

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA
METİLPREDNİZOLON VE PROPOLİS
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Hasan Emre AYDIN

NÖROŐİRÜRĐİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEĞİ

ESKİŞEHİR

2013

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA
METİLPREDNİZOLON VE PROPOLİS
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Dr. Hasan Emre AYDIN

NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŐMANI
PROF. DR. Metin Ant ATASOY

ESKİŞEHİR

2013

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Hasan Emre AYDIN' a ait 'Deneysel omurilik yaralanmasında metilprednizolon ve propolis etkinliğinin karşılaştırılması' adlı çalışma jürimiz tarafından Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Metin Ant ATASOY

Nöroşirürji Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. T. Erhan COŞAN

Nöroşirürji Anabilim Dalı

Üye:

Prof. Dr. Ali ARSLANTAŞ

Nöroşirürji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Yönetim Kurulu'nun / / tarih ve / sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof.Dr. Bekir YAŞAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimleriyle her türlü desteği sunan, bilgi ve tecrübeleri ile öğrenimim süresince destek olan ve tezimin yürütülmesinde, her aşamasında yardımlarını esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Metin Ant Atasoy' a, deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Tefvik Erhan Coşan' a, Prof. Dr. Ramazan Durmaz' a, Prof. Dr. Ali Arslantaş' a, Doç. Dr. Murat Vural' a, Yard. Doç. Dr. Zühtü Özbek' e ve Uzm. Dr. Emre Özkara' ya, projemizin histopatolojik çalışmalarında değerli katkıları olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı hocalarından Sayın Yard. Doç. Dr. Dilek Burukoğlu' na verilerin elde edilmesi ve değerlendirilmesinde desteklerinden dolayı, çalışmamızın istatistiksel verilerinin hazırlanmasında ve değerlendirilmesinde destek olan Biyoistatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Ahmet Musmul' a desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Aydın, HE. Deneysel omurilik yaralanmasında metilprednizolon ve propolis etkinliğinin karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2013. Spinal kord travmaları artan nüfus ile birlikte son yıllarda özellikle genç toplumda ciddi sağlık problemi haline gelmiştir. Çalışmamızda spinal kord travmasını takiben uygulanan metilprednizolon ve propolisin apopotozis üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla dört deney grubu (n=10) oluşturulmuştur. İlk grup hariç tüm gruplarda, klip yöntemi kullanılarak spinal travma modeli uygulanmıştır. Tartışmalar olsa da metilprednizolon dışında etkin ve klinik kullanımda olan tedavi yöntemi olmadığından dolayı deney gruplarında propolisin aktif bileşeni olan kafeik asit fenilesterin etkilerini kıyaslamak amacıyla bir gruptaki sıçanlara metilprednizolon tedavisi uygulanmıştır. Tedavi sonrasında 48. saatte tüm sıçanlar tekrar operasyona alınmış ve histolojik inceleme için laminektomi sahasındaki spinal kord dokusu çıkarılmıştır. Histolojik değerlendirme amacıyla Hematoksilen Eozin ve TUNEL boyama yöntemleri kullanılmıştır. Hematoksilen Eozin boyama ile ışık mikroskopisi altında hücrelerde nekroz, vakuolizasyon, hemoraji ve genel hasar değerlendirilirken TUNEL yöntemi ile boyanan lamlarda ile ışık mikroskobisi altında apoptotik hücre sayımı yapılmıştır. Sonuçta; genel hasar değerlendirildiğinde propolis kullanılan grup, travma grubu ile kıyaslandığında metilprednizolona benzer olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca apoptotik hücre sayımı gruplar arasında kıyaslandığında, travma grubuna göre metilprednizolon ve propolis apopotozisi engellediği görülmektedir. Genel hasardan farklı olarak propolisin antiapoptotik etkinliği metilprednizolona kıyasla daha belirgin olduğu saptanmıştır. Bu bulgular ışığında, insan vücuduna hiçbir zararı olmayan, propolisin aktif bileşeni olan kafeik asit fenilesterin klinik kullanıma girebileceği fakat konu ile ilgili ayrıntılı, destekleyici deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Metilprednizolon, Kafeik asit fenilester, Propolis, Spinal kord hasarı, TUNEL yöntemi

ABSTRACT

Aydın, HE. A comparison of methylprednisolone and propolis in experimental spinal cord injury. Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Neurosurgery, Eskisehir, 2013.

Spinal cord injury has become a serious health problem with increased population in the last years. In our study, rats were divided into four groups (n=10) to investigate the effects of methylprednisolone and propolis in apoptosis following experimental spinal cord injury. We applied aneurysm clip compression model to all groups for spinal cord injury except the first group. Through it is not clear, we used treatment of methylprednisolone in one group for comparing the effects of caffeic acid phenethyl ester which is the biologic effective ingredient of propolis. 48 hours after spinal cord injury all rats operated again and spinal cord specimens taken for histologic examination. The sections were stained with Hematoxylin eosin and using the apoptosis kit for TUNEL. Necrosis, vacuolization, hemorrhage and general damage assessment with hematoxylin eosin and apoptotic cells count with TUNEL under the light microscope. In conclusion, methylprednisolone and propolis effective in suppression of general damage as against the trauma group. Again, in the apoptotic cell count both methylprednisolone and propolis were effective than trauma group. This study indicates that; caffeic acid phenethyl ester which is the biologic effective ingredient of propolis may be used in clinical treatment of spinal cord injury but we need some detailed and supported studies in this issue.

Keywords: Methylprednisolone, caffeic acid phenethyl ester, propolis, spinal cord injury, TUNEL

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xi
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Spinal Kord Anatomisi	2
2.1.1.Spinal Kordun Zarları.....	3
2.1.2.Spinal Kordun Kanlanması	4
2.2.Spinal Kord Travmasının Patofizyolojisi	5
2.2.1.Primer Hasar	6
2.2.2.Sekonder Hasar.....	7
2.3.Apoptozis ve Nekroz	8
2.4.Spinal Kord Travmasının Histolojisi.....	9
3.SPİNAL KORD YARALANMALARI	11
3.1.Komplet (Tam) Spinal Kord Yaralanması	11
3.2.İnkomplet (Kısmi) Spinal Kord Yaralanması	11
4.SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASTA YÖNETİMİ.....	13
5.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TANI.....	14
6.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TEDAVİ	15
6.1.Spinal Kord Travmasında Cerrahi Tedavi.....	15
6.2.Spinal Kord Travmasında Rejenerasyon ve Kök Hücre Tedavisi.....	15
6.3.Spinal Kord Travmasında Medikal Tedavi	16
6.3.1.Metilprednizolon	16
6.3.2.Naloksan	17
6.3.3.Gangliosidler	17

6.3.4.Nimodipin.....	17
6.3.5.Propolis.....	18
7.DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ.....	20
8.HİSTOLOJİK YÖNTEMLER	21
8.1.Hemotoksilen Eozin Boyama	21
8.2.TUNEL Yöntemi	21
8.3.Immünokimyasal Boyamalar	21
9.MATERYAL METHOD.....	22
9.1.Deney Grupları	22
9.2.Cerrahi İşlem ve Tedavi	23
9.3.Histopatolojik Değerlendirme	25
9.3.1.HE Boyama ve Kesitlerin Değerlendirilmesi	25
9.3.2.TUNEL yöntemi ve Apoptotik Hücre Sayımı.....	27
9.4.İstatistiksel Değerlendirme	29
10.BULGULAR	30
10.1.Histopatolojik Bulgular	30
10.2.İstatistiksel Bulgular	37
10.3.Apoptotik Hücre Sayıları.....	41
11.TARTIŞMA.....	43
12.SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASIA	American Spinal Travma Derneği
ATP	Adenozintrifosfat
ATSL	Amerikan Cerrahi koleji Travma Programı
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
CAPE	Kafeik Asit Fenilester
DMSO	Dimetil sülfoksid
FADD	Fas İle İlişkili Ölüm Faktörü
HE	Hematoksilen Eozin
IL	İnterlökin
LP	Lipid Peroksidasyonu
MP	Metilprednizolon
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
NASCIS	Ulusal Akut Spinal Kord Yaralanma Çalışmaları
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
SKT	Spinal Kord Travması
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRADD	Tümör Nekroz Faktör Reseptör Aracılı Ölüm Faktörü
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Spinal kord anatomisi (13)	2
Şekil 2: Spinal sinirler	3
Şekil 3: Spinal kord aksiyel kesit	3
Şekil 4: Spinal kord zarları	4
Şekil 5: Spinal kord arterleri (14)	5
Şekil 6: Primer ve Sekonder Hasar Mekanizması (20)	6
Şekil 7: Brown Sequart Sendromu (20)	11
Şekil 8: Santral Kord Sendromu	12
Şekil 9: L2 vertebra fraktürü (X-ray)	14
Şekil 10: Lomber fraktür MRI görüntüsü	14
Şekil 11: CAPE Biyokimyasal formül	18
Şekil 12: Anevrizma klip kullanılarak oluşturulan SKT	24
Şekil 13: Kompresyona uğramış spinal kord	24
Şekil 14: Kontrol grubu HE boyama	30
Şekil 15: Kontrol grubu HE boyama 2	31
Şekil 16: Travma grubu HE boyama	32
Şekil 17: Travma grubu HE boyama 2	32
Şekil 18: Propolis tedavisi uygulanan grupta HE boyama	33
Şekil 19: Metilprednizolon uygulanan grupta HE boyama	34
Şekil 20: Kontrol grubunda TUNEL boyama	35
Şekil 21: Travma grubunda TUNEL boyama	36
Şekil 22: Propolis tedavisi uygulanan grupta TUNEL boyama	36
Şekil 23: Metilprednizolon tedavisi uygulanan grupta TUNEL boyama	37
Şekil 24: Nekrotik hücre sayısının gruplar arası dağılımı	38
Şekil 25: Vakuolizasyonun gruplar arası dağılımı	39
Şekil 26: Hemoraji gruplar arası dağılımı	40
Şekil 27: Genel hasarın gruplar arası dağılımı	41
Şekil 28: Apoptotik hücre sayısının gruplar arası dağılımı	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Çalışma grupları ve kullanılan medikal tedavi	23
Tablo 2: Kontrol grubu değerlendirme sonuçları	26
Tablo 3: Travma grubu değerlendirme sonuçları	26
Tablo 4: Travma + propolis değerlendirme sonuçları	27
Tablo 5: Travma + Metilprednizolon değerlendirme sonuçları	27
Tablo 6: Nekroz Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) (P= <0.001)	38
Tablo 7: Vakuolizasyon Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way)	39
Tablo 8: Hemoraji Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) (P= <0.001)	40
Tablo 9: Genel Hasar Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way)(P= <0.001)	41
Tablo 10: Apoptotik hücre sayıları Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way)	42

1.GİRİŞ

Spinal kord travması (SKT) bireylerin ve travma sonucunda meydana gelen nörolojik defisit nedeniyle bireye bakmakla yükümlü ailelerin yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir durumdur (1). 15-25 yaş arası genç nüfusta daha sık görüldüğünden dolayı travma bireyde önemli oranda iş kaybı ve erken dönem tedavi ve rehabilitasyon masraflarından dolayı ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır (2,3). Diğer bir önemli problem de toplumun ve sağlık personelinin bu konuda yeterli bilgiye sahip olmamasıdır (4).

Spinal kord travmaları; motorlu taşıt kazaları (%50), düşme ve iş kazaları (%30), şiddet suçları (%11), spor yaralanmaları ve torasik aorta cerrahileri sonrası görülmektedir (5,6). E/K oranı 4/1 dir (7).

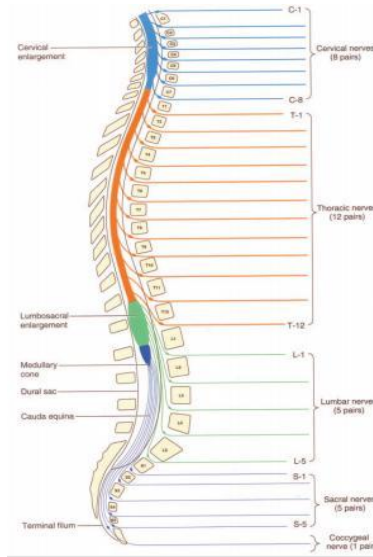
Ülkemizde yapılan anlamlı bir epidemiyolojik çalışma olmamakla birlikte yılda ortalama 1600-2000 ciddi SKT vakası bildirilmekte ve prevalansın her yıl 12,7/1.000.000 olduğu tahmin edilmektedir (8). Dünyada spinal kord travmalarının görülme sıklığı 1 milyonda 15-45 arasındadır (9). Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 11.000 kişiyi etkileyen önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan istatistiksel verilere göre 90'lı yıllarda yıllık 40/1.000.000 olan vaka sayısı 2009 yılının sonunda 87,7/1.000.000 olarak belirlenmiştir (10). Spinal kord travmalarının %64'ü torakolomber bölgede, özellikle T12-L1 vertebralar arasında görülür (11).

Yaşam kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerine rağmen SKT sonrası gelişen hasar için şu ana kadar etkili bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Medikal tedaviden kısmi fayda görülmüş fakat literatürdeki son çalışmalarda dahi SKT sonrası nörolojik fonksiyonlarda tam iyileşme sağlanamamıştır (3). Amacımız travmatik spinal kord yaralanması sonrasında, etkinliği bilinen bir ilaç olan metilprednizolonun (MP) yanında, güçlü antioksidan ve antiapoptotik etkisi olan propolisin nöroprotektif etkilerini kullanarak, sekonder hasara bağlı ortaya çıkan nörolojik defisitlerin oluşmasını engelleyecek yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini ve bu sayede hastalığa bağlı mortalite ve morbiditenin azalmasını sağlamaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Spinal Kord Anatomisi

Spinal kord (omurilik) foramen magnumdan başlar ve erişkinde lomber 1 vertebranın alt kenarı düzeyinde sonlanır (Şekil 1). Canalis vertebralisin üst 2/3 kısmında yer alır ve dura mater, arachnoidea mater ve pia mater isimli üç zar ile çevrilidir. Spinal kordı çevreleyen spatium subarachnoideumda bulunan beyin omurilik sıvısı (BOS) besleyicidir ve spinal kordı koruma görevi yapar (12).



Şekil 1: Spinal kord anatomisi (13)

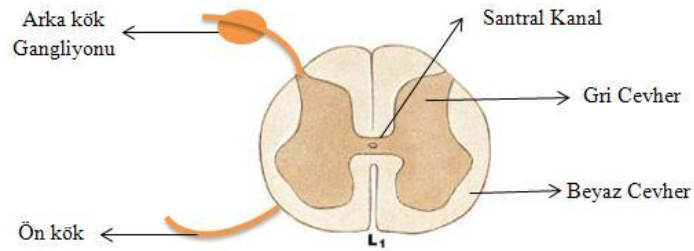
Spinal kord servikal ve lomber bölgelerde iki adet genişleme gösterir. Bu genişlemeler intumescencia cervicalis ve intumescencia lumbosakralis olarak adlandırılır. Alt seviyelerde spinal kord gittikçe incelerek conus medullaris oluşturur. Conus medullaris' in tepesinden pia materin bir uzantısı aşağıya inerek coccyxin arka yüzüne yapışır ve filum terminale olarak adlandırılır.

Spinal kordda tüm uzunluğu boyunca radix anterior (motor) ve posterior (duysal) tarafından oluşturulan 31 adet spinal sinir tutunur (Şekil 2).



