



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD İSKEMİSİNDE
GERANYLGERANYLACETON'UN İKİNCİL
HASARLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. SÜLEYMAN DAMGACI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Varol AYDIN

AYDIN-2010

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI

**DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD İSKEMİSİNDE
GERANYLGERANYLACETON'UN İKİNCİL
HASARLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. SÜLEYMAN DAMGACI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Varol AYDIN

AYDIN-2010

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim süresince her zaman bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım hocalarım Sayın Yrd. Doç. Dr. Varol AYDIN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Soner YAYCIOGLU'na şükranlarımı sunarım.

Tezimin tüm aşamalarında bana destek olan tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Varol AYDIN ve laboratuvar çalışmalarını yürüten sayın Prof. Dr. Çiğdem YENİSEY'e ve patoloji değerlendirme kısmını yürüten Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim METEOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Muharrem Balkaya ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Cengiz Ünsal ile Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Katkılarından dolayı karşılıklı sevgi ve saygı ile birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma ve bugüne kadar desteğini benden esirgemeyen eşim Zehra Damgacı'ya teşekkür ederim.

Dr. Süleyman Damgacı

İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar	III
Tablo dizini	IV
Şekil dizini	V
Resim dizini	V
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	2
Spinal Kord Embriyolojisi	2
Spinal Kord Anatomisi	2
Spinal Kordun Vasküler Anatomisi	5
Spinal Kord İskemisi	9
Spinal Kordun Vasküler Sendromları	10
Spinal Kord İnfarklarında Korunma ve Tedavi	10
Spinal Kord Hasarlanması ve Patofizyolojisi	11
Enflamatuvar Cevap	11
Apoptozis	12
HSP 70	13
Geranilgeranilaseton (GGA)	14
Gereç ve Yöntem	14
Gruplar	14
Anestezi	15
Cerrahi İşlemler	15
Patolojik İnceleme	17
Histopatolojik İnceleme (Skorlama)	17
İmmünoyokimyasal İnceleme	18
İstatistiksel İnceleme	19
Bulgular	19
HSP 70 Değerleri	19
TNF-Alfa Değerleri	20
İskemi ve Nekroz Alan Değerlendirilmesi	22
Tartışma	29

Sonuç	31
Özet	32
Summary	33
Kaynaklar	34

KISALTMALAR

AIF apoptoz indükleyici faktör

HE Hemotoksilen-Eozin

IL Interlökin

IL-1 interlokin 1

IL-6 interlokin 6

MCA orta serebral arter

MPO myeloperoksidaz

MPZ Metil Prednisolon

TABLO DİZİNİ

Tablo I: HSP 70 düzeyleri (ng/gr yaş doku)

Tablo II: TNF- α düzeyleri (pg/gr yaş doku)

Tablo III: Canlılık indeksi (canlı nöron / total nöron)

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Dura ve araknoid membran, subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin spinal kordten çıkışı ve ligamentum dentikulatumun görünümü (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter).

Şekil 2: Spinal kord, conus medullaris ve cauda equina'nın görünümü (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter).

Şekil 3: Spinal kordun arteriel dolaşımını sağlayan radiküler arter, anterior spinal arter ve posterior spinal arterin kesiti (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter)

Şekil 4: Anterior spinal arter, posterior spinal arter ve radiküler arter arasındaki anostomoz (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter)

Şekil 5. Spinal kordun venöz dolaşımı (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter)

Şekil 6. Venöz dolaşım (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter)

Şekil 7: HSP 70 düzeyleri (ng / gr yaş doku).

Şekil 8: TNF- α düzeyleri (pg/gr yaş doku).

Şekil 9: Canlılık indeksi canlı nöron / total nöron)

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Batın açıldıktan sonra aortun görünümü

Resim 2: Aortun klempe edilmesi

Resim 3: Spinal kord çıkarıldıktan sonraki görünüm

Resim 4: 1. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü

Resim 5: 2. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü

Resim 6: 3. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü .

