavisinin, tek başına Minosiklin tedavisine göre daha etkin olduğu, ancak MP+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan gruplarda, hücresel yapının çok daha iyi korunduğu belirlendi. Bunların yanında, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeyinin, deney kontrol grubunda, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak arttığı, buna karşın MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda MDA seviyesinin anlamlı olarak azaldığı dikkati çekti. Ayrıca, deney kontrol grubuna ait SOD seviyesinin, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak azaldığı saptandı. MP+Minosiklin kombine tedavi grubunda SOD seviyesinin, diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, anlamlı olarak arttığı gösterildi.

Akut spinal kord yaralanması sonrası oluşan doku hasarını takiben, çoğunlukla daha ciddi yapısal ve fonksiyonel kayıplara neden olan sekonder dejeneratif reaksiyonların başlaması tetiklenmektedir. Spinal kord hasar bölgesine periferik kandan göç eden, başlıca nötrofiller ve makrofajlar enflamatuvar reaksiyonların oluşumunu başlatmaktadır. Doku hasarının meydana geldiği alana göç eden makrofajlar ve lökositler, oluşan hücresel artıkları fagosite etme yanında, enflamatuvar reaksiyonların başlatılmasında rol oynayan sitokinleri de salgılamaktadırlar. Sitokinlerin yaralanma

alanında salgılanmasının enflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde yararlı etkileri yanında, zararlı oldukları da kabul edilmektedir. Dolayısıyla, merkezi sinir sisteminde doku yaralanmasına sekonder olarak gelişen enflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde rol alan faktörler, günümüzde hala önemli bir tartışma konusudur. Enflamatuvar reaksiyonların oluşumunda, özellikle MSS veya enflamatuvar hücreler tarafından, ortama salınan sitokinlerin, etken olduğu geniş olarak kabul edilmektedir. Doku hasarı sonucunda ortama göç eden kan lökositleri ve monositler, enflamatuvar ve immün cevapları düzenleyen sitokinleri salgılamaktadır[184]. Spinal kord yaralanması sonrası salınan sitokinlerin, ortamda yüksek oranda, uzun süreli bulunmalarının doku hasarına neden olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir.

Sunulan çalışmada, SKH oluşturulan ve herhangi bir tedavi almayan deney kontrol grubunda, gri ve beyaz cevherde yaygın ödematöz ve hemorajik alanların varlığı yanında, kan damarlarında oklüzyon ile endotel hücrelerinde belirgin hücresel hasarın oluştuğu gözlendi. Bunların yanında, reaksiyon ortamında, bol miktarda kan lökositleri ve eritrositler ile makrofajların yer aldığı dikkati çekti. Bunların yanısıra, enflamatuvar reaksiyonların belirgin olduğu bu alanlarda, nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde ileri derecede dejeneratif değişiklikler gözlendi. Lee ve ark[185], entodelyal CAM, ICAM, VCAM, PECAM, P ve E selektinlerin artışının, kandan köken alan lökositlerin primer yaralanma bölgesine toplanmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Tonai ve ark[186] da, IL-8 ve CXC kemokinler ve CINC-1'in de nötrofillerin yaralanma alanında toplanmasını stimüle ettiğini göstermişlerdir. Makrofajlar ile birlikte, yaralanma sonrası ortamda bulunan hücresel artıkları fagosite eden nötrofiller, lezyon alanında yüksek konsantrasyonda bulunan proenflamatuvar sitokinler ile uyarılmakta ve bu hücreler de, proteazlar gibi çeşitli mediyatörleri salgılamaktadırlar. Nötrofillere özgü bu sitokinlerin başlıcalarının, matriks metalloproteinaz-9, TNF-α, TGF-β, IL-1 ve IL-8 olduğu gösterilmiştir[187]. Damar duvarının gerek primer travma sonrası hasarlanması ve gerekse daha sonra geçirgenliğinin artışı, yaralanma ortamına bu hücrelerin infiltrasyonuna yol açmaktadır. İnfiltre olan bu hücrelerden ortama salınan mediyatörlerden özellikle matriks metalloproteinazlarının etkisiyle ekstraselüler matriksin kolaylıkla çözüleceği, bu durumun da lökosit ekstravazasyonunu daha da arttıracağı ve lökositlerin kemotaksisine neden olacağı rapor edilmiştir[65,188]. Yaralanma ortamına çok miktarda lökosit infiltrasyonunun, nöronlar ve gliya hücreleri üzerine

zararlı etkilere sahip olduğu görüşü geniş olarak kabul görmektedir. Nitekim çalışmamızda da enflamatuvar alanlara yakın alanlarda, nöron ve gliya hücrelerinde, ileri derecede dejeneratif değişikliklerin gözlenmesi, bu görüşü destekler niteliktedir.

Deney kontrol grubuna ait mikrograflarda, özellikle 24. saatte alınan doku örneklerinde, dejenerasyonun belirgin olduğu ve bu alanlarda, ortamda çok miktarda makrofajın bulunduğu dikkati çekmektedir. Makrofajlar, immün ve enflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde anahtar konumda hücrelerdir. Nötrofiller ile birlikte yüksek fagositoz yeteneğine sahip bu hücrelerin, spinal kord yaralanmalarının prognozunda da oldukça önemli rollere sahip oldukları kabul edilmektedir. Spinal kord yaralanmasını takiben ortaya çıkan akut nötrofil infiltrasyonunun, daha sonraki günlerde azaldığı, buna karşın monosit sayılarının arttığı bilinmektedir. Yaralanma alanında makrofajlara dönüşen kandan köken alan monositlerin yanında, parankimada var olan mikrogliyaların da ortamda toplandıkları bilinmektedir. SKH'ında enflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde önemli roller üstlenen bu hücrelerin, özellikle TNF-α tarafından aktive edildikleri ileri sürülmüştür[189]. Gerçekten de bizim çalışmamızda, makrofaj ve mikrogliyaların yoğun olarak bulunduğu alanlarda, şiddetli TNF-α ekspresyonunun gözlenmesi bu ilişkiyi kanıtlar niteliktedir. MSS yaralanmalarında ortama salınan TNF-α'nın kaynağı konusunda tam bir fikir birliği oluşmamıştır. Enflamatuvar hücreler yanında, nöronların ve gliya hücrelerinin de bu sitokini sentez ettiği rapor edilmiştir[189]. Çalışmamızda da, bu bulgulara paralel olarak, TNF-α ekspresyonunun, yaralanma bölgelerinde şiddetli dejenerasyonun oluştuğu alanlarda, çok daha belirgin olmak üzere, nöron perikaryonlarında, mikrogliya hücrelerinde, enflamatuvar hücrelerde ve kapiller endotel hücrelerinde belirgin olarak bulunduğu dikkati çekti. Endotel hücrelerinde de gözlenen bu ekspresyon, bu sitokinin enflamatuvar hücrelerin ekstravazasyonu ve kemotaksisinde de yer alabileceğinin bir göstergesi olarak değerlendirildi. Yan ve arkadaşları[164], TNF-α'nın, MSS'inde enflamatuvar reaksiyonların başlaması ve sürdürülmesinde, anahtar konumda rol oynayan bir mediyatör olduğunu belirtmişler, bu molekülün sentezinin yaralanma ile birlikte uyarıldığını ve erken dönemde ekspresyonunun ortaya çıktığını göstermişlerdir. Araştırmacılar, spinal kord yaralanması sonrası TNF-α ekspresyonunun, nöron ve gliya hücreleri yanında kan damarları endotelyal hücrelerinde de belirgin olduğunu rapor etmişlerdir. Diğer taraftan, TNF-α'nın lökosit aktivasyonuna bağlı endotel hasarından