Şekil 2: Spinal sinirler

Spinal kord gri maddeden yapıli substantia grisea olarak adlandırılan bir iç kısım ile ve bunu çevreleyen substansia alba olarak adlandırılan dış tabakadan oluşmuştur. Substansia grisea sinir hücreleri ve uzantıları, nöroglia ve kan damarlarından oluşurken substansia alba ilaveten miyelinli sinir liflerinin daha fazla olması nedeniyle beyaz olarak görülür (11,12) (Şekil 3).



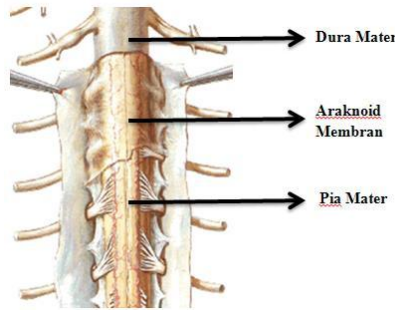
Şekil 3: Spinal kord aksiyel kesit

2.1.1. Spinal Kordun Zarları

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

Arachnoidea mater, spinal kordu saran ince ve geçirgen olmayan bir zarıdır. Pia materden BOS ile dolu bir boşluk olan spatium subarachnoideum ile ayrılır. Dura mater gibi filum terminale seviyesinde sonlanır.

Pia mater, spinal kordu sıkıca saran vasküler bir zarıdır. Bilateral sinir kökleri arasında kalınlaşarak ligamentum denticulatumu oluşturur. Bu bağ laterale doğru uzanarak arachnoid ve duraya yapışır ve omuriliğin dural kılıfın ortasında asılı kalmasını sağlar (11,12) (Şekil 4).



Şekil 4: Spinal kord zarları

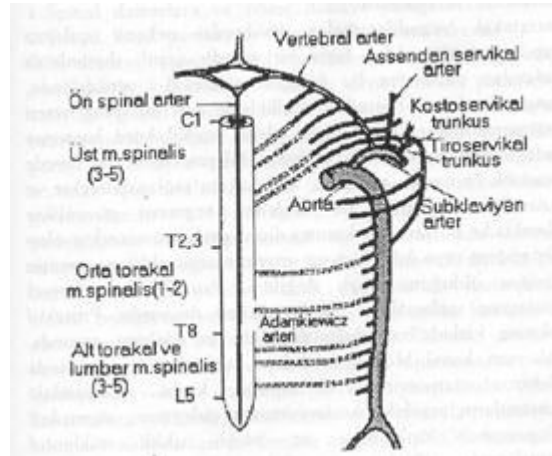
2.1.2. Spinal Kordun Kanlanması

Spinal kord arteriyel kanını arteria spinalis anterior ve iki arteria spinalis posterior olmak üzere üç ince arterden alır. Posterior spinal arterler arteria vertebralislerden direkt olarak veya arteria inferior posterior cerebellilerden indirekt olarak çıkarak spinal kordun arka 1/3 kısmını beslerler. Anterior spinal arter kafatası içinde her iki taraftaki arteria vertebralislerden çıkan arterlerin birleşmesi ile oluşur ve spinal kordun ön 2/3 kısmını besler. Longitudinal olarak uzanan anterior ve posterior spinal arterler her bir intervertebral delikte küçük segmental arterlerle desteklenirler.

Bir diğer önemli besleyici arter olan arteria radicularis anterior magna (Adamkiewicz arteri) aortadan alt torasik veya üst lomber düzeylerden tek taraflı olarak çıkar ve çoğunlukla spinal korda sol taraftan girer. Spinal kordun T8 ve konus medullaris arasında kalan alt 2/3 kısmını besleyen ana kan kaynağıdır. Orta torakal bölge 'watershed zone' olarak adlandırılır ve beslenmesi nispeten azdır. Tek

besleyicisi T4 ve T5 seviyesindeki radiküler arterler olduğundan dolayı bu bölge vasküler hasara daha yatkındır (11).

Spinal kordun venleri ise serebral venlere ve dural venöz sinüslere açılan 6 adet kıvrımlı longitudinal kanala drene olurlar (12) (Şekil 5).



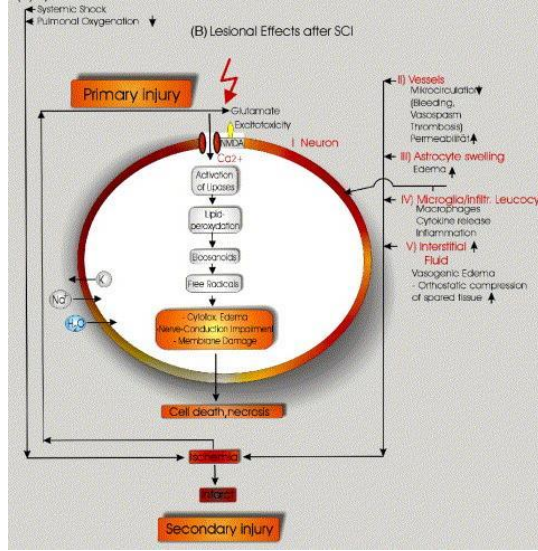
Şekil 5: Spinal kord arterleri (14)

2.2.Spinal Kord Travmasının Patofizyolojisi

Spinal kord travması sonrası uzun yolaklarda ilerleyici ve geri dönüşsüz harabiyete bağlı olarak nörolojik defisit geliştiğinin düşünüldüğü ilk çalışmalardan sonra 1950 yılında spinal korddaki kan akımını azalmasına bağlı olarak hasarın oluştuğu bulunmuştur ve günümüzde de travma sonrası doku yıkımının iskemiye bağlı olduğu düşünülmektedir (15). Yıllardır nörolojik bilimsel araştırmaların en önemli konularından biri olan spinal kordda meydana gelen hasarın fizyopatolojik olarak gelişim sürecini ve mekanizmasını anlamak tedavi çözümü için önemli fayda sağlar (2).

Spinal kord hasarının patofizyolojisi en iyi ‘bifazik yaralanma’ olarak tanımlanmıştır (9). Bifazik yaralanma primer (direkt) ve sekonder (indirekt) olmak üzere iki mekanizma ile ortaya çıkmaktadır (16,17). Akut spinal kord yaralanması sonrası gelişen nörolojik hasar, birincil mekanik yaralanma ile birlikte yaralanma sonrasında gelişen ikincil yaralanmayı izleyen nekroz ve daha geç görülmeye

başlayan apoptoze bağlıdır (18). Primer hasar mekanik etki ile ortaya çıkarken, sekonder hasar bir dizi biyokimyasal ve hüresel reaksiyonların primer hasar üzerine eklenmesiyle ortaya çıkar (3,19) (Resim 6).



Şekil 6: Primer ve Sekonder Hasar Mekanizması (20)

2.2.1. Primer Hasar

İlk yaralanma sonrasında kompresyon, kemik, intervertebral disk ve yabancı cisimlerin spinal kordda oluşturdukları geri dönüşsüz, mekanik hasar primer hasar olarak bilinmektedir. Yaralanma akson, kan damarları ve hücre membranlarının hasarına neden olan primer mekanik etki ile başlar. SKT sonrası ilk 2 saat içerisinde aksonlarda travmatik yaralanma, gri cevher hemorajisi, hemorajik nekroz, mikroglial aktivasyon gibi histopatolojik bulgular görülür ve biyokimyasal olarak IL-1 β , TNF α , IL-6 gibi akut faz reaktanlarının salınımı gerçekleşir (9).

Travma sonrası mekanik etki ile oluşan bu primer hasar genellikle fleksiyon, ekstansiyon, rotasyon, distraksiyon ve aksiyel yüklenme sonucu meydana gelir (9). Bu hasarı takiben spinal kordda gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri sekonder hasar olarak adlandırılır ve spinal kordun daha fazla zarar görmesine dolayısıyla travma sonrası hücre ölümünün devam etmesine neden olmaktadır (21,22,23). Primer hasarın medikal veya cerrahi tedavisi olmadığından dolayı yapılan tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yöneliktir.

Primer yaralanmanın derecesi, yaralanmaya neden olan gücün genliğine, etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına göre değişir (24). Spinal kordun uzun süre bası altında kalması, nörolojik hasarın artmasına ve prognozunun daha kötü olmasına neden olur.

2.2.2.Sekonder Hasar

İlk olarak 1911 yılında ALLEN tarafından tanımlanan sekonder hasar karışık ve çok yönlü mekanizmaya sahip olmasından dolayı yapılan deneysel çalışmaların başarısı sınırlıdır ve genellikle prelinik bir çalışmanın ötesine geçememişlerdir (3,25).

Primer hasar sonrası 2 haftadan 6 aya kadar geçen süreçte görülen sekonder hasarda histopatolojik olarak; subakut dönemde makrofaj infiltrasyonu, astroglial skar başlangıcı ve kan beyin bariyeri (KBB) tamiri ile birlikte ödemin çözülmesi, kronik süreçte ise uzamış Wallerian dejenerasyon ve plastisite gerçekleşir (9,26).

Sekonder hasarda; doku ödemi ve hasarlı bölgeye lökosit girişinin artması ile oluşan inflamasyonun kısır bir döngü oluşturduğu ayrıca iskemiye bağlı olarak ortaya çıkan serbest radikallerin etkisiyle uyarılan lipid peroksidasyonu sonrası hasarın daha da şiddetlendiği bilinmektedir (27,28).

Literatürde sekonder hasarın, aşırı glutamat ve aspartat salınımı, hücre içi fazla kalsiyum (Ca^{++}) birikimi, serbest oksijen radikali oluşumu, nekroz veya apoptozise bağlı hücre kaybı, araşidonik asit mekanizmasının aktivasyonu ile oluştuğu gösterilmektedir (29).

Birçok farmakolojik ajan (metilprednizolon, trilazad mesilat, gangliozidler, naloksan ve nimodipin) geniş, prospektif, randomize, kontrollü klinik çalışmalarda denenmiş ve laboratuvarında gösterdikleri başarının aksine klinik fayda gösterememiştir. Uygulanan güncel nöroprotektif tedaviler sayesinde sekonder hasarın oluşum mekanizmalarını engellemek şu an için sadece deneysel olarak mümkün görünmektedir (16,29,30,31).

Sekonder hasar gelişiminde önemli rol oynayan glutamat, santral sinir sisteminde bulunan en yaygın eksitatuar nörotransmitterdir. SKT sonrasında dakikalar

içerisinde ortama salınarak hücre içi depolardan yoğun Ca^{++} salınımına neden olmaktadır. Ca^{++} artışında fosfolipaz A2 ve lipooksijenaz gibi litik enzimlerin salınmasına neden olmakta ve serbest radikal oluşumunu tetiklemektedir (9,26).

Son yıllara kadar spinal kord travmasındaki doku hasarının nedeninin nekroz olduğu bilinirken, son yayınlar SKT sonrası apoptotik hücre ölümünün de önemli bir sorumlu mekanizma olduğunu göstermektedir. Nekroza farklı olarak apoptoz programlanmış hücre ölümüdür ve enzimatik reaksiyonlarla parçalanan hücreler herhangi bir inflamatuvar yanıt oluşmadan fagositler tarafından ortadan kaldırılır. Apoptozisi inhibe ederek SKT sonrası ortaya çıkacak olan sekonder hasarı önlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmıştır (32).

Spinal kord travması sonrası spinal kord iskemisinin derecesi travmanın şiddetiyle doğru orantılı, nörolojik fonksiyonların düzelme süresi ise travmanın şiddetiyle ters orantılıdır (17).

SKT sonrası ortama salınan süperoksit, hidrojen peroksit ve peroksinitrit gibi serbest radikaller, hücre duvarındaki yağ asitlerinin oksidasyonla hasarlanmasına ve böylelikle hücrede metabolik yıkıma neden olmaktadır (9,26).

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda sekonder hasarı önlemek için çok sayıda farmakolojik ajan kullanılmış fakat sadece spinal kord travması sonrası ilk 8 saat içerisinde uygulanan metilprednizolonun klinikte en yararlı tedavi seçeneği olduğu gösterilmiştir (1).

2.3.Apoptozis ve Nekroz

Spinal kord hasarı sonrası iskekiye bağlı olarak otofaji, apoptozis ve nekroz gibi hücre ölümlerinin tüm formları görülür (33). Spinal kordda nöron ölümünün apoptozis ve nekroz olmak üzere iki farklı tipi vardır. Apoptozis programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır ve istenmeyen zararlı hücrelerin ortamdaki kaldırılmasında rol oynadığı bildirilmiştir (34).

Sekonder hasarın gelişimindeki ana mekanizma olan apoptozis, SKT sonrası önemli araştırma alanları arasındadır (35). Spinal kordda apoptozis hem nöronları hemde glial hücreleri etkilemektedir. Travma sonrası ortama salınan glutamat, Ca^{++}

iyonları, serbest radikaller ve bazı sitokinler apoptozisin oluşumundan sorumludur (34).

Nekroz, hücrede şişme, mitokondride genişleme ve plazma membranında yırtılma ile karakterizedir. Apoptozis sırasında ise hücre membranı yırtılmaz. Hücre içi adenozin trifosfat (ATP) seviyesi apoptozis için gereklidir ve dolayısıyla ATP düzeyleri hücrenin hangi yolla öleceğini belirler. Apoptozis hücre intihar şeklidir ve hücre kendi kendini aktif olarak yok eder (9,34).

Morfolojik olarak apoptozisin nekroza göre ciddi farkları vardır. Bunlar nükleusta kromatin kümeleşmesi, çekirdekte büzülme ve DNA fragmentasyonudur. Apoptoziste membran ve organel yapıları korunur. Histolojik tanıda DNA fragmentasyonu önemli bir parametredir ve göstermek amacıyla TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling) boyaması kullanılır (34).

Apoptozis, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasını ve sinir sisteminin sürekliliğini sağlamada, inflamasyonu başlatmadan hücreyi ortadan kaldırdığından dolayı önemli rol oynar (4,34).

2.4.Spinal Kord Travmasının Histolojisi

Spinal kord travması sonrası ilk 2 saatte histolojik değişiklikler açıkça görülmeyebilir ancak hasarı devam ettirecek olan patofizyolojik olaylar başlamıştır (9). Mekanik hasar, yumuşak yapısı ve vasküler yapıda olmasından dolayı santral gri maddeye daha fazla zarar verir. Özellikle periferde beyaz cevher korunabilir. Spinal kordda kan akımının bozulması ile iskemi ve lokal enfarkt ortaya çıkar (36).

Akut fazda ilk histolojik görüntü; ödem, belirgin aksonal şişme ile birlikte yolakların bozulması, kanama ve iskemik alanlardan oluşur. Travma alanındaki hemoraji ve ödem nedeniyle sinir iletimi bozulmuştur Santral kanama alanları nöral disfonksiyonun ve oluşacak olan patolojinin temel unsuru olarak kabul edilir (9). SKT dan 48 saat sonra monositler ve mikroglia lezyon bölgesinde çoğalmaya başlamıştır. Santral kanal kenarındaki ependimal hücreler hipertroftiktir. SKT sonrası 72. saatte sahada vaskülerizasyon başlar (36).

Travma sonrası 14. günde ortamdaki ölü hücrelerin temizlenmesi için makrofajlar alana göç eder. Travma seviyesinde gri cevher nekrotiktir ve spesifik olarak kavitasyon gösterir. İlerleyen zamanda fibroblast ve fibrinojen infiltrasyonu görülür (36).

3.SPİNAL KORD YARALANMALARI

Spinal kord travmasına bağlı oluşan lezyonun alt seviyesinde hiçbir duyu veya motor fonksiyonu yoksa komplet kesi, azda olsa duyu veya motor fonksiyon varsa inkomplet kesi olarak tanımlanır.