Resim 7: 4. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü

Resim 8: 5. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü

GİRİŞ VE AMAÇ

Spinal kord infarktları, ateroskleroz, aort disseksiyonu, emboli veya vaskülit nedeniyle oluşabilir. Etiyolojik olarak spinal kord infarktları iyatrojenik olmayan, iyatrojenik venöz infarktlar ve spinal geçici iskemik ataklar olarak gruplandırılabilir. Spinal kordda infaktın en yaygın nedeni torako-abdominal anevrizma cerrahisinde oluşan aortanın aterom plakları olup vasküler malformasyonlar da hemoraji yanında kitle etkisi ile de iskemi oluşturabilirler (1,2,3).

Travma ya da iskemi sonucunda spinal kordda oluşan ilk hasar sonrasında ikincil hasarlanma birbirini takip eden olaylar zinciri şeklinde gelişmektedir. Spinal kordda gelişen ilk hasara karşı tedavi seçeneklerinin olmaması nedeniyle deneysel çalışmalar sıklıkla ikincil hasarlanmayı önlemeye ya da sınırlandırmaya yönelik olarak planlanmaktadır (4,5,6,7).

Spinal kord iskemisi ve infarklarında tedavi ve korunmaya yönelik yeterli bilgi mevcut değildir. Akut spinal kord infarklarında etkinliği kanıtlanmış bir tedavi yöntemi yoktur.

Travma ya da iskemiye bağlı spinal kordda hasarında farklı patofizyolojik mekanizmalar rol oynamaktadır. İlk yaralanmayı izleyen süreçte hipoksi ve iskemiye karşı fizyolojik yanıtlar ortaya çıkarken dokuda ikincil hasar gelişimine neden olacak mekanizmalar da devreye girer. Enerji yetmezliği nedeniyle hücresel fonksiyonlar bozulurken enflamatuar mekanizmalar ve apoptozis de doku hasarının artışına neden olur.

İskemik dokuda gelişen enflamatuar mekanizmalar içinde TNF-alfa önemli rol oynar. Dokuda artan TNF-alfa düzeyi enflamatuar yanıtı artırırken apoptoz mekanizmalarını da uyarır.

Moleküler şaperonlar olarak tanımlanan HSP'lerin hücrelerde stoplazma, mitokondri ve endoplazmik retikulumda buldukları saptanmıştır. Hücrelerin maruz kaldıkları çevresel faktörlere karşı bu proteinlerin doku koruyucu etkisi olduğu ve hücre metabolizmasının her evresinde rol aldıkları gösterilmiştir.

Geranylgeranylacetone (GGA), Japonya'da Selbex adlı bir antiülser ilaç olarak kullanılmakta olan bir kimyasal madde olup son yıllarda GGA'nın Heat Shock protein HSP-70 gibi birçok nöroprotektif proteinin üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Bu ajanın sitoprotektif etkileri olduğu da bilinmektedir. Travma ve iskemi gibi nöral doku hasarı olan durumlarda bu nöroprotektif etkinin tedavi amacıyla kullanılabilirliğine yönelik deneysel çalışmalar yapılmaktadır (7,8,9).

Bu çalışmada spinal kord iskemisinde iskemisinde GGA'nın nöroprotektif etkisini deneysel omurilik iskemisi modelinde araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

SPİNAL KORD EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonal gelişimin 3. haftasında embriyonun dorsal bölümünde primitif nokta ile membrana buccopharyngealis arasındaki ektoderm kalınlaşarak nöral plağı ve bu yapının üzerindeki sulcus neuralis'i oluşturur. Giderek derinleşen sulcus neuralis'i yanlarda sınırlandıran plica neuralisler nöral oluğun orta noktasından başlayıp kranial ve kaudale uzanan birleşme süreci sonunda birbiri ile kaynaşır ve tubus neuralis oluşur (10).