sorumlu olduğu, yalnızca nötrofilleri aktive etmekle kalmayıp, aynı zamanda endotel hücrelerinde lökosit adhezyon moleküllerini de arttırdığı belirlenmiştir[4]. Bunların yanında, TNF-α'nın, endotel hücrelerinde direkt hasara da yol açtığı rapor edilmiştir[165]. Sunulan çalışmada TNF-α ekspresyonunun şiddetli olduğu 24 saatlik travma grubuna ait elektron mikrograflarda, endotel hücrelerinde çekirdekte kromatin kümeleşmesi, sitoplazmada büzüşme ve elektron yoğunluğunda artış dikkati çekmiştir. Endotel hücrelerinde gözlenen bu bulgular, endotel hücre apopitozu şeklinde yorumlanmıştır. Gerçekten de TNF-α' nın, oligodendrositler üzerine toksik etki yaptığı, nöronal fonksiyonu bozduğu ve hücrelerde apopitozu tetiklediği rapor edilmiştir[163]. Travmanın tetiklediği damar duvarında oluşan primer hasar yanında, daha sonra ortama salınan sitokinlerin de etkisi ile, sekonder endotel hasarının oluşabileceği, buna bağlı olarak da hemoraji ve ödem alanlarının daha da artacağı ileri sürülebilir. Enflamasyona giden bu reaksiyonlar kaskadının tetiklenmesinde, TNF-α'nın önemli olduğu kabul edilmektedir. Aşırı şekilde eksprese olan bu moleküllerin, özellikle kapiller damar seviyesinde oluşturacağı ileri hücresel hasarlara bağlı olarak, meydana gelen hemoraji ve ödem, kuşkusuz nöron ve gliya hücrelerine de zarar verecektir. Çalışmamızda özellikle hemoraji ve ödemin yaygın olduğu 24 ve 72 saatlik deney kontrol grubuna ait mikrograflarda, yaygın nöron ve gliya hücre dejenerasyonları izlenmektedir. Bu alanlara komşu bölgelerde ayrıca sinir liflerinde akson ve miyelin kılıf hasarlarının da varlığı dikkati çekmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalarda, travmatize spinal kord dokusunda TNF-α mRNA'sının 30 dakika sonra artış gösterdiği ve 4 saat sonra da pik yaptığı rapor edilmiştir[166]. Yaralanmadan hemen sonra gözlenen TNF-α pikinin geçici olduğu bilinmektedir. TNF-α'nın SKH'ından sonra ilk 24 saat içinde salındığı ve 1 hafta süresince de birikmeye devam ettiği, dolayısıyla bu sitokin ve bunu salgılayan hücrelerin, travmadan sonraki 24 saat ile 1 hafta sürecinde oluşan sekonder hasarlarla çok yakından ilişkili olduğu kabul edilmektedir[47]. Çalışmamızda, deney kontrol grubunda TNF-α düzeyinin 24.saate alınan dokulardaki ekspresyonunun oldukça belirgin olduğu, ancak 72.saatte bu ekspresyonda anlamlı bir azalmanın meydana geldiği belirlendi. Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda, TNF-α'nın hem sitotoksik hem de nöroprotektif etkilere sahip bir ajan olduğu[43], antikorlarla veya diğer sitokinler ile inhibisyonunun, MSS yaralanmalarında, fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu

etkilere neden olduğu, bu durumun TNF-α'nın sitotoksik etkisini ortaya koyduğunu[167], buna karşın TNF-α'nın, eksitotoksik hücre ölümüne karşı koruyucu etkilerinin bulunması da nöroprotektif olarak değerlendirilmektedir[168].

Spinal kord yaralanmasını takiben erken dönemde artış gösteren TNF'nin, geç dönemde ekspresyonunun azalması, primer hasarın akut etkisinin nispeten azalmasının bir sonucu olabileceği düşünüldü. Ekspresyonun geç dönemde azalması, merkezi sinir sisteminde travma veya iskemiyi takiben ortaya çıkan ve nöron hasarında oldukça önemli bir yer tutan, eksitotoksik hücre ölümüne karşı, koruyucu rolünün ifadesi olabileceği söylenebilir. Gerçekten de enflamasyonun erken safhasının nöral dokular üzerine zararlı olabileceği, buna karşın, geç enflamasyon olaylarının nöroprotektif olduğu, bu dönemde oluşan enflamasyonun, doku hasarına cevap olarak daha çok savunma ve tamire yönelik olduğu rapor edilmiştir[150].

Akut spinal kord yaralanması sonrası, erken ve geç dönemde TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarının birlikte değerlendirildiği bu ilk çalışmada, özellikle 24. saatte, TNF-α'nın yanında, IL-6 ekspresyonunun da nöronlarda ve gliya hücrelerinde belirgin olarak artış gösterdiği tespit edildi. Önceki çalışmalarda, spinal kord hasarının akut fazında, IL-6 ve IL-1'in en fazla eksprese olan, proenflamatuvar sitokinlerden olduğu rapor edilmiştir[171]. Yaralanmayı takiben ilk 15 dakika içinde, TNF-α ve IL-6 mRNA'larının hücresel ekspresyonu oldukça artmaktadır[164]. Dolayısıyla, çalışmamızda da immünohistokimyasal olarak gösterildiği gibi, her iki sitokinin de birbirlerinin ekspresyonunu kostimüle edebileceği ve yaralanma sonrası miktarlarının da artacağı kabul edilmektedir[172]. IL-6, özellikle MSS yaralanmalarında makrofaj/monosit fonksiyonlarında anahtar rolünde bulunan, multifonksiyonel bir sitokindir[173]. Bizim çalışmamızda da spinal kord hasarının belirgin olduğu alanlarda, makrofaj ve mikrogliya hücrelerinde IL-6 ekspresyonunun dikkat çekici olarak yükseldiği görülmektedir.

IL-6'nın, spinal kord yaralanması patofizyolojisinde sekonder hasarı başlattığı bilinmektedir[174]. Sunulan çalışmada, tedavi edilmeyen deney kontrol grubunda 24.saatte IL-6 ekspresyonunun, makrofaj ve mikrogliyaların yanında, nöronlarda ve gliya hücrelerinde de belirgin olduğu, bununla birlikte ekspresyonun, 72. saatte azaldığı dikkati çekti. Yapılan çalışmalarda, MSS travmalarından sonra IL-6 ekspresyonunun sentez ve salınımının arttığı, spinal kord yaralanmalarından 6 saat sonra ise, IL-6

mRNA'sının pik yaptığı rapor edilmiştir[158]. Erken dönemde IL-6 konsantrasyonunda gözlenen aşırı yükselmenin, nöral dokulara zararlı olduğu, bu nedenle bu sitokinin, nötralize edilmesinin yararlı olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından gösterilmiştir[158,159]. Mukaino ve arkadaşları[179], spinal kord hasarından hemen sonra verilen anti-IL-6 reseptör antikorunun etkilerini araştırdıkları deneysel çalışmalarında, IL-6 reseptör antagonisti uygulanan grupta, doku hasarı ile akson büyüme inhibitörü olan Nogo-A miktarı ve miyelin artıklarının oldukça azaldığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, aksonal rejenerasyon ve filizlenmenin de belirgin şekilde artış gösterdiğini, IL-6 nötralizasyonuna bağlı fonksiyonel düzelmenin oluştuğunu, bu iyileşmenin mikroglia hücreleri ile yakından ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Tuna ve arkadaşları[190] da deneysel serebral iskemi modelinde IL-6 nötralizasyonunun beyinde iNOS ekspresyonununda belirgin bir azalmaya neden olduğunu ve nöronlarda, gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde yapısal bütünlüğün nisbeten korunduğunu rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacı grubunun, spinal kord travması sonucunda oluşturulan doku hasarında, IL-6 antagonistinin etkilerini araştırdıkları diğer bir çalışmalarında, IL-6 antagonisti verilen grupta, iNOS aktivitesinin ve buna bağlı olarak da hücresel değişikliklerin şiddetinin azaldığını göstermişlerdir[191]. Çalışmamızda IL-6 ekspresyonunun şiddetli olduğu deney kontrol grubunda, makrofaj ve mikrogliyaların oldukça aktif hücreler oldukları, ultrastrüktürel olarak da, nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde yapısal değişikliklerin belirgin olduğu gözlendi. Bu grupta aşırı aktivasyon gösteren TNF-α yanında, IL-6 ekspresyonunun da yüksek olması, her iki sitokinin kostimülasyonu ile, enflamasyonu arttıracağı, buna bağlı olarak da, sekonder doku hasarının şiddetinin artacağını söylemek yanlış olmayacaktır.

Spinal kord yaralanmasında, enflamatuvar reaksiyonların başlatılması ve sürdürülmesinde aktif sitokinler olan TNF-α ve IL-6'nın ekspresyonlarına, MP ve minosiklinin etkilerinin ayrı ayrı ve kombine olarak ilk defa araştırıldığı bu çalışmada, tedavi sürecinde, bu ilaçların sitokin ekspresyonları üzerine olan muhtemel etkileri de değerlendirilmiştir. SKH'nın patogenezinin ortaya çıkarılmasına yönelik olarak yapılan araştırmaların sonuçları, bu alanda yeni tedavi yaklaşımlarını da beraberinde getirmektedir. Tedavi protokollerinin ana hedefi, akut fazda ortaya çıkan sekonder doku hasarının oluşturacağı harabiyeti sınırlamayı amaçlamaktadır[8] . Bugün için SKH'nın kabul edilen üniversal bir tedavi protokolü bulunmamasına rağmen[1,9], kortikosteroidler,

nöroprotektif etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen, spinal kord yaralanmalarında, antienflamatuvar ve ödem azaltıcı olarak ,uzun yıllardan buyana kullanılmaktadır[10].