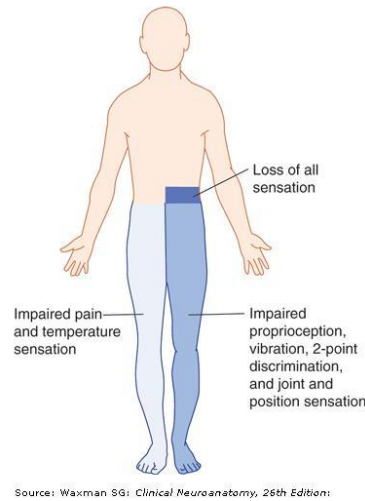
3.1.Komplet (Tam) Spinal Kord Yaralanması

Spinal kord travmasının 3 veya daha fazla segment üstünde hiçbir duyu veya motor fonksiyonun korunmaması komplet yaralanma olarak tanımlanır. Nörolojik bulguların 24 saatten daha fazla devam etmesi, hiçbir distal fonksiyonun geri dönmeyeceğini gösterir (11).

3.2.İnkomplet (Kısmi) Spinal Kord Yaralanması

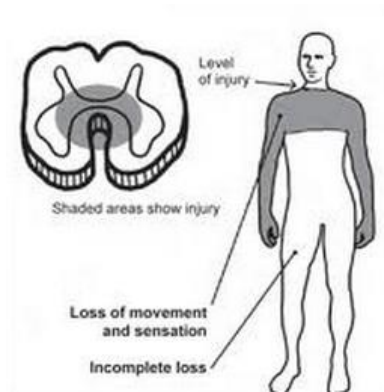
İnkomplet kord lezyonu klinikte Brown Sequart, Santral kord, Anterior kord ve posterior kord sendromu olmak üzere üç şekilde karşımıza çıkar (4,11).

Brown-Sequart sendromu; spinal kordun yarı kesisi sendromudur ve hemilateral lezyonları sonucunda oluşur. Genellikle penetran bir travma sonucu karşımıza çıkar. Lezyon seviyesinin altında, karşı tarafta ağrı ısı kaybı ve değişken derecelerde idrar ve gaita inkontinansı oluşur. Ayrıca aynı tarafta derin duyu ve propriyepsiyon, vibrasyon ve iki nokta diskriminasyon hissi kaybı ile birlikte motor paralizi görülür (Şekil 7).



Şekil 7: Brown Sequart Sendromu (20)

Santral kord sendromu; spinal kordun orta kısmında yani santral kanal ve etrafındaki lezyonlarda görülmektedir. Genellikle mevcut spinal darlığı olan hastalarda akut hiperekstansiyon yaralanmalarını takiben görülür. İnkomplet spinal kord yaralanmalarının en sık görülen şeklidir. Lezyon seviyesinin altında üst ekstremitelerde daha belirgin olmak üzere tüm ekstremitelerde motor defisit görülür. Üst ekstremitelerde ağrı ısı duyularının kaybolduğu dissosiyatif duysal kayıp görülür. Sfinkter disfonksiyonu ve vakaların %7 sinde Lhermitte bulgusu görülür. İyileşme süreci distalden proksimale doğru olur, ilk önce alt ekstremiteler daha sonra mesane disfonksiyonu düzelir. Hastaların %90' ı ilk beş gün içinde yardımla yürüyebilir (4,11) (Şekil 8).



Şekil 8: Santral Kord Sendromu

Anterior kord sendromu; anterior spinal arterin beslediği kordun ön kısmındaki lezyonlara bağlı bu bölgede gelişen spinal kord enfarktıdır. Klinikte parapleji veya C7 seviyesi üzerinde ise quadripleji ve bilateral ağrı ısı kaybı ile karşımıza çıkar. İnkomplet spinal kord yaralanmaları içerisinde en kötü prognoza sahip olanıdır. Hastaların ancak %10-20' sinde fonksiyonel motor kontrolde iyileşme olur (4,11).

4.SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASTA YÖNETİMİ

Spinal kord travmalarında ölümün en önemli nedeni aspirasyon ve şoktur (nörojenik ve hipovolemik) . ATSL (Amerikan cerrahi koleji travma programı; ileri yaşam desteği) protokolüne göre travma sonrası ilk muayenede öncelikle hastanın hava yolunun açık olup olmadığı değerlendirilir. Solunum, dolaşım ve kanama kontrolünü takiben nörolojik durum değerlendirilmelidir (11).

Nörojenik şok; SKT sonrası motor, duyu ve sempatik otonom fonksiyonun spinal kord yaralanmasına bağlı olmaksızın geri dönüşümlü (inkomplet) veya tam kaybıyla karakterize bir klinik durumdur. Hastada klinik olarak hipotansiyon, bradikardi ve sıcak ekstremiteler vardır. Hipotansiyon genellikle T6 düzeyi üzerindeki lezyonlarda, özellikle servikal lezyonlarda en belirgidir (9). Genellikle 2 hafta kadar sürer ve kendiliğinden iyileşir. Tüm reflekslerin kaybı söz konusudur fakat spinal komplet kesinin ilk zamanlarında plejik ekstremitede küçük bir uyarıyla fleksiyon hareketi oluşabilmektedir. Spinal kordun otomatizmasına bağlı görülen bu kısa süreli refleksi mass refleksi adı verilir (4).

Hipovolemik şok; hipotansiyon, taşikardi ve hipotermi kliniği ile karşımıza çıkar. Bulgular kan kaybı ve sıvı açığına bağlı gelişir. Temel yaşamsal parametrelerdeki olumsuzluklar spinal kordda oluşacak sekonder hasarı arttırabilir. Hastanın sistolik kan basıncı 90 mmHg, nabızı 45 atım/dakikanın üzerinde olmalıdır. Hipotansiyonu olan hastada, tedavilerinin farklı olmasından dolayı nörojenik şok ve hipovolemik şok ayrımı iyi yapılmalıdır. Nörojenik şokta hipotansiyon otonomik disfonksiyona bağlı gelişir ve sıvı açığı yoktur, hipotansiyonu düzeltmek amacıyla sıvı replasmanı yapılırsa hastada akciğer ödemi gelişebilir (9).

Klinikte nörolojik muayene bulguları için uluslar arası kabul gören ASIA (Amerika spinal travma derneği) ve Frankel nörolojik performans skalaları kullanılmaktadır.

5.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TANI

Spinal kord travması veya şüphesi olan olguların tanı ve seviyesinin tespiti için radyolojik incelemeler yapılmalıdır. İlk aşama direkt grafilerdir. Özellikle bilinci kapalı her hastanın tüm spinal aksı taranmalıdır (Şekil 9). Direkt grafilerde patoloji saptanan veya şüphelenilen bölgeleri detaylı olarak taramak amacıyla bilgisayarlı tomografi (BT) çalışılmalıdır. Vertebra fraktürü gibi kemik patolojileri en iyi BT ile gösterilir (9).



Şekil 9: L2 vertebra fraktürü (X-ray)

Ciddi SKT olan hastalarda ligament hasarı, disk hernisi, hematoma ve nöronal hasarlanma gibi yumuşak doku patolojilerini görmek amacıyla manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çalışılmalıdır (9,11) (Şekil 10).



Şekil 10: Lomber fraktür MRI görüntüsü

6.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TEDAVİ

Spinal kord travması sonrası tedavinin esas amacı oluşacak sekonder hasarı engellemektir. Hem cerrahi hem de medikal tedavi ile travmatize olmuş spinal kordu koruyucu nöroprotektif ajanların kullanılması bilinen tedavi yöntemleridir. SKT sonrası ilaçlar, tek veya etkilerini potansiyelize edip etmediklerini saptamak amacıyla kombine şekilde deneysel çalışmalarda kullanılmıştır (19). Güncel tedavi yaklaşımı ise travmatize olmuş spinal korddaki özellikle aksonların yeniden görevlerini yapabileceği rejenerasyon çalışmalarıdır. Ayrıca kafa travması, kardiyak arrest ve serebral iskemi tedavisinde kullanılan hipotermide güncel tedavi yöntemleri arasındadır (37).

6.1.Spinal Kord Travmasında Cerrahi Tedavi

Travma sonrası primer hasara neden olan hematoma, kemik ve disk fragmanları gibi yer kaplayan oluşumların çıkarılmasını içeren dekompresif yaklaşımlar erken dönemde fayda sağlayabilir. Travma sonrası ilk 24 saat içinde yapılan acil dekompresyon yapılmaması durumunda kötüleşecek olan nörolojik durumu iyileştirebilir. Ayrıca yapılacak olan stabilizasyon anatomik pozisyonda düzelmeye sekonder hasarın şiddetlenmesini engelleyebilir (36).

6.2.Spinal Kord Travmasında Rejenerasyon ve Kök Hücre Tedavisi

Kök hücre, kendini yenileme özelliği olan ve birçok patolojik durumda tedavi edici rolleri tanımlanmış olan hücrelerdir. Ciddi çalışmalar yapılmasına rağmen hasarlı spinal kordun tam rejenerasyonu insanda halen gösterilememiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, SKT, serebrovasküler olay veya dejeneratif beyin hastalığı modellerinde kemik iliği kök hücrelerinin intravenöz uygulama sonrasında rejenerasyonun hızlandığına ve remiyelinizasyonun oluştuğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda spinal korda göç eden ve çoğalabilen kök hücrelerin varlığı SKT sonrasında oluşan geri dönüşsüz nörolojik işlevlerin düzelebilmesini mümkün kılmaktadır (9).

Özellikle son birkaç yıldır mezenkimal ve nöral krest kaynaklı kök hücreler deneysel çalışmalarda yaygın olarak kullanılsa da bu tedavi yöntemini geliştirmek amacıyla yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (38,39). Kemik stroma hücrelerinin BOS

yoluyla uygulanması ile yapılan bir çalışma sonucunda aksonal rejenerasyon ve lokomotor iyileşme sağladığı görülmüştür (40).

Kök hücre çalışmalarının altında deneysel SKT modellerinde fizik tedavi uygulanmasının kontrol grubuna nörolojik iyileşmeyi arttırdığıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu sıçanlarda motor nöronlar ve beyaz cevherdeki hücrelerde rejenerasyon gibi önemli olumlu değişiklikler olmaktadır (41).

Son zamanlarda SKT üzerine yapılan bir deneysel çalışmada polipeptid yapıdaki büyüme hormonunun subtipi olan sinir büyüme faktörü kullanılmış, santral sinir sistemindeki aksonal yenilenme, nöronal iyileşme gibi bilinen etkilerini spinal kord yaralanmasında da gösterdiği bildirilmiştir (42).

6.3.Spinal Kord Travmasında Medikal Tedavi

Spinal kord travması üzerine yapılan deneysel çalışmalarda birçok farmakolojik ajan kullanılmıştır. Bazı ilaç gruplarının etkinliği deneysel olarak gösterilse de bu ilaçlar klinik kullanıma girememiştir. Metilprednizolon başta olmak üzere gangliozidler, opiyat reseptör antagonistleri ve nimodipin insanlarda faz çalışmalarını tamamlamış ve onaylanmış, güncel kullanımı olan ilaçlardır (3,41).

6.3.1.Metilprednizolon

Metilprednizolonun (MP) SKT sonrası yaralanmanın ilk 8 saati içerisinde uygulanmasının 6 hafta, 6 ay veya 1 yıl içerisinde yararlı (motor ve duyu fonksiyonlarda) etkilerini gösteren çalışmalar vardır (11,23). Ulusal Akut Spinal kord yaralanma çalışmaları (NASCIS I, II, III), travma sonrası ilk 8 saat içerisinde uygulanan yüksek doz metilprednizolonun nörolojik düzelme sağladığını desteklemektedir. Antiödem, antioksidan ve lizozomal membran stabilizatörü olarak görev yapan MP bu etkiyi membrandaki Na-K ATPaz enzimini koruyarak, lipid peroksidasyonuna (LP) bağlı membran yıkımını engelleyerek yapmaktadır (26,28,31). MP tedavisi, belirgin olumsuz yan etkileri nedeniyle uzmanlar arasında bile hala oldukça tartışmalı olmasına rağmen güncel ve etkili tek medikal tedavi yöntemidir (11). Tedavi protokolü şu şekildedir;

İlaç konsantrasyonu: Tüm solüsyonlar 62.5 mg/ml olacak şekilde karıştırılır (örneğin 16 g metilprednizolon 256 ml bakteriyostatik sıvı içinde seyreltilir).

Bolus: 30 mg/kg başlangıçta 15 dakika içerisinde intravenöz bolus şeklinde verilir.

İdame: 45 dakika beklendikten sonra idame tedavisine geçilir. 5.4 mg/kg/saat en fazla 2 gün sürekli infüzyon tedavisi uygulanır. Eğer cerrahi tedavi gerekiyorsa cerrahi sırasında da infüzyon devam ettirilir (11,43).

6.3.2.Naloksan

Opiyat reseptör antagonisti olan Naloksanın spinal kord hasarını önlemede etkin olduğu NASCIS II çalışmasında gösterilmiştir. Opiat reseptör antagonistlerinin nörolojik hasar üzerindeki olumlu etkilerini spinal kord kan akımını artırarak yaptığı bilinmektedir (44). Tedavi dozu olarak 5,4 mg/kg yükleme sonrasında 24 saat boyunca 4 mg/kg idame dozunda denenmiş ve başarılı sonuçlar vermiştir (9,17)

6.3.3.Gangliosidler

Glikosfingolipid yapıda ajanlardır. Deneysel çalışmalarda nöron gelişimi üzerine olumlu etkileri ve apoptozisi önleyici etkisi gösterilmiştir. Klinik çalışmalarda 600 mg yükleme dozu sonrasında 56 gün boyunca 200 mg/gün idame dozu uygulandığında ilk 6 sonrasında belirgin nörolojik düzelme olduğu gösterilmiştir (9).

6.3.4.Nimodipin

Akut omurilik yaralanması sonrasında, hücre membranının hasara uğraması ile kalsiyum kanallarının depolarize olur ve kalsiyumun hücre içine akışı olur. Kalsiyumun doğrudan nörotoksik etkisi haricinde vasküler düz kas hücreleri üzerinde de kasılmaya yol açarak vazospazma neden olur. Bu şekilde kalsiyum hem doğrudan hücreyi etkileyerek hücre ölümüne yol açmakta, hem de kan akımını bozup enerji metabolizmasını etkileyerek diğer hücrelerde sekonder hasarlanmaya neden olmaktadır (45). Santral sinir sistemine yüksek selektif olduğundan dolayı kalsiyum kanal blokörleri arasında nimodipinle yapılan deneysel çalışmalarda, nöroprotektif etkiden çok posttravmatik kan akımını artırdığı ve bu sayede spinal kord iskemiden koruduğu saptanmıştır.

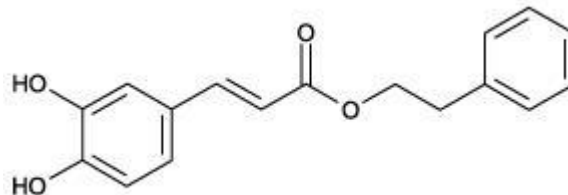
Nimodipinin spinal kord üzerindeki etkilerinin sınırlı olması ve farklı görüşler olmasından dolayı klinik kullanımı yoktur.

6.3.5.Propolis

Propolis biyolojik ve farmakolojik özellikleri yıllardır bilinen ve insan vücudu üzerinde zararlı etkisi bulunmayan bir bal ürünüdür (46). Doğada arı kovanlarının hasarlanmış yerlerinin tamirinde ve dış ortamdan kovanın içine giren yabancı maddelerin muflanarak etkisiz hale getirilmesinde propolis kullanıldığı bilinmektedir.