Plica neuralisin, dış yanını oluşturan hücreler tubus neuralise katılmayıp neuralis ile yüzey ektodermi arasında bir ektodermal hücre şeridini oluşturulur. Bu oluşan ektodermal şerite crista neuralis adı verilir (10).

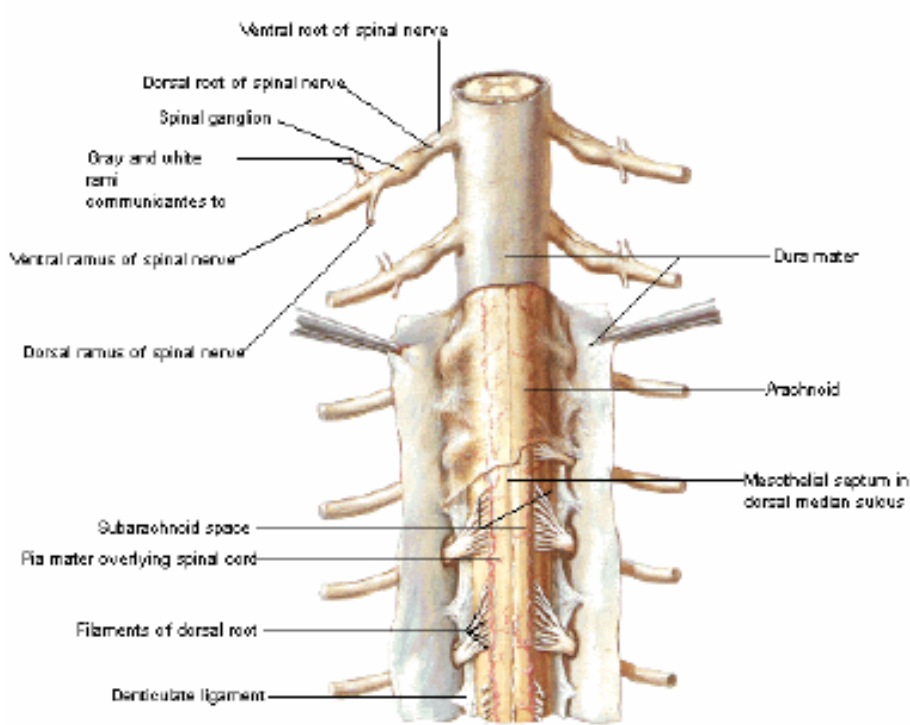
Crista neuralis hücreleri spinal ve kranial sinirlerin otonom ganglionları, duysal ganglionları, medulla suprarenalis hücreleri ve melanositlere farklılaşırken tubus neuralisin sefalik bölümü genişleyerek ön beyin, orta beyin ve arka beyin kesecikleri oluşur. Tubus neuralisin geri kalan bölümü çap olarak dar kalacak şekilde uzar ve spinal kord oluşturur (10).