Çalışmamızda akut spinal kord yaralanmasını takiben yalnızca metilprednizolon tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskobik incelemelerinde, 24 saat sonra alınan doku örneklerinde daha belirgin olmak üzere, kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarının belirgin olduğu, nöronlarda ve glia hücrelerinde yapısal değişiklikler ile miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf harabiyetlerinin meydana geldiği, bu bulguların, 72 saat sonra alınan doku örneklerinde de, daha hafif seyretmesine rağmen, varlığını sürdürdükleri gözlendi. TNF-α ve IL-6 ekspresyonlarının da 24.saatte belirgin olarak azaldığı, bu azalmanın 72.saatte daha belirgin olduğu saptandı. Diğer taraftan aynı grupta, MDA düzeyinin deney kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, SOD seviyesinin ise belirgin olarak arttığı bulundu. Steroidlerin lipid peroksidasyonunu ve enflamatuvar sitokinleri inhibe ettikleri, enflamatuvar ve immün hücreleri modüle ettikleri, vasküler perfüzyonu iyileştirdikleri, kalsiyum girişi ve birikimini engelledikleri yaygın olarak kabul edilmektedir[43]. Ayrıca bu ajanların, kemotaksisi ve lökosit göçünü inhibe ettikleri, fagositozu önleyerek, enflamatuvar mediyatör sentezini baskıladıkları ve lizozomal enzimlerin sentezini durdurarak enflamasyonu engelledikleri düşünülmektedir. Metilprednizolonun ayrıca, travma sonucu uyarılan serbest radikal hasarını da inhibe ederek, hücre membranlarını stabilize ettiği kabul edilmektedir[68]. Bunların yanında, MP'nin, yaralanma alanına makrofaj göçünü ve mikroglial hücre proliferasyonunu azalttığı, enflamatuvar sitokinlerin salınımını kontrol ederek enflamasyonu baskıladığı pek çok çalışmada rapor edilmiştir[76,77]. Çalışmamızda da, deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu grupta, özellikle TNF-α düzeyinde daha belirgin olmak üzere, sitokinlerin ekspresyonlarının belirgin olarak azaldığı, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeyinin anlamlı olarak düştüğü, SOD seviyesinin de artış gösterdiği bulundu. Aynı zamanda, çalışmamızda, MP'nin yaralanma alanında, makrofajlar ve nötrofiller gibi, enflamatuvar hücreleri azalttığı da gösterildi. Makrofajlardaki bu azalmanın, MP'nin indüklediği makrofaj toplanması ve proliferasyonunda önemli sitokinler olan, TNF-α ve IL-6 düzeyinin azalmasına bağlı olabileceği söylenebilir. Fagositik hücrelerin sayılarındaki aşırı yükselmenin engellenmesi, spinal kord yaralanmalarından sonra sinir doku kaybını önleyecektir[94].

SKH'nı takiben doku kaybının ana nedenlerinin, iskemi, ödem ve serbest radikallerin indüklediği lipid peroksidasyonu olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Lipid peroksidasyonu, spinal kord yaralanması sonucunda, erken dönemde meydana gelen sekonder bir bozulma olup[86], metilprednizolon tedavisinin, enflamatuvar sitokinlerin düzeyini azaltarak, lipidlerin hidrolizini engelleyecekleri ve bu yolla serbest radikal artışını önleyerek, hücrelerde ve sinir liflerinde membran bütünlüğünü korudukları düşünülmektedir. Bu nedenlerle, MP günümüzde hala SKH'nın tedavisinde yaygın olarak tercih edilmekle birlikte[82,83], bu ilacın etkilerinin tamamının yararlı olup olmadığı, nörolojik iyileşme üzerine olan yetersizliği[84], nötralizan etkileri ile zararlı etkilerinin, ileri moleküler analizler ile araştırılması gerekmektedir[43].

Günümüzde spinal kord hasarının tedavisinde, her ne kadar steroidler tedavi protokollerinde, dominant tedavi ajanı olarak kullanılsa da tek başına steroid tedavisinin yetersizliği göz önüne alınarak, pek çok diğer ajanın da, tek başına veya kombine olarak kullanıldığı protokoller, literatürde geniş olarak yayımlanmıştır. Son yıllarda MSS hasarlarında, kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilen, özellikle gram (+) ve gram (–) enfenksiyonlara karşı etkili bir tetrasiklin olan Minosiklinin, SKH tedavi protokollerinde yer aldığı dikkati çekmektedir. Minosiklinin etki mekanizması tam olarak bilinmese de, glutamat aracılı eksitotoksisiteyi önlediği, mikroglial aktivasyonu engelleyerek, antienflamatuvar etkiye sahip olduğu, sitokrom-c ve caspaz salınımını bloke ederek, apopitotik nöronal hücre ölümünü azalttığı, aynı zamanda matriks metalloproteinaz-2 aktvitesini inhibe ettiği yaygın olarak kabul edilmektedir. Diğer taraftan Minosiklin antienflamatuvar etkisi ile mikroglial aktivasyonu da inhibe etmekte ve bu yolla, bir çok nörodejeneratif hastalığın patogenezinde rol alabileceği ileri sürülmektedir[24].

Sunulan çalışmada spinal kord yaralanması sonrası yalnızca Minosiklin ile tedavi edilen grupta, bu ajanın 24. saatte TNF-α ekspresyonu üzerine MP kadar etkili olmadığı, ancak deney kontrol grubuna oranla, bu sitokinin aktivitesini azaltmış olduğu görüldü. İlginç bir şekilde, minosiklinin 24 saatte IL-6 ekspresyonu üzerine, MP'den daha etkili olduğu ve bu sitokinin immunoreaktivitesini 24.saatte anlamlı olarak azalttığı gösterildi. 72 saatlik minosiklin grubunda ise, her iki sitokin immunoreaktivitesinde belirgin bir azalma gözlendi. Stereoid tedavisi kadar olmasa da, minosiklinin TNF-α ekspresyonunu azaltması, IL-6 immünoreaktivitesini anlamlı olarak

düşürmesi, bu ilacın enlamatuvar reaksiyonların şiddetini sitokin seviyelerini azaltarak sağladığı düşünülmektedir. Bununla birlikte, spinal kord yaralanmasından sonra minosiklin tedavisi uygulanan grubun mikroskobik değerlendirmelerinde, özellikle 24. saatte ödem, kavitasyon ve hemoraji alanlarının deney kontrol grubuna benzer şekilde, yoğun olarak bulunduğu, gri cevherdeki nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde ve beyaz cevherdeki miyelinli sinir liflerinde şiddetli dejenaratif değişikliklerin varlığı gösterildi. Ancak bu değişikliklerin, 72 saatlik Minosiklin grubunda deney kontrol grubu ile kıyaslandığında, belirgin olarak azalmış olduğu dikkati çekti. Aynı grubun biyokimyasal analizlerinde, hem 24. ve hem de 72. saatte, MDA düzeyinin deney kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı, SOD aktivitelerinin ise belirgin bir şekilde artmış olduğu görüldü. Sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, tek başına Minosiklin tedavisinin, enflamatuvar reaksiyonlarda etkili olan TNF-α ve IL-6 ekspresyonunu azalttığı, lipid peroksidasyonunu düşürdüğü, SOD seviyesini de arttırdığı görülmektedir. Bu bulgulara dayanarak, Minosiklinin yararlı etkilerinin, enflamasyonu baskılayarak, lipid peroksidasyonu ve oksidatif stresi azaltarak yapabileceği ileri sürülebilir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Minosiklinin, MSS'inde nöronların ve miyelin kılıf oluşturan oligodendrositlerin apopitoz sürecine girmelerini engellediği ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığı bildirilmiştir. Spinal kord hasarını takiben, oligodendrositlerin apopitozunda pro-NGF'nin önemli role sahip olduğu kabul edilmektedir. Yune ve arkadaşları, minosiklinin, SKH'ından sonra mikroglialarda aktive olan ve pro-NGF üretimini uyaran, P38 MAPK molekülünü inhibe ederek, pro-NGF üretimini engellediğini ve böylece oligodendrosit apopitozunu önleyerek, fonksiyonel iyileşme sürecini hızlandırdığını rapor etmişlerdir[180]. Minosiklin tedavisi sonrasında, çalışmamızda da gösterildiği gibi, enflamatuvar sitokinlerin baskılanması, lipid peroksidasyonu ve zararlı oksidatif reaksiyonların azaltılması ile sinir dokuda yapısal bütünlüğün korunacağı açıktır. Bununla birlikte, Minosiklinin nöroprotektif etkilerinin hücresel ve moleküler temelleri üzerine ileri araştırmaların yapılması gerektiği de bir diğer gerçektir[25].