Alternatif tıp uygulamalarında propolis, antibakteriyel, antiseptik, antiinflamatuvar ve anestejik etkilerinden dolayı tamamlayıcı olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar propolisin antioksidan, antiapoptotik ve antiinflamatuvar etkilerini daha da bilini hale getirmiş ve tüm dünya da yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (46,47). Yara iyileşmesi üzerine yapılan bir çalışmada propolisin iyileşme zamanını kısalttığını ve dokunun tamir hızını arttırdığı gösterilmiştir (48). Bununla birlikte antioksidan özelliği de gösterilen propolis; yanık, artrit, yara iyileşmesi gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (46).

İçerisinde yüzden fazla bileşen bulunan propolisin biyolojik olarak aktif bileşenleri flavonidler (chrysin, galangin, pinocembrin ve pinobaxine), fenolik asitler (kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit) ve esterlerdir (feniletil ve dimetilalil) (48). Propolisin en aktif bileşenlerinden birisi olan CAPE (kafeik asit fenetil ester) nöroprotektif, antioksidan ve antiapoptotik etkinliği kanıtlanmış bir maddedir (46,49) (Şekil 11). CAPE en güçlü lipofilik antioksidanlardan birisidir (49). Meyve, sebze ve çayda da bulunan CAPE'in en etkili biyolojik tipi propolis içerisinde bulunan formudur (50).



Şekil 11: CAPE Biyokimyasal formül

Ortopedistler tarafından yapılan 54 vakalık bir çalışmada propolisin eklem içi enjeksiyonu ile aseptik nekroz gelişimini önlediği gösterilmiştir (51). Ayrıca CAPE intraperitoneal olarak uygulandığı zaman gerekli kan konsantrasyonlarına ulaşmaktadır.

Propolisin biyolojik olarak en aktif formu olan CAPE, inflamatuvar süreçte alana nötrofil migrasyonunu engellemekte ve bu sayede inflamatuvar sürecin çıkmaz bir durum haline gelmesini önlemektedir (46,47). CAPE araşidonik asit ve lineloik asidin 5-lipooksijenaz enzimiyle yıkımını inhibe eder ve nötrofillerden serbest oksijen radikali oluşumunu bloke eder (47,52,53,54). Lipid peroksidasyonunu ve lipooksijenaz aktivitesini engeller. Antiinflamatuvar etkilerini araşidonik asit mekanizmasını düzenleyerek ve lökotiren üretimini azaltarak gösterdiği bilinmektedir. Transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF- κ B) nin potent ve spesifik inhibitörüdür (53). Ayrıca serebral vazospazm yapılan sıçanlarda beyin enfarktını ve glutamatın neden olduğu nörotoksiteyi azalttığı gösterilmiştir (49).

Beyin, böbrek ve karaciğer üzerinde yapılan iskemi reperfüzyon çalışmalarında CAPE' in hücre koruyucu etkisi gösterilmiştir (50). Deri ve karaciğer gibi farklı organ üzerinde de hasarı ve kanser gelişimini, apoptozisi engelleyerek azalttığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (46).

Yapılan güncel çalışmalar incelendiğinde; propolisin antioksidan, antiapoptotik özelliğinin CAPE' e ve tümör gelişimini engelleyici etkilerinin ise diğer bir aktif bileşeni olan flavonoidlere bağlı olduğu düşünülmektedir (51,53,54).

7.DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ

Spinal korda travma oluşturmak amacıyla birçok deneysel model geliştirilmiştir. Güncel kullanımı olan modeller yüksekte ağırlık düşürme ve klips ile spinal kord kompresyonudur (22,55).

İlk olarak Allen tarafından ortaya koyulan yöntemde; bilinen bir ağırlık, belirli bir yükseklikten laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kord üzerine düşürülür (22). Genellikle hazırlanan bir düzenek yardımıyla açığa çıkarılan spinal kord üzerine 5 cm yüksekte 10 g ağırlık (50 g/cm) bir boru içerisinde vertikal olarak serbest düşüşe bırakılır ve travma modeli oluşturulur.

İkinci yöntemde, anevrizma klips kullanılarak spinal kord hasarı oluşturulur. 24 g gücünde Yaşargil anevrizma klipi, laminektomi sonrası spinal kordun ekstradural kompresyonu amacıyla 1 dakika kapalı tutulur ve travma oluşturulur (25).

Çalışmamızda spinal kord travması oluşturmak amacıyla anevrizma klip yöntemi kullanılmıştır.

8.HİSTOLOJİK YÖNTEMLER

8.1.Hemotoksilen Eozin Boyama

Hemotoksilen boyası kromatini boyadığından dolayı apoptozise özgü değişiklikler hücre çekirdeğinde görülebilir. Hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin çekirdek zarının periferinde toplanması ve çekirdek küçülmesi apoptozise özgü bulgulardır.

8.2.TUNEL Yöntemi

TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling) yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar ve lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin kesin varlığı bu yolla saptanabilir. Işık mikroskopik görüntüsünde kahverengi nöronlar görülür (56). SKT sonrası erken ve geç dönemde apoptozisi göstermek üzere çalışmalarda kullanılmıştır (57). TUNEL yöntemiyle hazırlanan preparatlar, elektron mikroskop altında bakıldığında nöronal apoptozis sitoplazmik organellerde ve membranlarda düzensizlik olarak karşımıza çıkar (58).

8.3.Immünokimyasal Boyamalar

Spinal kord travmaları sonrasında, sekonder hasarın gelişim basamakları üzerinde bazı immün boyama yöntemleri deneysel olarak çalışılmıştır. NF- κ B (nükleer faktör kappa B), TRADD (tümör nekroz faktör reseptör aracılı ölüm faktörü), FADD (fas ile ilişkili ölüm faktörü) immün yöntemler arasındadır. Nükleer transkripsiyon faktörü (NF- κ B) kullanılarak yapılan bir çalışmada referans olarak metilprednizolon kullanılmış ve NF- κ B düzeyini düşürerek nöron koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (59).

9.MATERYAL METHOD

Bu çalışmanın deneysel bölümü Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi TICAM Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, preparatların hazırlanması, HE ve TUNEL boyama ve histopatolojik incelemeleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmanın deney etik kurul onayı 26.10.2011 tarihinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından 233 numaralı karar ile verilmiştir.

Bu çalışmada ağırlıkları 200 ile 250 gram arası 40 adet erişkin Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanların tamamı çalışma süresince 22 °C sıcaklıkta kafeslerde korunup, aynı miktarda standart hayvan yemi ile beslendi. Travma sonrası tüm deneklere ayrı ve kolay beslenmelerini sağlayan kafeslerde bakım uygulandı.

Propolis kullanılan gruba (Grup III), propolisin aktif bileşeni olan CAPE (Sigma –Aldrich Co., Steinheim, Almanya) toz halindeki madde serum fizyolojik (%0,9 NaCl, Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul) ile 0,06mg/1mg oranında dilüe edilmiş DMSO (Dimetil sülfoksit, Sigma –Aldrich Co., Steinheim, Almanya) içerisinde çözüldü. Solüsyon haline getirilen CAPE intraperitoneal (ip) olarak 10µmol/kg dozunda uygulandı (18).

9.1.Deney Grupları

Her birinde on sıçan bulunan gruplar; cerrahi işlem uygulanmayan kontrol grubu (Grup I), travma oluşturulan fakat medikal tedavi uygulanmayan grup (Grup II), travma + propolis grubu (Grup III), travma + metilprednizolon grubu (Grup IV) olmak üzere rastlantısal olarak ayrıldı (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma grupları ve kullanılan medikal tedavi

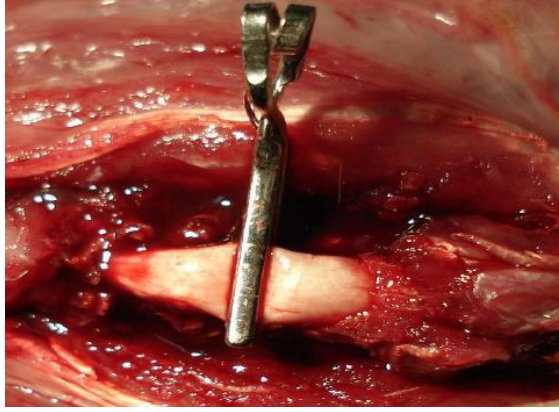
	Travma	Tedavi	İlaç Dozu
Grup I (SHAM)	-	-	-
Grup II (TRAVMA)	+	DMSO	-
Grup III	+	Propolis (CAPE)	10µmol/kg
Grup IV	+	Metilprednizolon	30 mg/kg yükleme, 5,4 mg/kg idame

9.2.Cerrahi İşlem ve Tedavi

Oniki saatlik açlık sonrasında tüm sıçanlara genel anestezi sağlamak amacıyla Ketamin Hidroklorür (Ketalar flakon, Eczacıbaşı) 60 mg/kg ve Xylazin (Rhompun % 2 enjektabl flakon, Bayer) 12 mg /kg intramuskuler (im) olarak uygulandı.

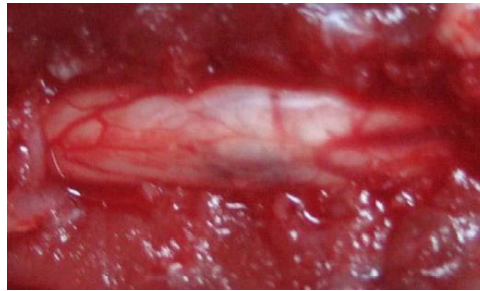
Sıçanlara genel anestezi uygulaması sonrası rahat bir cerrahi girişim sağlamak amacı ile özel tahtalar ve sabitleyiciler ile sıçanlar operasyon masasına alındı. Sıçanların sırt bölgesi traş edildi. Polyvinyl pyrolidone iod kompleksi (Batticon %10, Adeka İlaç Sanayi) ile lokal saha temizliği yapıldı. İki scapula arası orta mesafe referans alınarak cilt insizyonu yapıldı. Cilt altı ve paravertebral kaslar geçildi. T9-10-11 vertebraları ortaya kondu ve total laminektomi yapıldı. Daha sonraki aşamalarda gruplara göre farklı işlemler uygulandı. Grup I' deki sıçanların katları 3/0 atravmatik ipek sütür ile anatomisine uygun şekilde kapatıldı.

Travma gruplarına (Grup II, III, IV) T9-T11 laminektomi sonrası FE 740 K kodlu, 24 g gücünde Yaşargil anevrizma klipi (Aesculap AG, Almanya) uygulanarak travma modeli oluşturuldu. Klip epidural olarak altmış saniye süreyle uygulandı (Şekil 12).



Şekil 12: Anevrizma klip kullanılarak oluşturulan SKT

Grup II' deki sıçanlara medikal tedavi uygulanmadan sadece travma yapıldı. Klip kaldırıldıktan sonra makroskopik olarak kompresyona uğramış spinal kord dokusu görüldü (Şekil 13). Grup III' deki sıçanlara travma sonrası i.p. olarak CAPE 10µmol/kg dozunda uygulandı. Grup IV' deki sıçanlara travma sonrası i.p. olarak Metilprednizolon 30 mg/kg yükleme dozu yapıldı. Sonrasında 6 saatte bir 5,4 mg/kg prednizolon i.p. olarak 4 doz uygulandı. Tüm sıçanların cilt, ciltaltı ve fasyası 3/0 atravmatik ipek sütün ile anatomisine uygun şekilde kapatıldı. Kontrol grubu hariç travma uygulanan sıçanlar travmadan sonra parapelejik olduğu tespit edildi.



Şekil 13: Kompresyona uğramış spinal kord

Ameliyat sonrası 48 saat takip edilen sıçanlara 10 mg/kg parasetamol (Perfalgan, 10mg/mL infüzyon, Bristol Myers SQUIIB, Fransa) intraperitoneal olarak uygulanarak aneljezi sağlandı. 48. saatte sıçanlar tekrar operasyona alındı, spinal kord örnekleri blok halinde histopatolojik inceleme amacıyla çıkarıldı ve

fiksasyon için %10' luk formaldehit solüsyonu içine koyuldu. İşlem sonrasında içanlar kalpten kan alınarak sakrifiye edildi.

9.3.Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme Hemotoksilen Eozin (HE) ile boyanan rutin işlem ve TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin - dUTP Nick End Labeling) boyama olmak üzere iki yöntemle yapıldı.

9.3.1.HE Boyama ve Kesitlerin Değerlendirilmesi

Doku örnekleri alındıktan sonra % 10'luk formalin fiksatifinde 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'şer dakika ksilolde bekletildi. Spinal kord örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilen-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilen ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflandırıldı ve şeffaflanan dokular daha sonra entellan ile kapatılarak ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile değerlendirmeleri yapıldı.

HE boyaması yapılan kesitler konusunda deneyimli histolog tarafından ışık mikroskobu altında incelendi. Sağlam ve nekrotik hücrelerin dikkatle incelendiği spinal kord kesitlerinde nekrozun yaygınlığına göre birden üçe kadar derecelendirme yapıldı. Nekroz, vakuolizasyon ve hemoraji alanı bölgesel ise (+), spinal kordun yarısına yakın alanı kaplıyorsa (++) ve kesitte yaygın olarak nekrotik hücreler görülüyorsa (+++) olarak değerlendirildi (Tablo 2)

Tablo 2: Kontrol grubu değerlendirme sonuçları

SPINAL KORD	HÜCRESEL HASAR/NEKROZ	MİYELİN HASARI/VAKUOLİZASYON	DOKU İÇİ GENEL HASAR	HEMORAJI
KONTROL 1	-	-	-	-
KONTROL 2	-	-	-	-
KONTROL 3	-	-	-	-
KONTROL 4	-	-	-	-
KONTROL 5	-	-	-	-
KONTROL 6	-	-	-	-
KONTROL 7	-	-	-	-
KONTROL 8	-	-	-	-
KONTROL 9	-	-	-	-
KONTROL 10	-	-	-	-

Tablo 3: Travma grubu değerlendirme sonuçları

TRAVMA 1	++	++	++	++
TRAVMA 2	+++	++	+++	+++
TRAVMA 3	+++	+++	++	++
TRAVMA 4	++	+++	+	+++
TRAVMA 5	+++	+++	++	++
TRAVMA 6	++	++	++	++
TRAVMA 7	+++	++	+	++
TRAVMA 8	++	++	+++	+++
TRAVMA 9	+++	++	+++	+++
TRAVMA 10	+++	++	++	+++

Tablo 4: Travma + propolis değerlendirme sonuçları

SPİNAL KORD	HÜCRESEL HASAR NEKROZ	MİVELİN HASARI/VAKUOLİZASYON	DOKU İÇİ GENEL HASAR	HEMORAJİ
TRAVMA-PROPOLIS 1	+	+	-	+
TRAVMA-PROPOLIS 2	-	-	-	-
TRAVMA-PROPOLIS 3	+	-	-	+
TRAVMA-PROPOLIS 4	-	+	-	-
TRAVMA-PROPOLIS 5	+	-	-	-
TRAVMA-PROPOLIS 6	-	-	-	+
TRAVMA-PROPOLIS 7	+	+	-	-
TRAVMA-PROPOLIS 8	-	+	-	-
TRAVMA-PROPOLIS 9	-	-	-	+
TRAVMA-PROPOLIS 10	-	-	-	-

Tablo 5: Travma + Metilprednizolon değerlendirme sonuçları

TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 1	-	+	-	+
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 2	-	-	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 3	+	-	-	+
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 4	+	-	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 5	-	-	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 6	+	-	-	+
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 7	-	+	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 8	-	-	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 9	-	+	-	-
TRAVMA-METİLPREDNİZOLON 10	+	-	-	-

9.3.2.TUNEL yöntemi ve Apoptotik Hücre Sayımı

Apoptozisin belirlenmesi amacıyla TUNEL yönteminden yararlanılmış ve deneyde DNA fragmantasyonunu göstermek amacıyla Millipore firmasının kiti (TUNEL Apoptosis Detection Kit, Merc Millipore Headquarters, Billerica, MA, 01821) kullanılmıştır.