SPİNAL KORD ANATOMİSİ

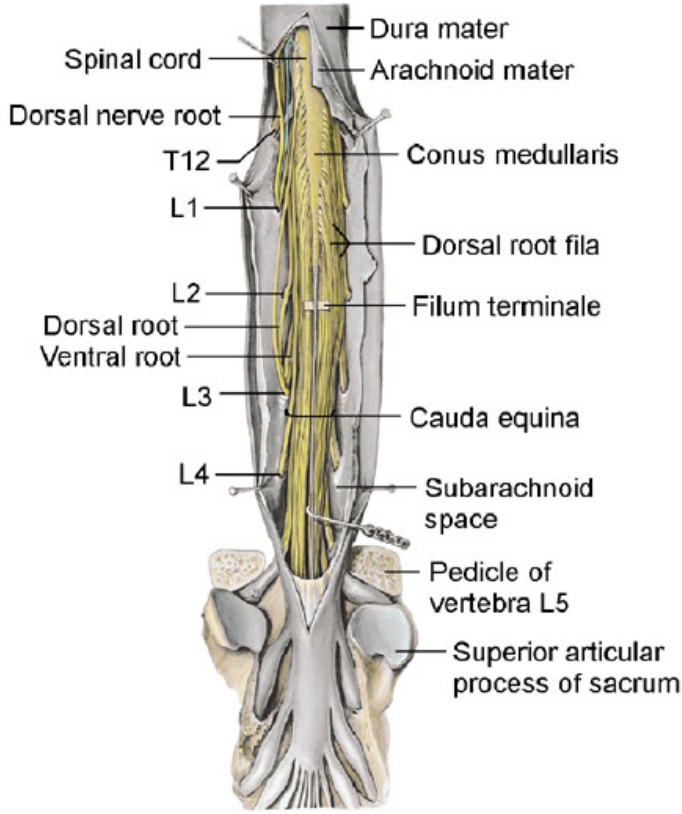
Ortalama uzunluğu 40-45 cm, ağırlığı ise 30-35 gr kadar olan spinal kord, atlas'ın üst kenarından L1-L2 vertebra düzeylerine kadar uzanıp en uç bölümü olan Conus medullaris ile sonlanır. Conus medullaris'in uç noktasından itibaren ince bir filaman şeklindeki filum terminale coccyx'in ilk kısmına kadar uzanıp buraya yapışır (11,12).

Spinal kord, dura, araknoid ve piamater'den oluşan üç meningeal zar tarafından çevrelenmiştir (11,12). Fibröz bir membran olan dura mater, spinal kord, conus medullaris ve cauda equina'yı içerecek şekilde S2 vertebra düzeyinde sonlanmaktadır. Dura vertebral kanalın duvarından gevşek yağ dokusu ve venöz pleksuslar içeren epidural boşlukla ayrılır. Araknoid membran, BOS içeren subaraknoid mesafe ile pia mater'den ayrılan ince, şeffaf bir membrandır. Spinal korda

yapışarak içe doğru ince septalar yollayan pia mater aynı zamanda ince bir bant olan ligamentum dentikulatımlar ile duranın iç kısmına bağlanmaktadır (Şekil 1, Şekil 2) (11).



Şekil 1: Dura ve araknoid membran, subaraknoid aralık, piamater, arka köklerin omurilikten çıkışı ve ligamentum dentikulatı görünümü (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD).



Şekil 2 : Spinal kordun sonlandığı kısım ve cauda equina (11)

Spinal kord üst servikal ve alt lomber bölgelerde genişlemeler gösterir, C4 ile Th1 arasındaki genişleme bölgesi olan intumescentia cervicalis'den brakial pleksusu oluşturan lifler çıkar. Th9 ile L1 arasındaki genişleme olan intumescentia lumbalis'den de lomber (L1-4) ve sakral (L4-S2) pleksusu oluşturan sinir kökleri çıkar (11,12)

Spinal kord'un enine kesitinde içte gri dışta da beyaz cevherlerden oluşan simetrik yapı izlenir. Gri cevherde hücre gövdeleri, nöroglialar, kan damarları ve bazı aksonlar bulunurken beyaz cevherde myelinli sinir lifleri, nöroglia, kan damarları yer alır. Spinal kordun ön kısmında fissura mediana anterior arka yüzünde sulcus mediana posterior izlenir. Önde iki taraflı sulcus anterolateralisler, arkada da iki taraflı sulcus posterolateralisler, sulcus mediana posterior ile sulcus posterolateralisler ön ve arka median sulkusların yanlarında bulunurlar. Sulcus posterolateralislerden arka kökler (duyu lifleri) spinal korda girerken sulkus anterolateralislerden ön kökler (motor lifler) spinal kordu terk eder (11,12).

Gri cevher, ortasında epandim hücrelerince sarılı santral kanalın çevresinde yer alan cornu anterior, cornu posterior ve cornu lateralis'lerden oluşur. Santral kanalın önünde comissura grisea anterior, arkasında da comissura grisea posterior olarak adlandırılan gri cevher alanları yerleşmiştir (11,12).