Akut SKH'nı takiben, TNF-α ve IL-6 ekspresyonunun hücresel dağılımı ve lezyon alanında ortaya çıkış sürelerinin birlikte gösterildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ayrıca SKH'ında enflamasyonda etkili olan bu sitokinlerin

ekspresyonları ile mikroskobik düzeyde hücrelerin yapıları üzerine, MP+Minosiklin kombine tedavisinin etkilerini içeren herhangi bir çalışma da bugüne kadar yapılmamıştır. Bu çalışmada ilk defa, akut spinal kord hasarında, MP+Minosiklin kombine tedavisinin, TNF-α ve IL-6 ekspresyonu üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

Kombine tedavi uygulanan grubun immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesinde, özellikle 24. saatte nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde, hem TNF-α hem de IL-6 immunoreaktivitelerinin, diğer tüm deney gruplarına oranla, belirgin şekilde azalmış olduğu dikkati çekti. Bunun yanısıra, MP+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan bu grupta, MDA düzeylerinin de, bütün deney gruplarına oranla, anlamlı olarak azalmış olduğu, SOD aktivitesinin ise, yine tüm deney gruplarıyla kıyaslandığında, anlamlı olarak artmış olduğu gösterildi. Ayrıca bu grubun ışık ve elektron mikroskobik değerlendirilmesinde, yaralanma alanlarında, kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarının oldukça azaldığı, spinal kord gri cevherinde yer alan nöron perikaryonları, glia hücreleri ile sinir liflerinde dejeneratif değişikliklerin, diğer tüm deney gruplarına oranla belirgin olarak azaldığı ve yapısal bütünlüğün korunması ilgi çekici bulundu. Literatürde, hem MP'nin hem de Minosiklinin tek başına nöroprotektif etkileri ile ilgili çalışmalar yer almaktadır. Buna karşın, MSS hasarlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan bu ilaçların, literatürde kombine olarak kullanıldığı yalnızca bir araştırmaya rastlanmıştır. Bu çalışmada, farelerde deneysel olarak oluşturulan otoimmün ensefalomiyelit modelinde yapılmış ve kombine tedavinin yararlı sonuçları rapor edilmiştir[192].

Akut spinal kord yaralanmasında, yaptığımız bu çalışma sonuçlarının yüz güldürücü olması ve kombine tedavi sonucunda enflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun anlamlı olarak azalmış olması, önemli bulgular olarak değerlendirildi. Her iki tedavi ajanının da, bugün için etki mekanizmalarının hala tam olarak açıklanamamış olması nedeniyle, sonuçlarımızın literatürde bu konudaki bilgi birikimine katkı yapacağını düşünmekteyiz. Gerçekten de kombine tedavi grubunda hem TNF-α hem de IL-6 ekspresyonlarının anlamlı olarak azalmış olması, lipid peroksidasyon düzeyinin azalmasını ve SOD seviyesinin de artmasını beraberinde getirmiştir. Bunlara ilaveten, özellikle nöronlarda ve gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organellerde yapısal bütünlüğün nispeten korunması da tedavinin etkinliğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel akut spinal kord yaralanmasından sonra, MP+Minosiklin kombine tedavisinin, yaralanma sonrasında artış gösteren proenflamatuvar sitokinlerden TNF-α ve IL-6 düzeyleri ile lipid peroksidasyonunu azalttığı, böylece nöronal ve glial hücre ölümünü engelleyerek fonksiyonel iyileşmeyi sağlayabileceği düşünüldü. Bu nedenle, akut spinal kord yaralanmasını takiben Metilprednizolon+Minosiklin kombine tedavisinin, oluşturulacak tedavi protokollerinde dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.

6. SONUÇLAR

Deneysel spinal kord yaralanmasından sonra TNF-alfa ve IL-6 ekspresyonlarına metilprednizolon ve minosiklin tedavilerinin ayrı ayrı ve kombine etkilerini ışık ve elektron mikroskobik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırmayı amaçladığımız bu çalışmamızın sonucunda;

1. Spinal kord yaralanması oluşturulmayıp, tamamen sağlam bırakılan kontrol grubunun ışık ve elektron mikroskobik incelemelerinde spinal kordda, nöron perikaryonlarının, glia hücrelerinin, miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin normal ince yapılarını korudukları,
2. Aynı grubun immunohistokimyasal değerlendirmelerinde, spinal kordda TNF-α ve IL-6 ekpresyonunun çok çok zayıf olduğu,
3. Biyokimyasal analizlerde MDA seviyelerinin minimal düzeyde olduğu ve SOD aktivitelerinin ise tüm gruplara oranla yüksek olduğu görüldü.
4. Spinal kord yaralanması oluşturulmayıp, T2-T7 seviyelerinde sadece laminektomi oluşturulan sham opresyon grubunda, sağlam bırakılan kontrol grubuna benzer olarak, spinal kordun normal histolojik yapısını koruduğu, nöronlar, glia hücreleri ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları,
5. İmmunohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda bu grupta da TNF-α ve IL-6 sitokin seviyelerinin minimal düzeylerde olduğu,
6. Sağlam kontrole benzer şekilde, MDA seviyelerinin çok düşük, SOD düzeyinin ise yüksek olduğu bulundu.
7. Spinal kord yaralanmasını takiben ilaç tedavisi almayıp sadece serum fizyolojik verilen deney kontrol grubunun ışık ve elektron mikroskobik değerlendirmelerinde, 24. ve 72. saatlerde, gerek spinal kord gri cevherinde, gerekse beyaz cevherinde şiddetli ödem, kavitasyon ve hemoraji alanlarına, sıklıkla rastlandı. Gri cevherde yerleşim gösteren nöron perikaryonlarında çekirdekte heterokromatin miktarının arttığı, sitoplazmik organellerin, özellikle mitokondriyonların genişlemeler gösterdiği ve krista yapılarının tamamen dejenerasyona uğramış olduğu, glia hücrelerinin sitoplazmik organellerinde

yapısal değişikliklerin oluştuğu, çoğu alanda, sinir liflerinde miyelin kayıplarının meydana geldiği, miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın lamellar yapısının tamamen bozulmuş olduğu ve aksonların şiddetli dejeneratif değişiklikler gösterdiği ve özellikle 72. saatte bu yapısal değişikliklerin daha da artmış olduğu bulundu.

8. Deney kontrol grubunun TNF-α ve IL-6 ekspresyonları açısından immunohistokimyasal olarak incelenmesi sonucunda, özellikle 24. saatte nöron perikaryonlarında, glia hücreleri ve sinir liflerinde her iki sitokinin de ekspresyonlarında belirgin bir artışın oduğu, ancak 72. saatte sitokin immunoreaktivitelerinin 24. saate göre azalmış olduğu,
9. Aynı grubun biyokimyasal değerlendirilmelerinde, MDA düzeylerinin diğer bütün gruplara oranla çok yüksek olduğu, SOD aktivitelerinin ise diğer gruplarla karşılaştırıldığında, anlamlı olarak azalmış olduğu görüldü.
10. Spinal kord yaralanmasını takiben yalnızca metilprednizolon tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskobik incelemelerinde, 24 saatlik gruplarda, kavitasyon, hemoraji ve ödem alanları deney kontrol grubuna oranla azalmış olsa da, hala varlığını korumaktaydı. Nöron ve glia hücreleri ile miyelinli sinir liflerinde, özellikle 24. saatte dejeneratif değişiklikler çok daha belirgindi. Miyelin kılıf kayıplarının oldukça fazla olduğu ve miyelin kılıfın normal lameller organizasyonlarının bozulduğu dikkati çekmekteydi. 72. saatte bu hücresel değişikliklerin, deney kontrol grubuna ve 24 saatlik MP grubuna oranla daha hafif seyrettiği bulundu.
11. Metilprednizolon tedavisi alan grupta, 24. saatte özellikle nöron gövdelerindeki TNF-α immunoreaktivitesinin deney kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı, 72. saatte ise her iki sitokinin de çok düşük seviyelerde olduğu görüldü. MP tedavisinin IL-6 immunoreaktivitesine 24 saatte çok belirgin bir etkisi olmadığı, ancak deney kontrol grubu ile kıyaslandığında bu grupta IL-6 ekspresyonunun azalmış olduğu bulundu.
12. MP tedavi grubunun biyokimyasal analizinde, MDA düzeylerinin deney kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı, SOD seviyesinin ise yine bu gruba oranla belirgin olarak arttığı bulundu.