Deneyisel olarak travmanın yapıldığı yer merkez olarak kabul edilerek 5mm altındaki ve üstündeki alanlardan rastlantısal olarak kesitler alındı. TUNEL boyama amacıyla bu kesitlere aşağıdaki işlem basamakları uygulandı.

1. 5'er dakika 3 ayrı ksilolde tutuldu,
2. 2 kez %100'lik alkolde 3 dk tutuldu,

3. 1 kez % 95'lik alkolde 3 dk tutuldu,
4. 1 kez % 70'lik alkolde 3 dk tutuldu,
5. PBS solüsyonunda 5 dk tutuldu,
6. Proteinaz K solüsyonunda oda ısında 15 dk tutuldu,
7. 2 kez değiştirilmiş distile suda 2 dk yıkama yapıldı,
8. % 3 'lük hidrojen peroxidaz içerisinde oda ısısında 5 dk tutuldu,
9. PBS içerisinde 5-10 dk çalkalama yapıldı,
10. Eguilibration buffer içinde oda ısısında 5 dk inkübe edildi,
11. Kesitler TdT enzimi uygulanarak etüvde 37 derecede nemli ortamda 1 saat tutuldu,
12. Kesitleri daha sonra Working Stop/ Wash buffer solüsyonunda 15 saniye çalkalanarak 10 dk oda ısında inkübe edildi,
13. 3 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1 dk tutuldu,
14. Oda ısında kesitler anti-digoxigenin peroxidaz damlatılıp üzerlerine plastik coverslip ile kapadıltıktan sonra oda ısısında nemli ortamda 30 dk bekletildi,
15. 4 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda oda ısında 2 dk yıkama yapıldı,
16. Kesitler üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildi,
17. Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1 dk yıkanacak ve son distile suda 5 dk tutuldu,
18. Metil green'de 5 dk tutuldu,
19. 3 kez değiştirilmiş distile suya 10 kez daldırıldı,
20. Butanol şale içinde 2 kez daldırılıp çıkarıldı,
21. Ksilol I'de 2 dk
22. Ksilol II 2 dk
23. Ksilol III 5 dk tutularak kapama yapıldı ve örnekler ışık mikroskobunda değerlendirilecek hale getirildi.

Spinal kord dokusunda mevcut gruplara ait TUNEL yöntemi ile işaretlenmiş apoptotik hücre sayımı Olympus BX 51 (Japon) bilgisayar destekli ışık mikroskobu kullanılarak BAB Pro2000 programı yardımıyla bilmeyen tarafsız bir gözlemci tarafından yapıldı ve kesitlerin fotoğrafları çekildi. Her deneğe ait dört kesitten

apoptotik hücre sayımı yapılarak bunların standart sapmaları ve ortalamaları hesaplandı.

9.4.İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analizde IBM SPSS Statistic 21.0 ve Sigmastat 3.5 veri analiz programları kullanılmıştır. Tanımlayıcı veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Nekroz, vakuolizasyon, hemoraji ve genel hasarın karşılaştırılmasında gruplar normal dağılıma uymadığından dolayı Kruskal Wallis One Way Analiz testi kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırma testi olarak tüm gruplarda Student-Newman-Keuls Methodu kullanılmıştır.

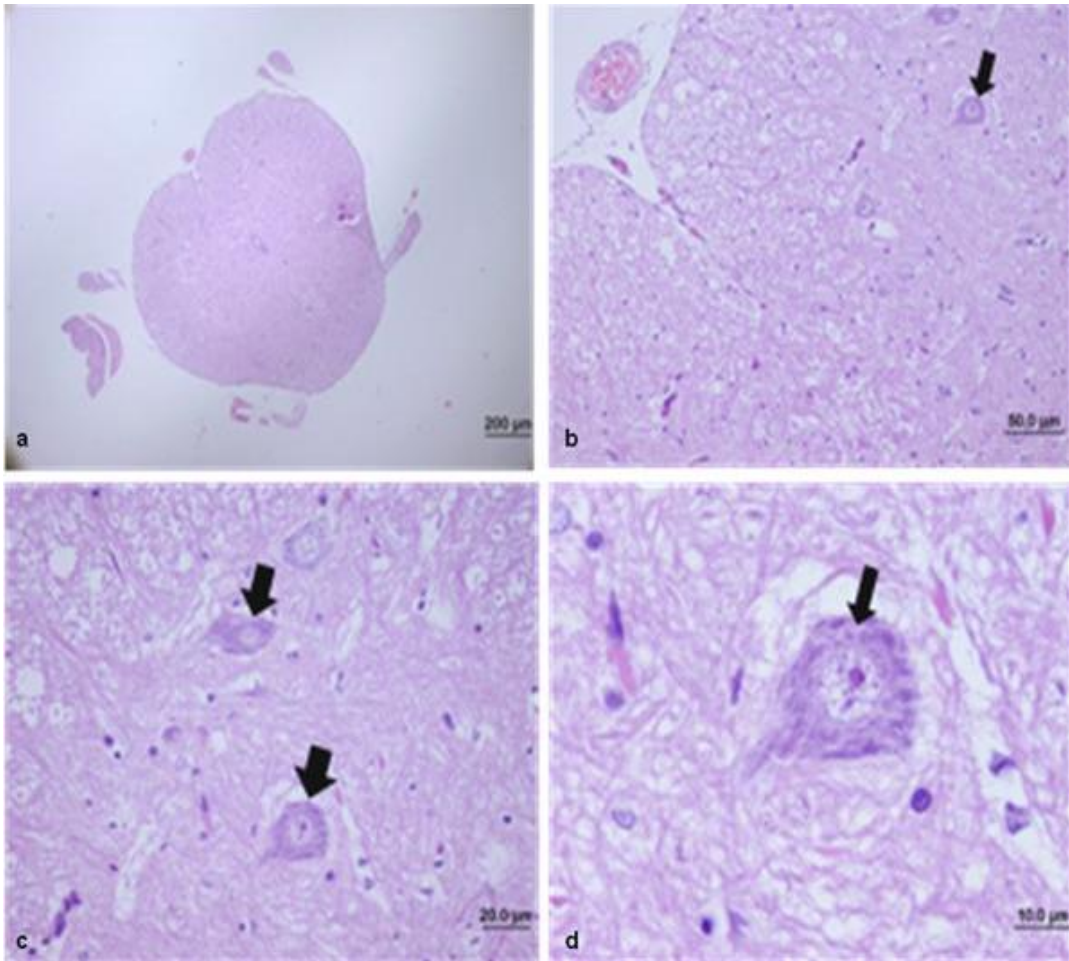
Gruplar arası apoptotik hücre sayıları normal dağılıma uymadığından dolayı Kruskal Wallis Oneway Analiz testi kullanıldı ve sonuçları kendi aralarında çoklu karşılaştırma amacıyla Tukey testi kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirme için $p < 0.001$ değeri anlamlı kabul edilmiştir. Grafikler Microsoft Excel programı kullanılarak oluşturulmuştur.

10.BULGULAR

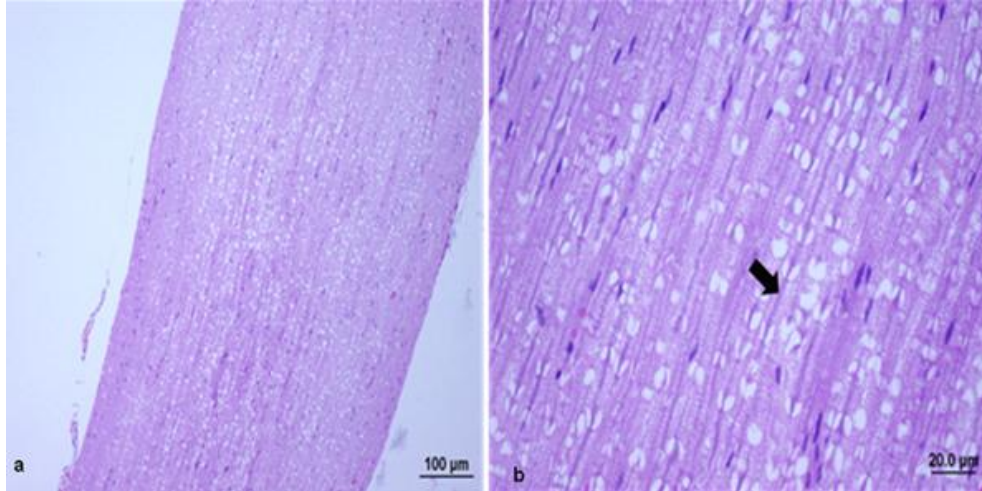
10.1.Histopatolojik Bulgular

Birinci grupta ışık mikroskopik incelemede farklı büyültmelerde spinal kordun beyaz cevher yapısı ve bu yapıda yer alan aksonlar ve miyelin kılıfları ile gri cevherde ön boynuzda bulunan multipolar motor nöronlar (→) önkromatik çekirdek yapısı, belirgin çekirdekçik yapısı ve hücre gövdeleriyle birlikte normal yapıda gözlenmektedir (Şekil 14), (bar:200µm, bar:50.0µm, bar:20.0µm, bar:10.0µm, HE).



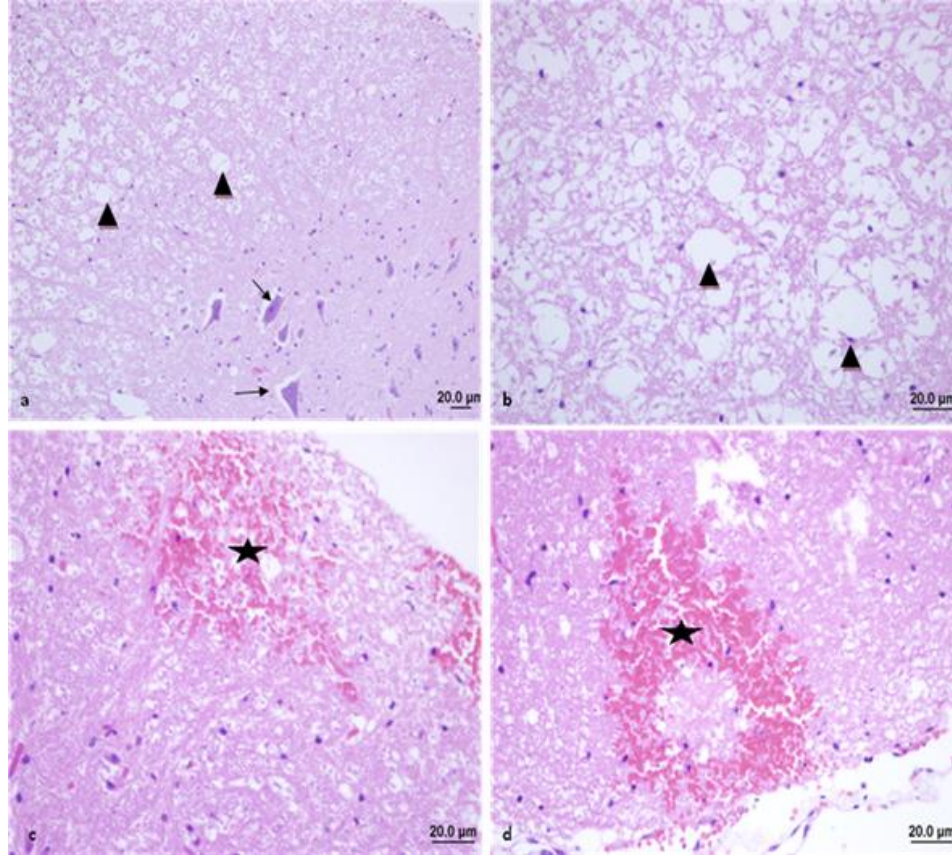
Şekil 14: Kontrol grubu HE boyama

Ayrıca kontrol grubunda longitudinal kesiti görülen spinal kordda akson yapısı (→) ve etrafını saran miyelin kılıflar normale yakın histolojik yapıda gözlenmekte. (Şekil 15), (bar:100µm, bar:20.0µm, HE).



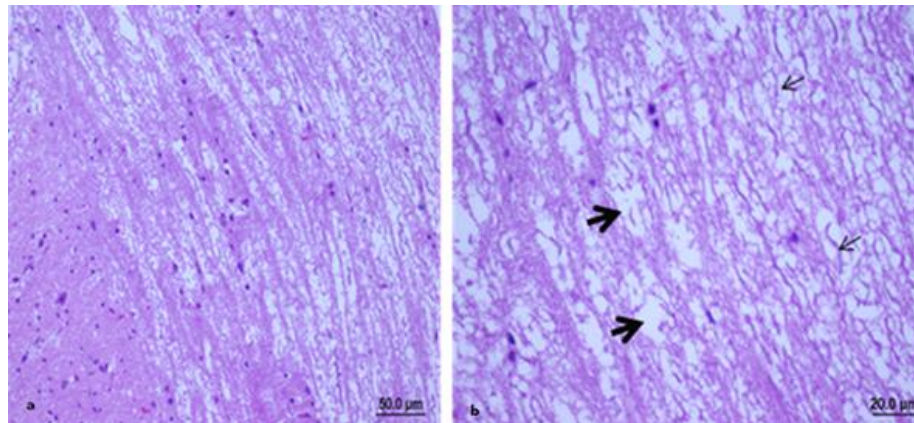
Şekil 15: Kontrol grubu HE boyama 2

Travma uygulanan ikinci grupta, ışık mikroskopik incelemede farklı büyültmelerde spinal kordun gri cevherinde ön boynuzdaki motor nöronlarda genelde iskemik hücre yapısı koyu bazofilik hücreler (→) görülmekte. Ayrıca beyaz cevherdeki miyelinlerde yoğun dejeneratif değişiklikler ve şişmeler (ok başı) ile hemorajik alanlar dikkat çekmektedir (*) (Şekil 16), (bar:20.0µm, HE).