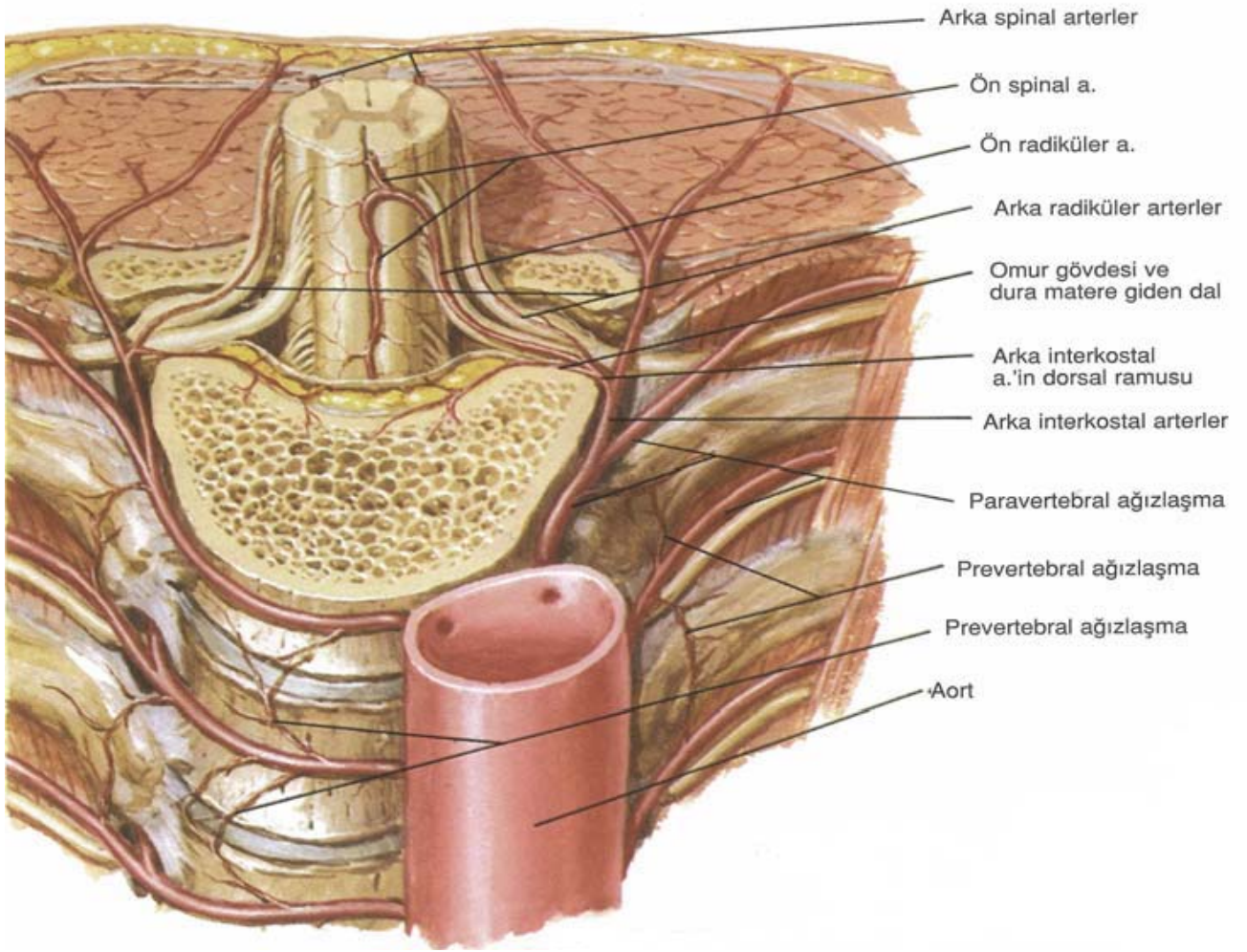
Funiculus posterior, funiculus lateralis ve funiculus anterior'dan oluşan beyaz cevher inen ve çıkan traktusları içerir. Spinal kanala posterolateral sulcus'lardan giren aferent duyu yolları santral kanalın önündeki comissura alba anterior'da çaprazlaşarak karşı spinotalamik traktusa katılırlar (11,12).