13. Spinal kord yaralanmasından sonra minosiklin tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskobik değerlendirmelerinde, özellikle 24. saatte ödem ve hemorajik alanlar yoğun olarak izlendi. Gri cevherdeki nöron gövdelerinde, glia hücrelerinde, beyaz cevherdeki miyelinli sinir liflerinde şiddetli dejenaratif değişikliklerin oluştuğu ancak bu değişikliklerin 72 saatlik minosiklin grubunda nisbeten azalmış olduğu görüldü. Deney kontrol grubu ile kıyaslandığında, ödem, kavitasyon ve hemoraji alanları, nöron ve miyelinli sinir liflerinde harabiyet, özellikle 72. saatte belirgin bir şekilde azalmıştı.
14. Minosiklin tedavi grubunun TNF-α ve IL-6 immunoreaktivitesi açısından değerlendirilmesinde, minosiklinin 24. saatte TNF-α ekspresyonu üzerine MP kadar etkili olmadığı ancak deney kontrol grubuna oranla bu sitokinin aktivitesini azaltmış olduğu görüldü. İlginç bir şekilde, minosiklinin 24 saatte IL-6 ekspresyonuna MP'dan daha etkili olduğu ve bu sitokinin immunoreaktivitesini 24. saatte anlamlı olarak düşürdüğü bulundu. 72 saatlik minosiklin grubunda ise her iki sitokin immunreaktivitesi de belirgin olarak azalmıştı.
15. Minosiklin tedavisi MDA seviyeleri ve SOD aktivitesi açısından değerlendirildiğinde, her iki zaman diliminde de, MDA düzeyinin deney kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azaldığı, SOD aktivitelerinin ise belirgin bir şekilde artmış olduğu görüldü. MP grubu ile kıyaslandığında iki grup arasında MDA ve SOD aktiviteleri açısından anlamlı fark bulunmadı.
16. Spinal kord yaralanmasını takiben MP+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskobik değerlendirilmesinde, ödem, kavitasyon, ve hemoraji alanlarının, spinal kord gri cevherindeki nöron perikaryonları, glia hücreleri ile sinir liflerinde ve beyaz cevherdeki glia hücreleri ile miyelinli sinir liflerinde yapısal değişikliklerin, diğer tüm deney gruplarına oranla, belirgin olarak azalmış olduğu,
17. Kombine tedavi uygulanan grubun immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesinde, özellikle 24. saatte nöron gövdelerinde, glia hücreleri ve miyelinli sinir liflerinde, hem TNF-α hem de IL-6 immunoreaktivitelerinin diğer bütün deney gruplarına oranla, belirgin şekilde azalmış olduğu izlendi.

18. MP+Minosiklin kombine tedavisi uygulanan bu grupta, MDA düzeylerinin bütün deney gruplarına oranla anlamlı olarak azalmış olduğu, SOD aktivitelerinin ise deney gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı olarak artmış olduğu bulundu.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, spinal kord yaralanmasından sonra MP+Minosiklin kombine tedavisinin, yaralanma sonrasında artış gösteren proenflamatuvar sitokin düzeylerini ve lipid peroksidasyonunu azalttığı, böylece nöronal ve glial hücre ölümünü engelleyerek fonksiyonel iyileşmeye neden olabileceği sonucuna varıldı. Dolayısıyla akut spinal kord yaralanması sonucunda, MP+Minosiklin kombine tedavisinin, oluşturulacak tedavi protokollerinde dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Fehlings MG, Perin RG.** The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: Update with a review of recent clinical evidence. *Injury, Int J Care Injured,* **2005**; 36: 13-26.

2. **Holtslag HR, Post MW, Lindeman E, et al.** Long term functional health status of severely injured patients. *Injury*, **2007**; 38:280-9.

3. **Profyris C, Cheema SS, Zang DW et al.** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease,* **2004**; 15:415-436.

4. **Taoka Y and Okajima J.** Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology* **1998**; 56: 341-358.

5. **Tator CH, Fehlings MG**. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg,* **1991**; 75:15-26.

6. **Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, et al**. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Experimental Neurology,* **2003**; 184: 313-325.

7. **Merrill J, Benveniste E.** Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci,* **1996**; 19: 331-338.

8. **Schröter A, Lustenberger RM, Obermair FJ, et al.** High dose corticosteroids after spinal cord injury reduce neural progenitor cell proliferation. *Neuroscience,* **2009**; 161: 753–763.

9. **Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC.** Cell death in models of spinal cord injury. *Prog. Brain Res,* **2002**; 137: 37-47.

10. **Ducker TB, Zeidman SM.** Spinal cord injury: role of steroid therapy. *Spine,* **1994**; 19: 2281-7.

11. **Hsu CY, Dimitrijevic MR.** Methylprednisolone in spinal cord injury: the possible mechanism of action. *J Neurotrauma,* **1990**; 7: 115-119.

12. **Gaviria M, Privat A, d'Arbigny P, Kamenka J, Haton H, Ohanna F.** Neuroprotective effects of a novel NMDA antagonist, gacyclidine, after experimental contusive spinal cord injury in adult rats. *Brain Res,* **2000**; 874 (2): 200-9.

13. **Gaviria M, Privat A, d'Arbigny P, Kamenka JM, Haton H, Ohanna F.** Neuroprotective effects of gacyclidine after experimental photochemical spinal cord lesion in adult rats: dose-window and time-window effects. *J Neurotrauma,* **2000**; 17 (1): 19-30.

14. **Steeves JD, Tetzlaff W.** Engines, accelerators and brakes on functional spinal cord repair. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1998**; 860: 412-424.

15. **Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH.** Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *Journal of Physiology,* **2001**; 533 (1): 83-89.

16. **Ramon Y, Cajal S.** *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Hafner, New York, **1928.**

17. **Berry MS, Hall R, Follows L, et al.** Response of axons and glia at the site of anastomosis between the optic nerve and cellular and acellular nerve grafts. *J. Neurocytol,* **1988**; 17: 727-744.

18. **David S, Aguayo AJ**. Axonal elongation into peripheral nervous system bridges after central nervous system injury in adult rat. *Science,* **1981**; 214: 931-933.

19. **Weinberg E, Raine CS.** Reinnervation of peripheral nerve segments implanted into the rat central nervous system. *Brain Res,* **1980**; 198: 1-11.

20. **Guenard V, Xu XM, Bunge MB.** The use of Schwann cell transplantation to foster central nervous system repair. *Semin. Neurosci,* **1993**; 14: 401-411.

21. **Fehlings MG, Vawda R.** Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials. *Neurotherapeutic,* **2011**; 8(4): 704-720.

22. **Thuret S, Moon LD, Gage FH.** Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.,* **2006**; 7 (8): 628-643.

23. **Zhang Q, Peng L, Zhang D.** Minocycline may attenuate postherpetic neuralgia. *Medical Hypotheses,* **2009**; 73: 744-745.

24. **Hains BC, Waxman SG.** Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, **2006**; 26: 4308-4317.

25. **Wells JEA, Hurlbert RJ, Fehlings MG et al.** Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice. *Brain,* **2003**;126:1628-1637.

26. **McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T.** Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma*, **1998**; 15: 731-69.

27. **Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW.** The changing landscape of ischemic brain injury mechanisms. *Nature*, **1999**; 399: A7-14.

28. **McDonald JW, Sadowsky C.** Spinal cord injury. *The Lancet*, **2002**; 359: 417-425.

29. **Aki T, Toya S.** Experimental study on changes of the spinal-evoked potential and circulatory dynamics following spinal cord compression and decompression. *Spine*, **1984**; 9: 800-809.

30. **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^{2+} exchanger. *J Neurosci*, **1996**; 16: 545-552.

31. **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.

32. **Anderson DK, Hall ED.** Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med,* **1993**; 22:987-992.

33. **Faden AI, Jacobs TP, Holaday JW.** Comparison of early and late naloxone treatment in experimental spinal injury. *Neurology,***1982**; 32: 677-681.

34. **Wagner FC, Stewart WB.** Effect of trauma dose on spinal cord edema. *J Neurosurg,* **1981**; 54: 802-806.

35. **Dietrich WD, Chatzipanteli K, Vitarbo E, et al.** The role of inflammatory processes in the pathophysiology and treatment of brain and spinal cord trauma. *Acta Neurochir Suppl,* **2004**; 89: 69–74.

36. **Anderson DK, Means ED, Waters TR, et al.**Spinal cord energy metabolism following compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg,* **1980**; 53: 375-380.

37. **Casha S, Yu WR, Fehlings MG.** Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*, **2001**; 103: 203-218.