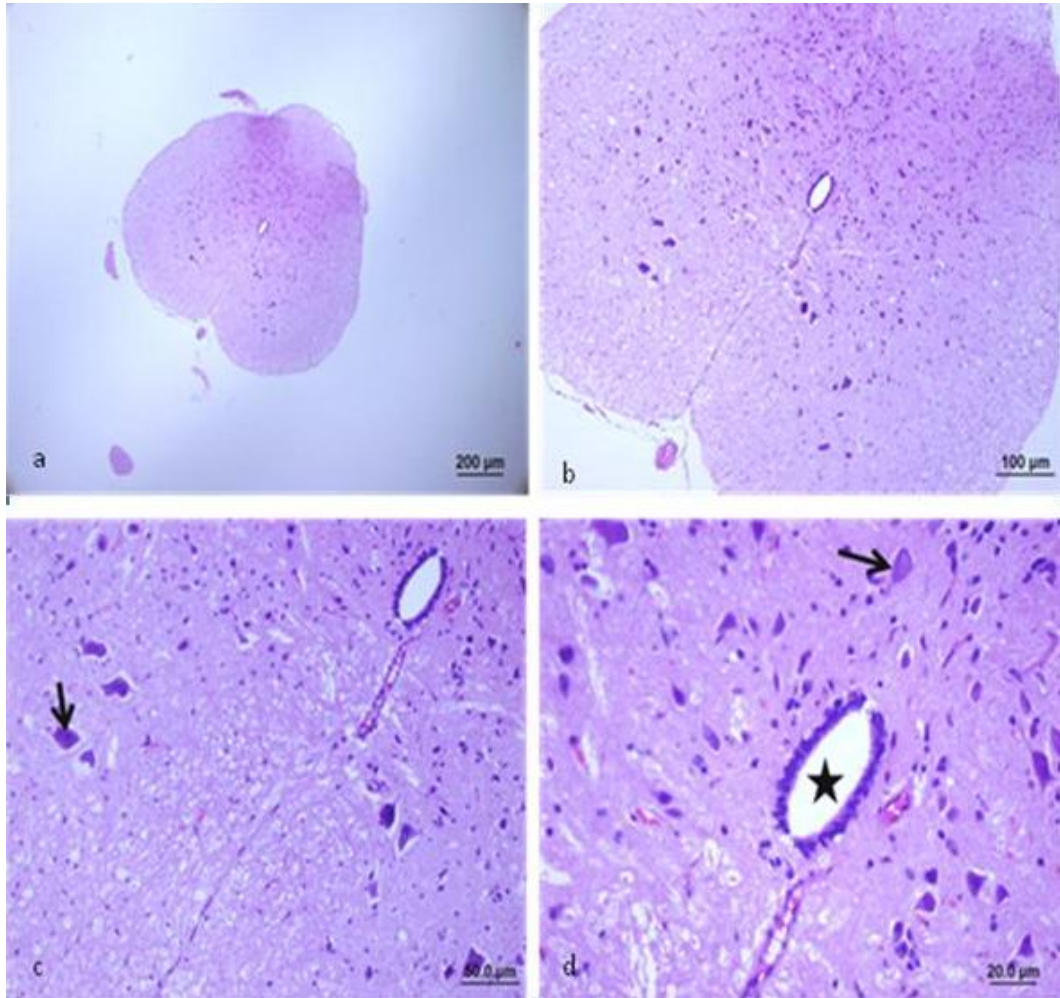
Şekil 16: Travma grubu HE boyama

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



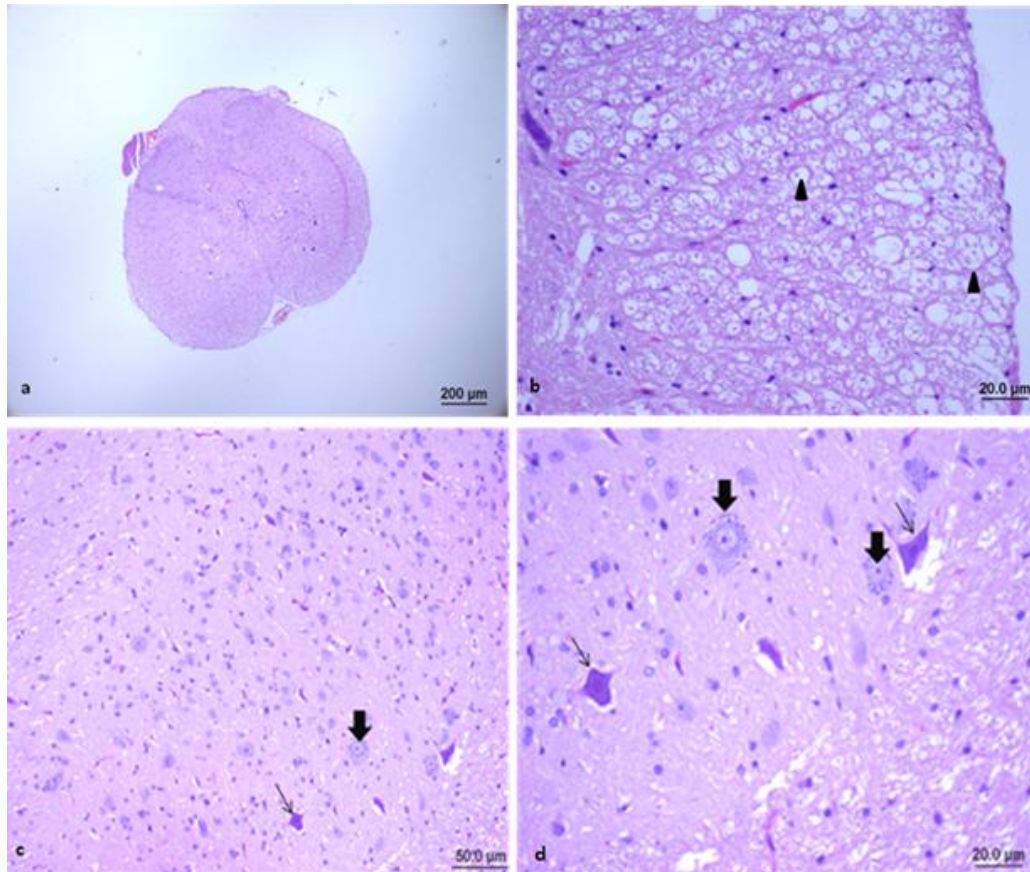
Şekil 17: Travma grubu HE boyama 2

Propolis uygulanan grupta (Grup 3) spinal kordun ışık mikroskopik olarak yapılan incelemelerinde azalmış hasar dikkat çekmekte. Gri cevher, beyaz cevher, kanalis sentralis yapısı (*) ve kanalis sentralisi döşeyen ependim hücreleri ile gri cevherde ön boynuzdaki multipolar motor nöron hücreleri (→) normale yakın histolojik yapıda görülmektedir (Şekil 18), (bar:200 μ m, bar:100 μ m, bar:50.0 μ m, bar:20.0 μ m, HE).



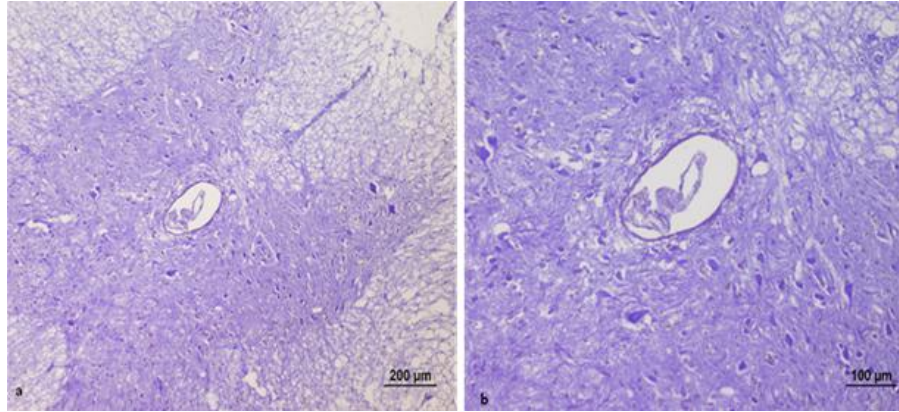
Şekil 18: Propolis tedavisi uygulanan grupta HE boyama

Metilprednizolon uygulanan grubun (Grup4) ışık mikroskopik incelemesinde farklı büyültmelerde medulla spinalisin beyaz cevherdeki aksonlar ve aksonları saran miyelin kılıfları (►) ile, gri cevherinde ön boynuzdaki motor nöronlarda ökromatik nükleus, belirgin nükleolus ve perikaryonda ergostoplazmik retikulumdan kaynaklanan tigroid alanlarıyla normale yakın yapı görülmekte (kalın ok) ancak bir-iki hücrede iskemik hücre yapısı koyu bazofilik hücre ve çekirdek ve çekirdekçiğin seçilemediği dikkat çekmekte (→). (Şekil 19), (bar:200µm, bar:20.0µm, bar:50.0µm, HE).



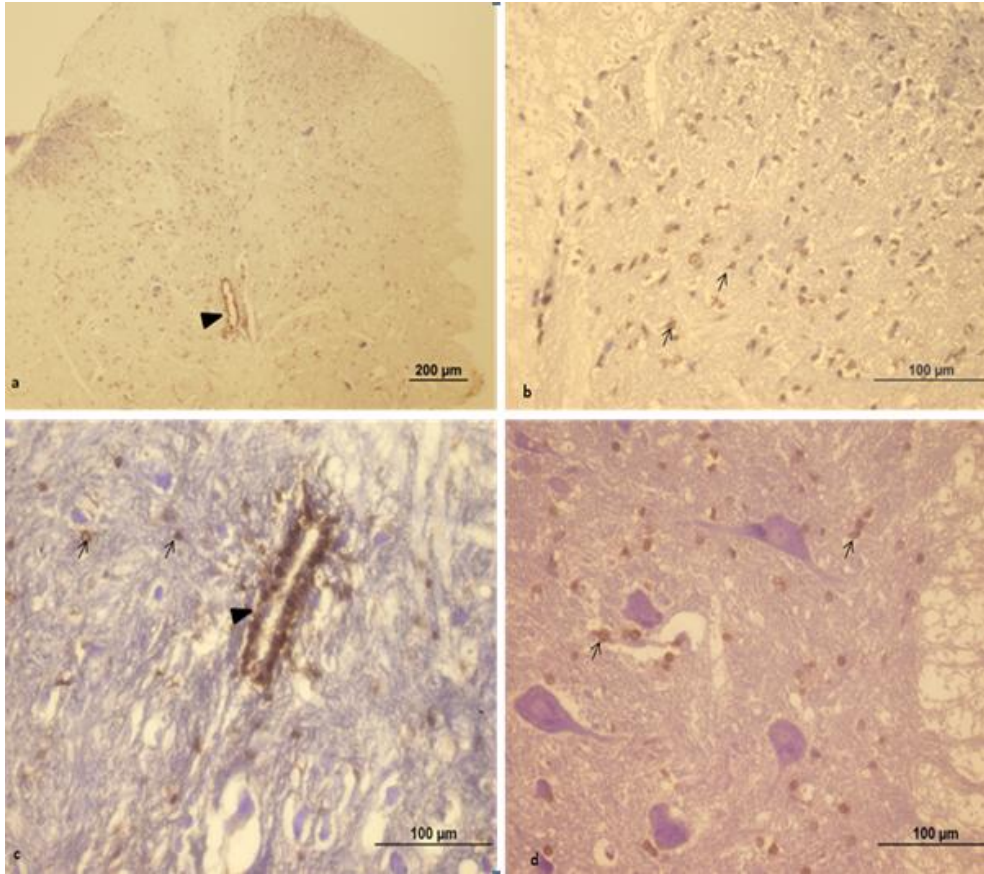
Şekil 19: Metilprednizolon uygulanan grupta HE boyama

TUNEL görüntüleme yapılan kesitler incelendiğinde; birinci grupta spinal kordda tüm yapılar TUNEL negatif olarak görülmektedir. (Şekil 20), (bar:200µm, bar:100µm, TUNEL)



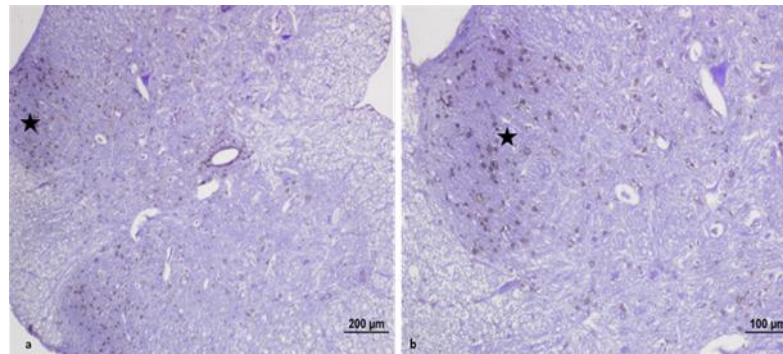
Şekil 20: Kontrol grubunda TUNEL boyama

Travma grubu (Grup 2) kesitlerde spinal kordda özellikle ependim hücreleri (►) ve glia hücrelerinde (ok) yoğun olarak TUNEL pozitif boyanmış hücreler dikkat çekmektedir (Şekil 21), (bar:200µm, bar:100µm, TUNEL).



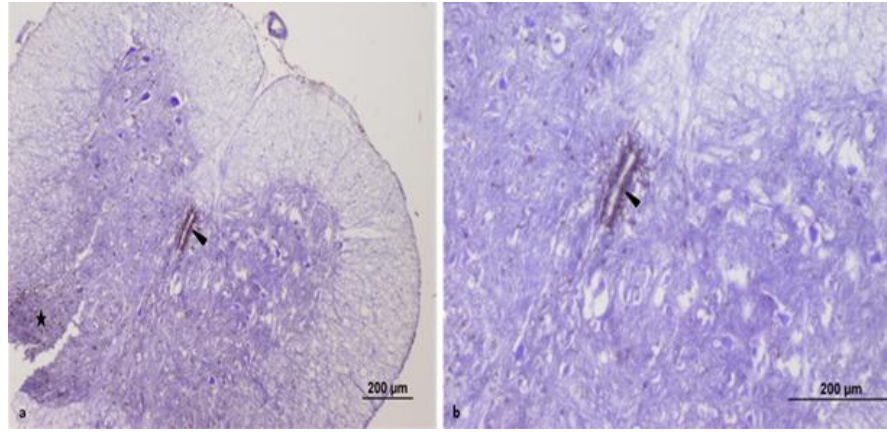
Şekil 21: Travma grubunda TUNEL boyama

Propolis tedavisi uygulanan gruba (Grup III) ait spinal kordda travma grubuna oranla azalmış kısmen ependim hücrelerinde kısmen ise gri cevherde özellikle arka boynuzda yeralan glia hücrelerinde (*) TUNEL pozitif işaretli hücreler dikkat çekmektedir (Şekil 22), (bar:200µm, bar:100µm, TUNEL).



Şekil 22: Propolis tedavisi uygulanan grupta TUNEL boyama

Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruba (Grup 4) ait spinal kord görüntüsünde, travma grubuna oranla oldukça azalmış kısmen endim hücrelerinde (►) kısmen ise gri cevherde özellikle arka boynuzda yer alan glia hücrelerinde (*) TUNEL pozitif işaretli hücreler dikkat çekmektedir. (Şekil 23)), (bar:200µm, TUNEL).



Şekil 23: Metilprednizolon tedavisi uygulanan grupta TUNEL boyama

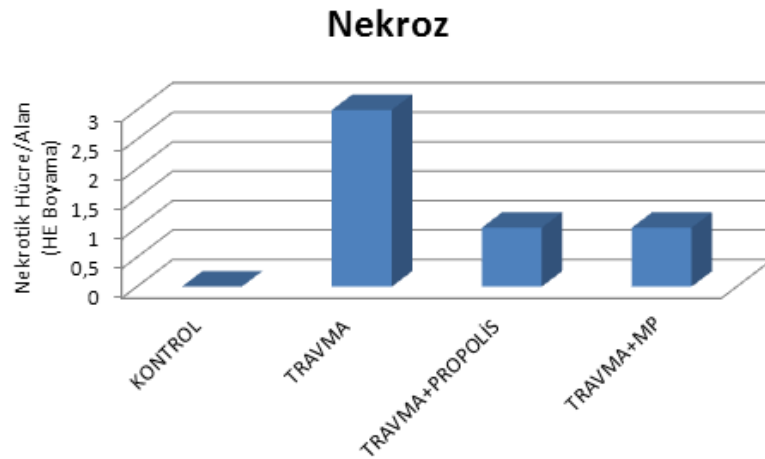
10.2.İstatistiksel Bulgular

Tüm sıçanlarda alınan doku örneklerinden yapılan HE boyama ile nekroz, vakualizasyon, hemoraji ve genel hasar değerlendirildi. İleri inceleme için kesitlere TUNEL yöntemi uygulandı. Doku örneklerinde gruplar arası değerlendirme amacıyla apoptotik hücre sayımı yapıldı.