SPİNAL KORDUN VASKÜLER ANATOMİSİ

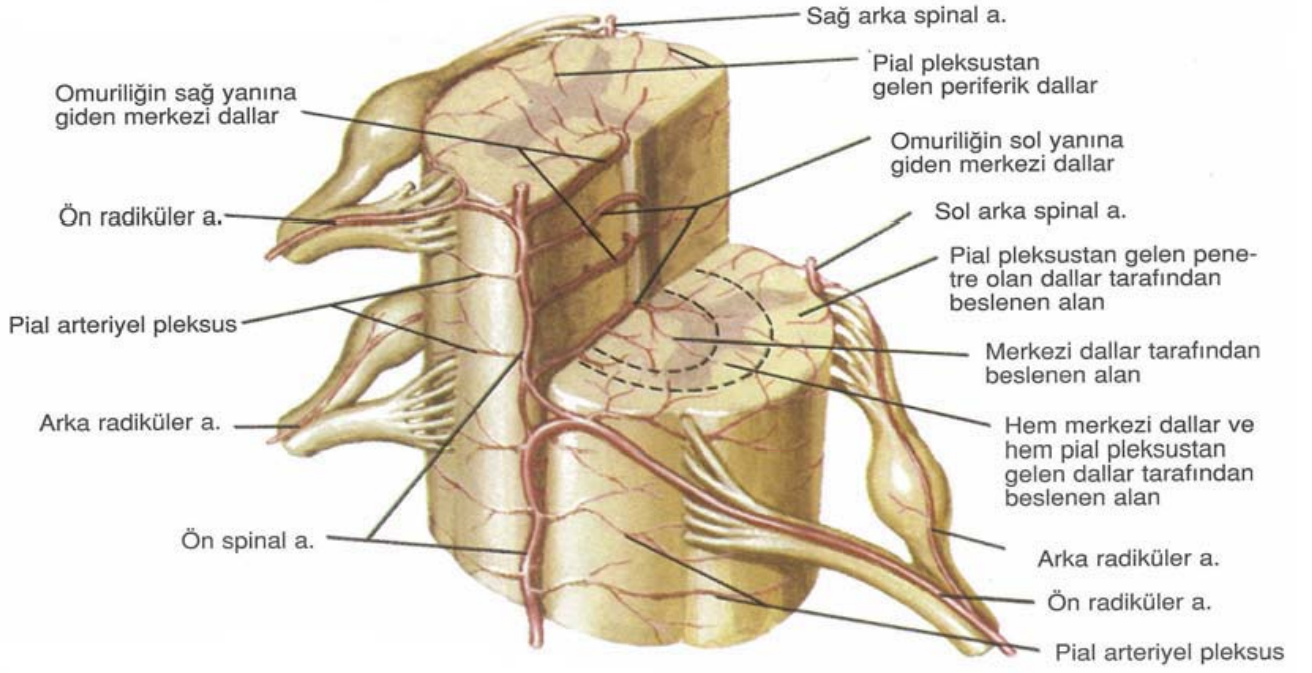
Spinal kord vertebral arter ve aorttan gelen dallarla beslenir. Vertebral arterden çıkan anterior spinal arter spinal kordun ön yüzünde fissura mediana anterior'a yerleşik olarak spinal kord boyunca uzanıp cauda equina ve filum terminalde dağılan ince dallarla sonlanır. Posterolateral sulkuslar boyunca iki taraflı olarak aşağıya inen posterior spinal arterler ise ve radiküler arterlerin posterior dalları ile anastomozlar oluştururlar (3,12,13,14).