38. **Vaccari JPR, Marcillo A, Nonner D, et al.** Neuroprotective effects of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) treatment after spinal cord injury. *Neuroscience Letters*, **2009**; 465: 226-229.

39. **Blight A.** Mechanical factors in experimental spinal cord injury. *J Am Parapleg Soc*, **1988**; 11: 26–34.

40. **Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC et al.** Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res*, **2002**; 137: 37– 47.

41. **Emery E, Aldana P, Bunge MB, et al.** Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, **1998**; 89 (6): 911-20.

42. **Springer JE, Azbill RD, Knapp PE.** Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, **1999**; 5 (8): 943-6.

43. **Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN et al.** Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The Spine Journal*, **2004**; 4:451–464.

44. **Beattie MS, Farooqui AA, Bresnahan JC.** Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, **2000**; 17: 915-925.

45. **Crowe MS, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS.** Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat. Med*., **1997**; 3: 73-76.

46. **Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW.** Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma*, **2000**; 17: 857-869.

47. **Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al.** Neuronal and glial apoptosis after spinal cord injury. *J Neurosci*, **1997**; 17: 5395-406.

48. **Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS.** Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci. Res*, **1997**; 50: 798-808.

49. **McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP.** Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med*, **1998**; 4: 291-297.

50. **Koopmans GC, Deumens R, Buss A, et al.** Acute rolipram/thalidomide treatment improves tissue sparing and locomotion after experimental spinal cord injury. *Experimental Neurology*, **2009**; 216: 490-498.

51. **Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y.** Changes of extracellular levels of aminoacids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma*, **1996**; 13: 537-548.

52. **Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ.** Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res*, **1991**; 547: 344-348.

53. **McAdoo DJ, Xu GY, Rabak G, Hughes MG.** Changes in amino acid concentrations overtime and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp. Neurol*, **1999**; 159: 538-544.

54. **Weil ZM, Norman GJ, DeVries C, Nelson RJ.** The injured nervous system: a darwinian perspective. *Progress in Neurobiology*, **2008**; 86: 48-59.

55. **Matute C, Sanchez-Gomez MV, Martinez-Millan Z, Miledi R.** Glutamate receptor-mediated toxicity in optic nerve oligodendrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **1997**; 94: 8830-35.

56. **Steinhauser C, Gallo V.** News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci*, **1996**; 19: 339-345.

57. **Choi DW.** Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr. Opin. Neurobiol*, **1996**; 6: 667-672.

58. **Doble A.** The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther*, **1999**; 81: 163-221.

59. **Sakamoto A, Ohnishi ST, Ogawa R.** Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res*, **1991**; 554 (1-2): 186-192.

60. **Kurihara M.** Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. Relationship between Na-K-ATPase and lipid peroxidation. *J Neurosurg*, **1985**; 62 (5): 743-9.

61. **Rice-Evans CA., Burdan HR.** *Free Radical Damage and Its Control*. New Comprehensive Biochemistry, **1994**; 28: 217-38.

62. **Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D.** Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Rev*, **2001**; 53 (1): 135-59.

63. **Venkatochalam M. Robbins.** *Pathologic Basis of Disease*, 6th edition. Philadelphia: WB. Saunders Company, 2010.

64. **Tator CH.** Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*, **1995**; 5: 407-413.

65. **Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L.** Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp. Neurol*, **1998**; 151: 77-88.

66. **Pearse DD, Marcillo AE, Qudega M, Lynch MP, Wood PM, Bunge MB.** Transplantation of Schwann cells and olfactory ensheating glia after spinal cord injury: Does pretreatment with methylprednisolone and interleukin 10 enhance recovery? *Journal of Neurotrauma,* **2004**; 9: 1223-1239.

67. **Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al.** A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. *New Engl J Med*, **1990**; 322: 1405-1411.

68. **Demopoulos HB, Flamm ES, Pietronigro DD et al.** The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiol Scand*, **1980**; 492: 91-119.

69. **Braughler JM, Hall ED.** Effects of multidose methylprednisolone sodium succinate administration to an injured cat spinal cord neurofilament degradation and energy metabolism. *J Neurosurg*, **1984**; 61: 290-295.

70. **Bracken MB, Holford TR.** Effects of timing of methylprednisolone or naloxone administration on recovery of segmental and long-tract neurological function in NASCIS 2. *J Neurosurg*, **1993**; 79:500–507.

71. **Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, et al.** Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the third national acute spinal cord injury randomized controlled trial. National acute spinal cord injury study. *JAMA,* **1997**; 277: 1597-1604.

72. **Suberviola B, Gonza´lez-Castro A, Llorca J et al.** Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients. *Injury, Int J Care Injured,* **2008**; 39:748-752.

73. **Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, et al.** Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute-cervical spinal cord injury. *Spine,* **2001**; 26: 426-30.

74. **Rabchevsky AG, Fugaccia I, Sullivan PG, et al.** Efficacy of methylprednisolone therapy for the injured rat spinal cord. *J Neurosci Res,* **2002**; **68**: 7-18.

75. **Sayer FT, Kronvall E, Nilsson OG.** Methylprednisolone treatment in acute spinal cord injury: the myth challenged through a structured analysis of published literature. *Spine J,* **2006**; 6: 335-343.

76. **Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P et al.** Effects of methylprednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem,* **1987**; 49: 24-31.

77. **Hall ED, Springer JE.** Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *Neurorx,* **2004**; 1: 80-100.

78. **Garcia A, Steiner B, Kronenberg G et al.** Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell,* **2004**; 3: 363-371.

79. **Yan P, Xu J, Li Q et al.** Glucocorticoid receptor expression in the spinal cord after traumatic injury in adult rats. *J Neurosci,* **1999**; 19: 9355–9363.

80. **Gould E, Cameron HA, Daniels DC et al.** Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci,* **1992**; 12: 3642-3650.

81. **Alonso G.** Prolonged corticosterone treatment of adult rats inhibits the proliferation of oligodendrocyte progenitors present throughout white and gray matter regions of the brain. *Glia,* **2000**; 31: 219-231.

82. **Hurlbert RJ.** Strategies of medical intervention in the management of acute spinal cord injury. *Spine,* **2006**; 31: 16-21.

83. **Eck JC, Nachtigall D, Humphreys SC et al.** Questionnaire survey of spine surgeons on the use of methylprednisolone for acute spinal cord injury. *Spine,* **2006**; 31: 250-253.

84. **Pereira JE, Costa LM, Cabrita AM et al.** Methylprednisolone fails to improve functional and histological outcome followingspinal cord injury in rats. *Experimental Neurology*, **2009**; 220:71-81.

85. **Hall E D.** The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg,* **1992**; 76: 13-22.

86. **Salzman SK, Faden AI.** *The Neurobiology of Central Nervous System Trauma.* New York: Oxford Univ. Press, **1994.**

87. **Espersen GT, Ernst E, Vestergoard M, Pedersen JO, Grunnet N.** Changes in PMN leukocyte migration activity and complement C3d levels in RA patients with high disease activity during steroid treatment. *Scand J Rheumatol,* **1989**; 18: 51-56.

88. **Schleimer RP, Freeland HS, Peters SP, Brown KE, Derse CP.** An assessment of the effects of glucocorticoids on degranulation, chemotaxis, binding to vascular endothelium and formation of leukotriene B4 by purified human neutrophils. *J Pharmacol. Exp. Ther,* **1989**; 250: 598-605.

89. **Becker J, Grasso RJ.** Suppression of phagocytosis by dexamethasone in macrophage cultures: inability of arachidonic asid, indomethacin and nordihydroguaiaretic acid tor everse the inhibitory response mediated by a steroid-inducible factor. *Int J Immunopharmacol,* **1985**; 7: 839-847.

90. **Williams KI, Higgs GA.** Eicosanoids and inflammation. *J Pathol,* **1988**; 156: 101-110.

91. **Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY.** Methylprednisolone inhibition of TNF-α expression and NF-Kb activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res,* **1998**; 59: 135-142.

92. **Hall ED, Wolf DL, Braughler JM.** Effects of a single large dose of methylprednisolone sodium succinate on experimental posttraumatic spinal cord ischemia. Dose-response and time-action analysis. *J Neurosurg,* **1984**; 61: 124-130.

93. **Nash HH, Borke RC, Anders JJ.** Ensheating cells and methylprednisolone promote axonal regeneration and functional recovery in the lesioned adult rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience,* **2002**; 22 (16): 7111-7120.

94. **Oudega M, Vargas CG, Weber AB, Kleitman N, Bunge MB.** Long term effects of methylprednisolone following transection of adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience,* **1999**; 11: 2453-2464.

95. **Skaper SD, Leon A.** Monosialogangliosides, neuroprotection, and neuronal repair processes. *J Neurotrauma,* **1992**; 9 (2): 507-16.