Kesitlerde nekroz yaygınlığı değerlendirildi ve nekrozun normal dağılıma uymadığı saptandı. Uygulanan Kruskal Wallis Oneway Analiz testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p < 0,001$)(Tablo 6). Grupların sonuçları kendi aralarında Student-Newman-Keuls Methodu ile karşılaştırıldı. Travma yapılan grup ile metilprednizolon ve propolis tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık saptandı ($p > 0,001$)(Şekil 24). Propolis tedavisinin, SKT sonrası rutin kullanımı olan metilprednizolona yakın sonuçlar verdiği ve travma sonrası nekrozu azalttığı saptandı.

Tablo 6: Nekroz Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) (P= <0.001)

Group	N	Median	25%	75%	p
KONTROL	10	0	0	0	p<0.001
TRAVMA	10	3	2	3	
TRAVMA+PROPOLİS	10	0	0	1	
TRAVMA+METİLPREDNİZOLON	10	0	0	1	

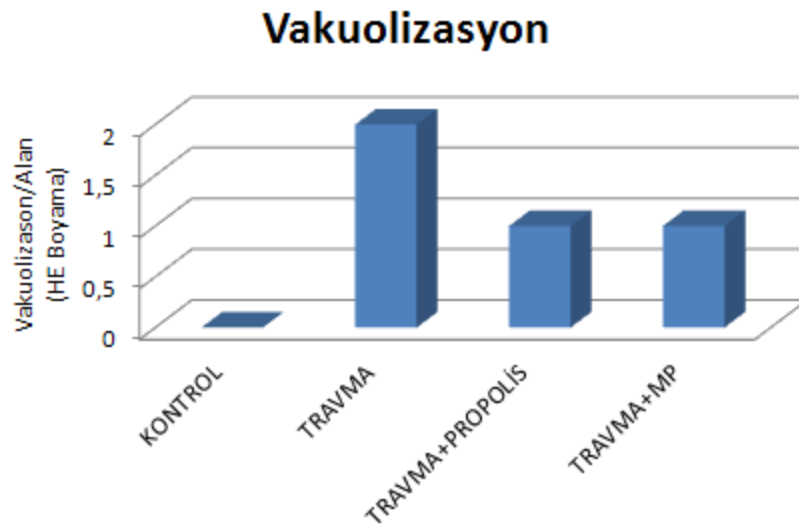


Şekil 24: Nekrotik hücre sayısının gruplar arası dağılımı

Histolojik kesitlerde travma sonrası hasarın göstergelerinden birisi olan vakualizasyon yaygınlığı değerlendirildi ve normal dağılıma uymadığı saptandı. Uygulanan Kruskal Wallis Oneway Analiz testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$)(Tablo 7). Grupların sonuçları kendi aralarında Student-Newman-Keuls Methodu ile karşılaştırıldı. Travma yapılan grup ile metilprednizolon ve propolis tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık saptandı ($p>0.001$)(Şekil 25) Propolis tedavisinin, SKT sonrası rutin kullanımı olan metilprednizolona yakın sonuçlar verdiği ve travma sonrası nekroz ile benzer şekilde vakuolizasyonu azalttığı saptandı.

Tablo 7: Vakuolizasyon Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) (P= <0.001)

Group	N	Median	25%	75%	P
KONTROL	10	0	0	0	p<0.001
TRAVMA	10	2	2	3	
TRAVMA+PROPOLİS	10	0	0	1	
TRAVMA+METİLPREDNİZOLON	10	0	0	1	

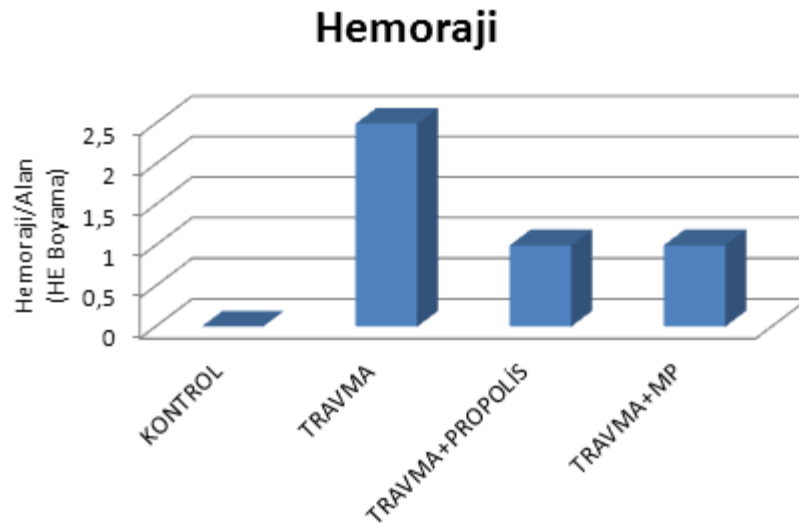


Şekil 25: Vakuolizasyonun gruplar arası dağılımı

Spinal kord travması sonrası hasarın göstergelerinden bir diğeri olan hemoraji yaygınlığı değerlendirildi ve normal dağılıma uymadığı saptandı. Uygulanan Kruskal Wallis Oneway Analiz testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$)(Tablo 8). Grupların sonuçları kendi aralarında Student-Newman-Keuls Methodu ile karşılaştırıldı. Travma yapılan grup ile metilprednizolon ve propolis tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık saptandı ($p>0,001$)(Şekil 26).

Tablo 8: Hemoraji Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) (P= <0.001)

Group	N	Median	25%	75%	p
KONTROL	10	0	0	0	p<0.001
TRAVMA	10	2,5	2	3	
TRAVMA+PROPOLİS	10	1	0	1	
TRAVMA+METİLPREDNİZOLON	10	1	0	1	

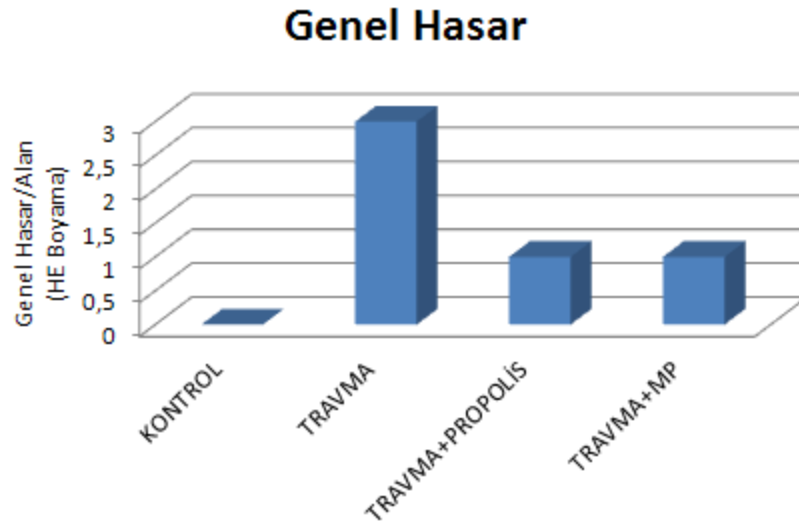


Şekil 26: Hemoraji gruplar arası dağılımı

Gruplar arasında histolojik olarak görülen genel hasar değerlendirildiğinde, genel hasarın parametreleri olan nekroz, hemoraji ve vakuolizasyon gibi normal dağılıma uymadığı saptandı. Uygulanan Kruskal Wallis Oneway Analiz testi ile istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,001$)(Tablo 9). Grupların sonuçları kendi aralarında Student-Newman-Keuls Methodu ile karşılaştırıldı. Travma yapılan grup ile metilprednizolon ve propolis tedavisi uygulanan gruplar karşılaştırıldığında aralarında anlamlı farklılık saptandı ($p>0.001$)(Şekil 27) Sonuçta genel hasar değerlendirildiğinde propolisin SKT tedavisinde metilprednizolon kadar etkili olduğu görüldü.

Tablo 9: Genel Hasar Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way)(P= <0.001)

Group	N	Median	25%	75%	P
KONTROL	10	0	0	0	p<0.001
TRAVMA	10	2	2	3	
TRAVMA+PROPOLİS	10	0	0	1	
TRAVMA+METİLPREDNİZOLON	10	0	0	1	



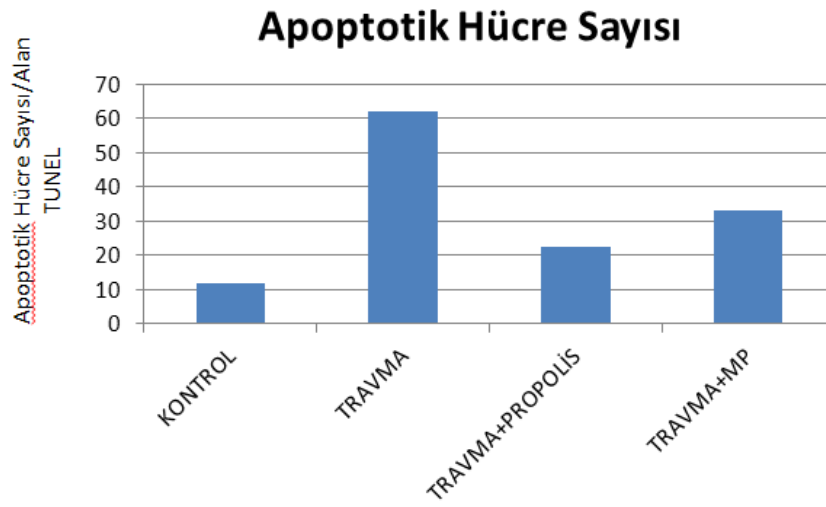
Şekil 27: Genel hasarın gruplar arası dağılımı

10.3. Apoptotik Hücre Sayıları

Cerrahi işlem sonrası alınan histolojik kesitlere TUNEL yöntemi uygulandı. Doku örneklerinde gruplar arası değerlendirme yapmak amacıyla bilgisayar destekli görüntülme programı kullanılarak bağımsız bir araştırmacı tarafından apoptotik hücre sayımı yapıldı. Gruplar arası apoptotik hücre sayıları normal dağılıma uymadığından dolayı Kruskal Wallis Oneway Analiz testi kullanıldı ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,001$)(Tablo 10). Grupların sonuçları kendi aralarında Tukey testi ile karşılaştırıldı. Propolis ve metilprednizolonun SKT sonrası apoptozisi belirgin bir şekilde engellediği bu sayede sekonder hücre hasarını azalttığı görülmüştür. Ayrıca propolis ile metilprednizolonun etkileri ayrı ayrı değerlendirildiğinde, propolisin apoptozisi metilprednizolona göre daha fazla baskıladığı ve aralarında anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0.001$).

Tablo 10: Apoptotik hücre sayıları Karşılaştırmaları (Kruskal Wallis One Way) ($P= <0.001$)

Group	Median	25%	75%	P= <0.001
KONTROL	12	20	25	
TRAVMA	62	47	73	
TRAVMA+PROPOLİS	22,5	36	63	
TRAVMA+METİLPREDNİZOLON	33	27	40	



Şekil 28: Apoptotik hücre sayısının gruplar arası dağılımı

11.TARTIŞMA

Spinal kord travmaları özellikle genç ve üretken toplumda görülme sıklığının yüksekliği, fiziksel psikososyal ve ekonomik açıdan oluşturduğu hasarın büyüklüğü ve literatürde kabul edilmiş bir tedavi protokolünün olmaması nedeniyle günümüzde halen önemini sürdürmektedir. Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi ile ilgili yapılan çalışmalarla büyük ilerlemeler kaydedilmesine ve güncel medikal tedavi yöntemlerine rağmen şu ana kadar yüksek doz metilprednizolon dışında klinik olarak etkinliği kanıtlanmış başka bir farmakolojik ajan yoktur.

Deneysel SKT sonrası farmakolojik ajanlar tek başlarına veya metilprednizolon ile kombine bir şekilde gruplar oluşturularak uygulanmıştır. Son yapılan bir çalışmada kombine ilaç kullanımının tek başına metilprednizolon kullanımına üstünlüğü saptanmamıştır (19). Bu nedenle kombine ilaç kullanımı yerine hasar mekanizmalarını önlemeye yönelik yan etkileri daha az olan ajanlarla çalışmanın SKT tedavisine yön göstereceği düşünülmektedir.

Spinal kord travmaları kalıcı ve geri dönüşsüz motor defisitlere sebep olduğundan dolayı SKT geçiren hastaların yaşam kalitesi olumsuz bir şekilde azalmıştır (60). Yüksek doz kortikosteroidler nörolojik yararları gösterilmiş olsa da ciddi yan etkilere sahiptir. Patolojisi ve farmakolojik tedavisi ile ilgili soru işaretlerini çözmek amacıyla SKT ile ilgili deneysel çalışmalar günümüzde devam etmektedir.

Mekanik etkiler ile ortaya çıkan primer hasarı takiben spinal kordda gelişen bir dizi biyokimyasal ve histopatolojik olaylar zinciri sekonder hasar olarak adlandırılır ve spinal kordun daha fazla zarar görmesine dolayısıyla travma sonrası hücre ölümünün devam etmesine neden olmaktadır. Primer hasarın medikal veya cerrahi tedavisi olmadığından dolayı güncel kök hücre çalışmaları dışında yapılan tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yöneliktir (21,22).

Geçmiş yıllarda spinal kord travmaları üzerine yapılan çalışmalarda, özellikle hasarın en önemli nedenlerinden olan spinal kord kan akımının azalması üzerinde durulmuştur. SKT sonrasında ortama salınan endorfinlerin vazokontraktör etkilerinden dolayı kan akımını azaltıcı etki gösterdiği bilinmektedir. Bu mekanizma

ile yola çıkılarak opiat antagonistlerin endorfinlerin vazospastik etkisini bloke ederek spinal kord kan akımını arttırdığı ve nörolojik hasarı önleyebileceği ileri sürülmüştür (44).

Seçkin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada sıçanlara yüksek dozlarda medilprenizolon tedavisi uygulanmış, steroid tedavisinde doz artıkça, spinal kord travmasına bağlı hipotansiyon gelişse dahi bölgesel kan akımının arttığı ve sonuçta ekstrasellüler Ca^{++} yerine koyulduğu ve lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (17). Bizde çalışmamızda bu bulgulara paralel olarak metilprednizolon grubunda travma grubu ile kıyaslandığında histolojik olarak apoptozisin ve nekrotik hücrelerin azaldığını gözlemledik. Sekonder hasarda önemli bir yer alan lipid peroksidasyonuna bağlı hücre ölümünün, metilprednizolon lipid peroksidasyonu engellendiğinden dolayı görülmediği düşünülmektedir.

Yüksek doz Metilprednizolon tedavisi ile ilgili en önemli tartışma ilacın yan etkilerinden dolayıdır. Gastrointestinal kanama ve enfeksiyon gibi ciddi yan etkilerinin olması araştırmacıları bu konuda etkili yeni ilaçlar geliştirmeye yönlendirmektedir (3). Çalışmamızda bu noktadan hareket ederek insan vücuduna ve hücrelere hiç zararlı etkisi olamayan propolisin biyolojik olarak aktif bileşeni olan CAPE kullanılmış, sağlam hücrelere zarar vermeden sadece hasarlı bölgedeki yıkımı önlemek amaçlanmıştır.

Propolisin kullanıldığı deneysel SKT oluşturulan bir çalışmada lokomotor aktivitede fonksiyonel iyileşme görüldüğü saptanmıştır. Biz çalışmamızda aktif bileşenleri çok sayıda olan propolisin, SKT üzerine olumlu etkilerini CAPE üzerinden gösterdiğini düşündüğümüzden dolayı medikal tedavi olarak CAPE uyguladık (61).