96. **Ferrari G, Greene LA.** Promotion of neuronal survival by GM1 ganglioside. Phenomenology and mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci,* **1998**; 845: 263-73.

97. **Haghigi SS, Chehrazi B.** Effect of naloxone in experimental acute spinal cord injury *Neurosurgery,* **1987**; 20 (3): 385-8.

98. **Wallace MC, Tator CH.** Failure of blood transfusion or naloxone to improve clinical recovery after experimental spinal cord injury. *Neurosurgery,* **1986**; 19 (4): 489-94.

99. **Fehlings MG, Tator CH., Linden RD.** The effect of nimoclipine and dextran on axonal function and blood flow following experimental spinal cord injury. *J Neurosurg,* **1989**; 71 (3): 403-16.

100. **Guha A, Tator CH., Piper I.** Effect of a calcium channel blocker on posttraumatic spinal cord blood flow. *J Neurosurg,* **1987**; 66 (3): 423-30.

101. **Rosenberg LJ, Teng YD, Wrathall JR.** Effects of the sodium channel blocker tetrodotoxine on acute white matter pathology after experimental contusive spinal cord injury. *J Neurosci,* 1999; 19 (14): 6122-33.

102. **Teng YD, Wrathall JR.** Local blockade of sodium channels by tetrodotoxine ameliorates tissue loss and long-term functional deficits resulting from experimental spinal cord injury. *J Neurosci,* **1997**; 17 (11): 4359-66.

103. **Schwartz G, Fehlings MG.** Evaluation of the neuroprotective effects of sodium channel blockers after spinal cord injury: improved behavioral and neuroanatomical recovery with riluzole. *J Neurosurg,* **2001**; 94 (2): 245-56.

104. **Hall ED, Wolf DL.** A pharmacological analysis of the pathophysiological mechanisms of posttraumatic spinal cord ischemia. *J Neurosurg,* **1986**; 64 (6): 951-61.

105. **Resnick DK, Graham SH, Dixon CE, Marion DW.** Role of cyclooxygenase 2 in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma,* **1998**; 15 (12): 1005-13.

106. **Hains BC, Yucra JA, Hulsebosch CE.** Reduction of pathological and behavioral deficits following spinal cord contusion injury with the selective cyclooxigenase-2 inhibitor NS-398. *J Neurotrauma,* **2001**; 18 (4): 409-23.

107. **Bain JR.** Peripheral nerve and neuromuscular allotransplantation: current status. *Microsurgery,* **2000**; 20 (8): 384-8.

108. **Gold BG.** FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. *Mol Neurobiol,* **1997**; 15 (3): 285-306.

109. **Scheff SW, Sullivan PG.** Cyclosporin A significantly ameliorates cortical damage following experimental traumatic brain injury in rodents. *J Neurotrauma,* **1999**; 16 (9): 783-92.

110. **Diaz RA, Rios C, Duarte I, et al.** Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: cyclosporin-A vs methylprednisolone. *Neuroreport, **2000***; 11 (8): 1765-7.

111. **Wang MS, Gold BG.** FK506 increases the regeneration of spinal cord axons in a predegenerated peripheral nerve autograft. *J Spinal Cord Med,* **1999**; 22 (4): 287-96.

112. **Madsen JR, MacDonald P, Irwin N, et al.** Tacrolimus (FK506) increases neuronal expression of GAP-43 and improves functional recovery after spinal cord injury in rats. *Exp. Neurol,* **1998**; 154 (2): 673-83.

113. **Siren AL, Fratelli M, Brines M, et al.** Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc. Natl. Acad Sci,* **2001**; 98 (7): 4044-9.

114. **Genc S, Kuralay F, Genc K, et al.** Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett,* **2001**; 298 (2): 139-141.

115. **Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, et al.** Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci*, **2002**; 99(4): 2258-63.

116. **Jones LL, Sajed SR, Tuszynski MH.** Differential axonal interactions with NG2: Enhanced penetration with neurotrophins. *Society for Neuroscience Abstracts*, **2000**; 30: 1354.

117. **Oudega M, Hagg T.** Nerve growth factor promotes regeneration of sensory axons into adult rat spinal cord. *Experimental Neurology*, **1996**; 140: 218-229.

118. **Tuszynski MH, Gabriel K, Gage FH, Suhr S, Meyer S.** Nerve growth factor delivery by gene transfer induces differential outgrowth of sensory, motor and noradrenergic neurites after adult spinal cord injury. *Experimental Neurology*, **1996**; 137: 157-173.

119. **Oudega M, Hagg T.** Neurotrophins promote regeneration of sensory axons in the adult rat spinal cord. *Brain Research,* **1999**; 818: 431-438.

120. **Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT.** Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. *Experimental Neurology,* **1998**; 154: 170-184.

121. **Liu Y, Kim D, Himes B, et al.** Transplants of fibroblasts genetically modified to Express BDNF promote regeneration of adult rat rubrospinal axons and recovery of forelimb function. *Journal of Neuroscience,* **1999**; 19: 4370-4387.

122. **Ramer MS, Priestley JV, McMahon SB.** Functional regeneration of sensory axons into the adult spinal cord. *Nature,* **2000**; 403: 312-316.

123. **Blesch A, Diergardt N, Tuszynski MH.** Cellularly delivered GDNF has robust chemotropic effects in the non-injured and injured adult rat spinal cord. *28th Annual Meeting of the American Society for Neuroscience,* Los Angeles, USA, **1998.**

124. **Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, et al.** Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development after adult spinal cord lesion. *Nature,* **1994**; 367: 170-173.

125. **Grill R, Murai K, Blesch A. Gage FH, et al.** Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience,* **1997**; 17: 5560-72.

126. **Morrissey TK, Kleitman N, Bunge RP.** Isolation and functional characterization of Schwann cells derived from adult peripheral nerve. *Journal of Neuroscience,* **1991**; 11: 2433-2442.

127. **Xu XM, Chen A, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB.** Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *Journal of Neurocytology*, **1997**; 26: 1-16.

128. **Chen A, Xu XM, Kleitman N, Bunge MB.** Methylprednisolone administration improves axonal regeneration into Schwann cell grafts in transected adult rat thoracic spinal cord. *Experimental Neurology,* **1996**; 138: 261-276.

129. **Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB.** Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. *J. Comp. Neurol,* **1995**; 351: 145-160.

130. **Evans MJ, Kaufman MH.** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature,* **1981**; 292: (5819): 154-156.

131. **Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, et al.** In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol,* **2001**; 19 (12): 1129-1133.

132. **McDonald JW.** Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med.,* **1999**; 5 (12): 1410-1412.

133. **Keirstead H S., et al.** Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.,* **2005**; 25 (19): 4694-4705.

134. **Sharp J. Frame J, Siegenthaler M, et al.** Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells,* **2010**; 28 (1): 152-163.

135. **Mothe AJ, Tator CH.** Advances in stem cell therapy for spinal cord injury. *The Journal of Clinical Investigation,* **2012**; 122 (11): 3824-3834.

136. **Kulbaltski I, Mothe AJ, Keating A, et al.** Oligodendrocytes and radial glia derived from adult rat spinal cord progenitors: morphological and immunocytochemical characterization. *J Histochem Cytochem,* **2007**; 55 (3): 209-222.

137. **Parr AM, et al.** Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury. *Neuroscience,* **2008**; 155 (3): 760-770.

138. **Karimi AS, Eftekharpour E, Fehlings MG, et al.** Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *J Neurosci,* **2010**; 30 (5): 1657-1676.

139. **Abematsu M, et al.** Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest,* **2010**; 120 (9): 3255-3266.

140. **Himes BT, et al.** Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into injured spinal cord. *Neurorehabil Neural Repair,* **2006**; 20 (2): 278-296.

141. **Wong RSY.** Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol,* **2011** (2011); 459-510.

142. **Chen J, Bernreuther C, Dihne M, et al.** Cell adhesion molecule L1-transfected embryonic stem cells with enhanced survival support regrowth of corticospinal tract axons in mice after spinal cord injury. *J Neurotrauma,* **2005**; 22: 896-906.

143. **Popovich PG, Wei P, Stokes BT.** Cellular inflammatory response after spinal cord injury in Sprague-Dawley and Lewis rats. *J Comp Neurol,* **1997**; 377: 443-64.

144. **Dusart I, Schwab ME.** Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *J Neurosci,* **1994**; 6: 712-24.

145. **Bartholdi D, Schwab ME.** Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. Eur *J Neurosci*, **1997**; 9: 1422-38.

146. **Klusman I, Schwab ME.** Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res,* **1997**; 762: 173-84.

147. **Tonai T, Taketani Y, Ueda N, et al.** Possible involvement of interleukin-1 in cyclooxygenase-2 induction after spinal cord injury in rats. *J Neurochem,* 1999; 72:302-9.

148. **Dubois RN, Abramson SB, Crofford L et al**. Cyclooxygenase in biology and disease. *Faseb J,* **1998**; 12: 1063-73.

149. **Vanegas H, Schaible HG.** Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol,* **2001**; 64: 327-63.

150. **Bethea JR.** Spinal cord injury-induced inflammation: a dual-edged sword. *Prog Brain Res,* **2000**; 128: 33-42.

151. **Osuka K, Watanabe Y, Teruhide Takagi T et al.** Activation of endothelial nitric oxide synthase following spinal cord injury in mice. *Neuroscience Letters,* **2008**; 436: 265-268.

152. **Bao F, Liu D.** Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience,* **2002**; 115: 839-849.

153. **Liu NK, Zhang YP, Titsworth WL, et al.** A novel role of phospolipase A2 in mediating spinal cord secondary injury. *Ann Neurol,* **2006**; 59: 606-619.

154. **Beril GH, Solaroğlu I, Okutan O, et al.** Metoprolol treatment decreases tissue myeloperoxidase activity after spinal cord injury in rats. *J Clin Neurosci,* **2007**; 14: 138-142.

155. **Cai Z, Pang Y, Lin S, Rhodes PG.** Differential roles of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in lipopolysaccharide-induced brain injury in the neonatal rat. *Brain Res,* **2003**; 975: 37-47.

156. **Genovese T, Mazzon E, Crisefulli C, et al.** Immunomodulatory effects of etarnecept in an experimental model of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther,* **2006**; 316: 1006-1016.

157. **Sharma HS, Winkler T, Stalberg E, et al.** Topical application of TNF-alpha antiserum attenuates spinal cord trauma induced edema formation, microvascular permeability disturbances and cell injury in the rat. *Acta Neurochir Suppl,* **2003**; 86: 407-413.

158. **Okada S, Nakamura M, Mikami Y, et al.** Blockade of IL-6 receptor supresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res,* **2004**; 76: 265-276.

159. **Lacroix S, Chang L, Tuszynski MH.** Delivery of IL-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol*, **2002**; 454: 213-228.

160. **Carson MJ, Doose JM, Melchior B, et al.** CNS immune privilige: hiding in plain sight. *Immunol Rev*, **2006**; 213: 48-65.

161. **Wang Q, Tang XY, Yenari MA**. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol,* **2007**; 184: 53-68.

162. **Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ.** Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*, **2005**; 5: 629-640.

163. **Rothwell NJ, Luheshi G, Toulmond S.** Cytokines and their receptors in the central nervous system-physiology, pharmacology and pathology. *Pharmacology and Therapeutics*, **1996**; 69: 85-95.

164. **Yan P, Li Q, Kim GM, Xu J, Hsu CY, Xu XM.** Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma,* **2001**; 18 (5): 563-568.

165. **Zheng H, Crowley JJ, Chan JC.** Attenuation of tumor necrosis factor-induced endothelial cell cytotoxicity and neutrophil chemiluminescence. *Am. Rev. Respir. Dis,* **1999**; 142: 1073-1078.

166. **Yakovlev AG, Faden AI.** Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Mol Chem Neuropathol*, **1994**;23:179-190.

167. **Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC et al.** Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor-alpha production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, **1999**; 16:851-863.

168. **Barger SW, Horster D, Furukawa K et al.** Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca+2 accumulation. *Proc Natl Acad Sci,* **1995**; 92: 9328-32.

169. **Kim GM, Xu J, Xu J et al.** Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappaB activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci,* **2001**; 21: 6617-25.

170. **Watkins LR, Maier SF.** Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov,* **2003**; 2: 973-85.

171. **Allan SM, Rothwell NJ.** Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci,* **2001**; 2: 734-744.

172. **Pan JZ, Ni L, Sadhi A, et al.** Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine m RNA's in spinal cord following contusion. *J Neurosci Res,* **2002**; 68: 315-322.

173. **Kishimoto T, Akina S, Narazaki M, et al.** Interleukin-6 family of cytokines and gp-130. *Blood,* **1995**; 86: 1243-1254.

174. **Bethea JR, Dietrich WD.** Targeting the host inflammatory response in traumatic spinal cord injury. *Curr Opin Neurol,* **2002**; 15: 355-360.

175. **Guerro AR, Uchida K, Nakajima H, et al.** Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classical pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *Journal of Neuroinflammation,* **2012**; 9: 40.

176. **Guzman C, Calleros CH, Griego LL, Montor JM.** Interleukin-6: A cytokine with a pleitropic role in the neuroimmunoendocrine network. *The Open Neuroendocrinology Journal,* **2010**; 3: 152-160.

177. **Ali C, Nicole O, Docogne F, et al.** Ischemia-induced IL-6 as a potenial endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab,* **2000**; 20: 956-66.

178. **Guptarak J, Wanchoo S, Lee JD, et al.** Inhibition of IL-6 signaling: A novel therapeutic approach to treating spinal cord injury pain. *Pain,* **2013**; 154: 1115-1128.

179. **Mukaino M, Nakamura M, Yamada U, et al.** Anti-IL-6- receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Experimental Neurology,* **2010**; 224: 403-414.

180. **Yune TY, Lee JY, Yung GY, et al.** Minocycline alleviates death of oligodendrocytes by inhibiting pro-nerve growth factor production in microglia after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience,* **2007**; 27 (29): 7751-7761.

181. **Rivlin AS, Tator CH**. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology,* **1978**; 10 (1): 38-43.

182. **Okhawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxidase in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem,* **1979;** 95:351.

183. **Durak I, Yurtaslanlı Z, Canpolat O, Akyol O.** A methodological approach to superoxide dismutase (SOD) activity assay based on inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction. *Clin Chim Acta,* **1993;** 214: 103-104.

184. **Klusman I, Schwab ME.** Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Research,* **1997**; 762: 173–184.

185. **Lee YL, Shih K, Bao P, et al.** Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem. Int,* **2000**; 36: 417-425.

186. **Tonai T, Shiba K, Taketani Y, et al.** A neutrophil elastase inhibitor (ONO-5046) reduces neurologic damage after spinal cord injury in rats. *J. Neurochem,* **2001**; 78: 1064-1072.

187. **Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, et al.** Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J. Neurosci,* **2002**; 22: 7526-7535.

188. **Cassatella MA.** The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today,* **1995**; 16: 21-26.

189. **Fitch MT, Doller C, Combs CK, et al.** Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J. Neurosci,* **1999**; 19: 8182-8198.

190. **Tuna M, Polat S, Erman T, Ildan F, Göçer AI, Tuna N, Tamer L, Kaya M, Cetinalp E**. Effect of anti-rat interleukin-6 antibody after spinal cord injury in the rat: inducible nitric oxide synthase expression, sodium- and potassium-activated, magnesium-dependent adenosine-5'-triphosphatase and superoxide dismutase activation, and ultrastructural changes. *J Neurosurg*. **2001**; 95 (1): 64-73.

191. **Tuna M, Yilmaz DM, Erman T, Arslan A, Ozgür H, Polat S**. Effect of neutralization of rat interleukin 6 bioactivity on inducible nitric oxide synthase up-regulation and cerebral ischemic damage. *Neurol Res,* **2009**; 31 (7): 714-20.

192. **Chen X, Hu X, Zou Y, Pi B, et al.** Combined treatment with minocycline and prednisone attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice. *Journal of Neuroimmunology,* **2009**; 210: 22-29.

ÖZGEÇMİŞ

Leman Sencar, 15.05.1981 tarihinde Mersin'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Mersin'de tamamlayan Leman Sencar, 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünü kazandı ve 2003 yılında mezun oldu. 2004 yılında, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlayan Leman Sencar, 2006 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamladıktan sonra, 2007 yılında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Doktora tez dönemi sırasında, 2012 yılında bir yıl süreyle, Amerika Birleşik Devletleri Yale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nörogenetik ve Hücre Kültürü Laboratuvarlarında çalışmalarda bulunmak üzere görevlendirildi. Leman Sencar, bu süre içerisinde özellikle hücre kültürü, kök hücre, immünohistokimya, Western Blot ve Florasan mikroskobi konularında ileri eğitimler aldı. Leman Sencar, 2004 yılında başlamış olduğu akademik yaşamı boyunca alanı ile ilgili SCI kapsamında yayımlanan 7 adet makale çalışması yapmıştır. Leman Sencar, halen Tıp Fakültesi kadrosunda olmak üzere, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.