İlhan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tavşanlar üzerinde spinal kord travma modeli oluşturulmuş ve CAPE' in serbest radikal oluşumunu ve endotel hücre yıkımını engelleyerek spinal kord hasarını azalttığı gösterilmiştir (54). CAPE ile medikal tedavi uygulanan deneysel bir çalışmada, CAPE'in apoptozis üzerine etkileri karşılaştırılmış ve doz bağımlı olarak sitotoksik etki gösterdiği görülmüştür (62).

Spinal kord iskemi ve reperfüzyonundaki histopatolojik ve biyokimyasal değişiklikleri ortaya çıkarmak amacıyla yapılan bir çalışmada serum sitokin düzeylerinin hasardaki histopatolojik değişiklikler ile birlikte yükseldiği saptanmıştır. Çalışmamız ile benzer şekilde travma sonrası 24. saatte doku örnekleri incelendiğinde spinal kordda hemoraji, vakuolizasyon ve nekroz gelişimi gözlemlenmiştir (63).

Spinal kord travması sonrası metilprednizolon tedavisinin kullanıldığı histolojik ve biyokimyasal parametrelerin ortak olarak değerlendirildiği bir çalışmada, SKT tedavisinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiödem etkilerinden dolayı dünya çapında kullanılan metilprednizolonun akut ve subakut dönemde bizim çalışmamızla paralel olarak nöronal doku yıkımını ve hücre ölümünü azalttığı saptanmıştır (5,64).

Apoptosis spinal kord travması oluşturularak yapılan deneysel çalışmalarda hem biyokimyasal hemde histolojik olarak güncel kullanımı olan bir parametredir. Biyokimyasal olarak JAK/STAST sinyal yolağı üzerinden etkisinin gösterildiği bir çalışmada metilprednizolon ve ginkgolid B medikal tedavi olarak uygulanmış ve iki ilacında apoptozisi engelleyerek sekonder hasarı azalttığı gösterilmiştir (35). Histolojik açıdan metilprednizolonun apoptozis üzerindeki etkisinin gösterildiği çalışmamızı, ileride mevcut sinyal yolaklarını kullanarak biyokimyasal olarak desteklememizin çalışmamızın niteliğini arttıracakı düşünülmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız histolojik yöntemlerden birisi olan TUNEL uygulaması, apoptotik hücreleri işaretleyen değerli bir tanı yöntemidir. Son yıllarda farklı ilaç gruplarının antiapoptotik etkilerini kanıtlamak amacıyla kullanılmaktadır. SKT sonrası hem erken hem de geç dönemde alınan kesitlerde apoptotik hücrelere görülmekte ve bilgisayar destekli programlar ile hücre sayımları yapılabilmektedir. Travma sonrası 48 saat içerisinde karakteristik olarak TUNEL pozitif hücreler arka boynuzda görülmeye başlar. (57,58,64,65).

12.SONUÇ

Apoptotik hücre sayıları gruplar arası karşılaştırıldığında, propolisin apoptotik hücre sayısını metilprednizolona göre daha fazla azalttığı görülmüştür. Çalışmamızda propolisin aktif bileşeni olan CAPE ile medikasyon yapılmış ve literatür ile uyumlu olarak propolisin belirgin antiapoptotik etki gösterdiği saptanmıştır. Genel hasar değerlendirildiğinde çok etkili bir ilaç olan metilprednizolonun ödem çözücü etkinliği belirginken, tek başına apoptozisi önlemede propolisin üstünlüğü saptanmış fakat bu bilgilerin klinik yansımaları için bu konuda daha güncel çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmüştür.

Histolojik zeminde yapılan çalışmamızın, primer hasara bağlı olarak gelişen geri dönüşsüz hücre kaybını yerine koymak ve gelişen nörolojik defisitleri düzeltmek amacıyla yeni hücre rejenerasyonuna yönelik yapılan hücre kültürü çalışmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Ayrıca propolisin antiapoptotik etkinliği bilinen aktif bileşeni olan CAPE, glutamatın neden olduğu nörotoksisteyi engellediğinden dolayı, SKT sonrası hasarın daha da şiddetlenmesine neden olan glutamat düzeyini azaltması ile ilişkili olarak sekonder hasarı ve nörotoksisteyi azaltabileceği düşünülmüş fakat konu ile ilgili daha ayrıntılı deneysel çalışmalara da ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Simon CM, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma*. 2008; 26(4):563-74.
2. Aslan G, Ökten A, Çaylı S. Omurilik Yaralanmasının Patoloji Ve Fیزیopatolojisi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006; 28(2):73-8.
3. Sencer A, Aras Y, Akçakaya MO, Gömleksiz C, Can H, Canbolat A. Effects of combined and individual use of N-methyl-D aspartate receptor antagonist magnesium sulphate and caspase-9 inhibitor z-LEDH-fmk in experimental spinal cord injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2013; 19(4): 313-19.
4. Polat E, Elvan Ö, Bağrıyanık A, Kuyumcu M, Atalay A. Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkiliğinin Araştırılması. *Türk Anest Rean Der*. 2010; 40(4): 212-21.
5. Şenel A, Yıldız L, Çokluk C, Tümkaya L, İyigün Ö, Önder A, Çelik F, Rakunt C. Deneysel Medulla Spinalis Travmasında Magnezyum Sülfatın Klinik Ve Histopatolojik Etkilerinin İncelenmesi. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 1999; 5(3): 147-51.
6. Sayın M, Var A, Temiz C. The dose-dependent neuroprotective effect of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury. *Neurol Neurochir Pol*. 2013; 47(4): 345-51.
7. Seçkin Z, Aykol Ş, Orbay T, Ataoğlu Ö. Deneysel spinal kord yaralanmalarında farklı ilaç gruplarının etkisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*. 1991; 2(1): 10-3.
8. Atilla K, Umit K, Dilek K, Sema T, Burak K, Kazim Y, Murad B. Comparison of the Effect of Mexiletine and Methylprednisolone on Neural Function and Histopathological Damage after Transient Spinal Cord Ischemia in Rabbits. *Turkish Neurosurgery*. 2010; 20(1): 43-9.
9. Merih I, Taner T, Hakan Y, Fevzullah A, Aylin A, Ferruh G, Mustafa U. The Use of Methylprednisolone, Vitamin E and Their Combination in Acute Spinal Cord Injury: An Experimental Study. *Turkish Neurosurgery*. 2006; 16(1): 2-8.
10. Kalayci M, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S, Acikgoz B. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochem Res*. 2005; 30(3): 403-10.
11. Yusuf SŞ, Ömer B, Sevil AV. Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimentally Induced Spinal Cord Trauma. *L Clin Anal Med*. 2012; 3(4): 442-7.

12. Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Perri E, Britti D, Cuzzocrea S. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol.* 2012; 83(1): 1413-26.
13. Król W, B.V., Sforcin JM, Szliszka E, Czuba Z, Kuropatnicki AK. Propolis: properties, application, and its potential. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; doi: 10.1155/2013/807578.
14. Ertuğrul U, Uğur F, Osman E, Harun A, Adnan T, Celal Y, Sinan D, Nebahat T. Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi. *Türk Nörol Derg.* 2011; 17(1): 131-136.
15. Olczyk P, Komosinska-Vassev K, Stojko J, Pilawa B. Positive effect of propolis on free radicals in burn wounds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; doi: 10.1155/2013/356737.
16. Kuropatnicki AK, Kłósek M, Król W. The beginnings of modern research on propolis in poland. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; doi: 10.1155/2013/983974.
17. İlhan A, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 386-94.
18. Hoşnuter M, Babuççu O, Armutcu F, Kargi E, Işıkdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* 2004; 30(1): 121-5.
19. Teke Z, Yenisey C, Sacar M, Simsek NG, Akoglu M. Caffeic acid phenethyl ester alleviates mesenteric ischemia/reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2012; 25(1): 354-65.
20. Shi Y, W.X., Gong Y, Qiu Y, Zhang H, Huang Z, Su K. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res.* 2010; 35(10): 930-7.
21. İlhan A, K.U., Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 16(1): 458-63.
22. Vural A, Nergis Y, Arslan A, Uzunlar K. Deneysel spinal kord travmalarında dopamin ile kombine nimodipin ve nalorfinin etkileri *Ankara Patoloji Bülteni.* 1994; 11(2): 21-5.

23. Onifer SM, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.* 2007; 48(4): 385-95.
24. Hasturk A, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altinors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turk Neurosurg.* 2009; 19(4): 353-59.
25. Döşoğlu M, İzgi N, Ünal ÖF. Omurilik Travmalarında İkincil Hasar Mekanizmaları. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 1998; 4(3): 147-57.
26. Bakar B, Kupana Ayva S, Sarkarati B, Kasımcan MO, Kılınç K. Effects of low-dose methotrexate in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013; 19(4): 285-93.
27. Cristante AF, B.F.T., Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; 67(10): 1219-24.
28. Ismailoğlu Ö, O.B., Sütcü R, Kara Y, Tomruk O, Demir N. Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. *Am J Med Sci.* 2013; 345(1): 39-44.
29. Song Y, Jin C, Zhang J, Ding B, Zhang F. Protective effect of ginkgolide B against acute spinal cord injury in rats and its correlation with the Jak/STAT signaling pathway. *Neurochem Res.* 2012; 38(3): 610-9.
30. Sonmez, EK, Karabay Ö, Turkoglu G, Ogus S, Yilmaz E, Caner C, Altinors Nur. Minocycline treatment inhibits lipid peroxidation, preserves spinal cord ultrastructure, and improves functional outcome after traumatic spinal cord injury in the rat. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013; 38(15): 1253-9.
31. Kato H, Matsuo S, Wu YJ, Jacquin MF, Hsu CY, Kouchoukos NT, Choi DW. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Exp Neurol.* 1997; 148(2): 464-74.
32. Chengke WL, Xiyang W, Ping W, Xiaoyang P, Zhengquan X, Hao Z, Penghui Z, Wei P. Effect of infliximab combined with methylprednisolone on expressions of NF- κ B, TRADD, and FADD in rat acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013; 38(14): 861-9.
33. Cristante AF, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord.* 2013; 51(1): 501-7.

34. Li X, Xu S, Lin X, Ling Z. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone reduces secondary damage in experimental spinal cord injury. *J Int Med Res.* 2013. 41(1): 153-61.
35. Schiaveto-de-Souza A, Defino HL, Del Bel EA. Effect of melatonin on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord. *Braz J Med Biol Res.* 2013; 46(4): 348-58.
36. Grulova I, Nagyova M, Cizek M, Cizkova D. The effect of hypothermia on sensory-motor function and tissue sparing after spinal cord injury. *Spine J.* 2013; doi: 10.1016/j.spinee.2013.06.073. [Epub ahead of print].
37. Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Franzen R, Wislet-Gendebien S. Spinal cord injuries - how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? *Stem Cells.* 2013; doi: 10.1002/stem.1579. [Epub ahead of print].
38. Selvarajah S, Haider AH, Abularrage CJ, Becker D, Hyder O, Dhiman N, Gupta D, Black Iii JH, Schneider EB. The Burden of Acute Traumatic Spinal Cord Injury among Adults in the United States: an Update. *J Neurotrauma.* 2013; Oct 18. [Epub ahead of print].
39. Nakano N, Seo TB, Homma T, Yamada Y, Ohta M, Suzuki Y, Nakatani T, Fukushima M, Hayashibe M, Ide C. Effects of Bone Marrow Stromal Cell Transplantation through CSF on the Subacute and Chronic Spinal Cord Injury in Rats. *Plos One.* 2013; 8(9): doi: 10.1371/journal.pone.0073494.
40. Oliveri RS, B.S. Biering-Sørensen F., Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models. *Neurobiol Dis.* 2013; 10.1016/j.nbd.2013.
41. Avcı CB, Baran Y, Sahin F, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2011; 137(1): 41-7.
42. Kasai M, F.H., Soumiya H, Furukawa S. Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction. *Biomed Res.* 2011; 32(1): 1-7.
43. Kasai M, Soumiya H, Furukawa S., Ethanol extract of chinese propolis facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011: 10.1155/2011/749627.

44. Guang C, Shouyu W, Decheng LV. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med.* 2013; 6(4): 868-72.
45. Hao HH, Guo ZJ, Bai L, Zhang RP, Shuang WB, Jia YJ, Wang J, Li XY, Liu Q. Valproic acid reduces autophagy and promotes functional recovery after spinal cord injury in rats. *Neurosci Bull.* 2013. 29(4): 484-92.
46. Sencer A, Aras Y, Akçakaya MO, Gömleksiz C, Can H, Canbolat A. Effects of combined and individual use of N-methyl-D aspartate receptor antagonist magnesium sulphate and caspase-9 inhibitor z-LEDH-fmk in experimental spinal cord injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013; 14(9): 313-9.
47. Sayın M, Var A, Temiz C. The dose-dependent neuroprotective effect of alpha-lipoic acid in experimental spinal cord injury. *Neurol Neurochir Pol.* 2013; 47(4): 345-51.
48. Ozgiray E, Oztürk OH, Altaş M, Aras M, Söğüt S, Yurtseven T, Oran I, Zileli M. Protective effects of edaravone on experimental spinal cord injury in rats. *Pediatr Neurosurg.* 2011. 47: 254-60.
49. Tetik ö, Gökkaya A. Spinal kord korunması. *TGKDCD,* 2000. 8(2): 578-92.
50. Gregory GJB, Spinal Cord Anatomy, Localization, And Overview Of Spinal Cord Syndromes. *Lifelong Learning Neurol.* 2008; 14(3): 11-35.
51. Schwab JM, Mueller CA, Failli V, Kaps HP, Tuli SK, Schluesener HJ., Experimental strategies to promote spinal cord regeneration--an integrative perspective. *Prog Neurobiol.* 2006; 78(2): 91-116.
52. TC Erhan, Nöroşirürjide Temel Konular ve İlkeler. Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2004.
53. Ho CH, Priebe MM, Chiodo AE, Scelza WM, Kirshblum SC. Spinal cord injury medicine. 1. Epidemiology and classification. *Arch Phys Med Rehabil.* 2007; 88(3): 49-54.
54. Pearse DD, Pereira FC, Andrade CM, Puzis R, Pressman Y, Golden K, Kitay BM, Blits B, Wood PM, Bunge MB. Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia.* 2007; 55(9): 976-1000.
55. Karamehmetoğlu SS, Karacan I, Yılmaz H, Togay HS, Ertekin M, Döşoğlu M, Ziyal MI, Kasaroğlu D, Hakan T. Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An epidemiological study. *Paraplegia.* 1995; 33(8): 469-71.

56. Korfalı E, Zileli M. Temel Nöroşirürji. Türk Nöroşirürji Derneği, Ankara, 2010.
57. Greenberg MS. Handbook of Neurosurgery. Thieme International, 2001.
58. Snell SR. Klinik Nöroantomi. Nobel Yayınevi, İstanbul, 2000.
59. Kurozumi K, Tamiya T, Kawano Y, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther.* 2004; 9(2): 189-97.
60. Anderson DK, M.E., Waters TR, Green ES, Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg.* 1982; 56: 106-113.
61. Kaptanoglu E. Strategies for neuroprotection after spinal cord injury. *Omurilik ve omurga cerrahisi.* 2002; 63: 813-32.
62. Kerr JFR, Currie AR, Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer,* 1972; 26 239-245.
63. Dumont RJ, Okonkwo DO, Hurlbert RJ. Acute spinal cord injury, Part I: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin. Neuropharmacology.* 2001; 24 (5): 254-264.
64. Diener PS. Fetal spinal cord transplants support growth of supraspinal and segmental projections after cervical spinal cord hemisection in the neonatal rat. *J Neurosci.* 1998; 18(2): 778-93.
65. Manel U, Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatoloji. *Medulla spinalis yaralanmaları,* 2000: 152-161.