Radiküler arterler ise her segmentte intervertebral foramenden spinal kanal içine girerek özellikle spinal kordun orta torakal bölümünden itibaren spinal arterlere ek olarak spinal kordun beslenmesine katkıda bulunur (3,12,13,14). Spinal kordun her segmentinde ait anterior ve posterior radiküler arterler izlenir. Radiküler arterler segmental olarak vertebral arter, inferior tiroideal arter, asendan servikal arter, interkostal arter, arteria iliolumbalis ve sakral arterlerden kaynaklanırlar. Posterior radiküler arterlerden daha geniş çaplı olan anterior radiküler arterlerin en büyüğü genellikle T9-L2 düzeyleri arasında sol interkostal arterden kaynaklanır ve arteria radicularis anterior magna (Adamkiewicz arteri) olarak tanımlanmıştır (3,12,13,14).

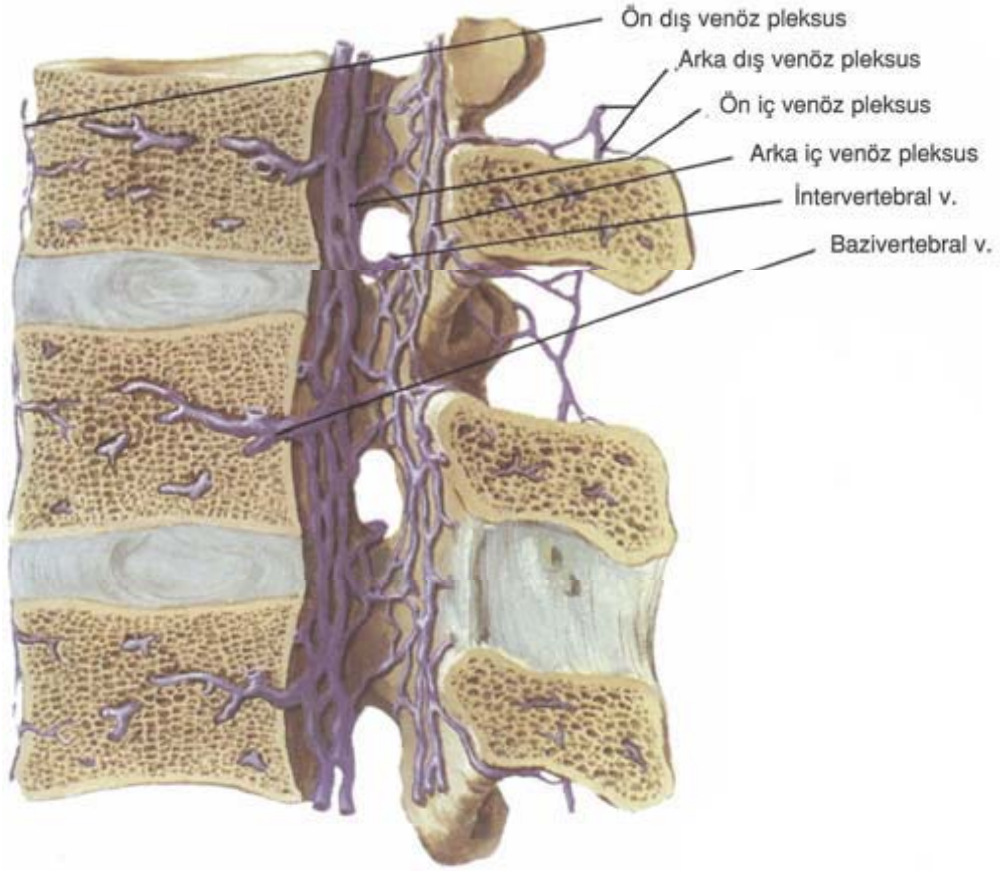
Spinal kordun venöz drenajı longitudinal, radiküler ve intervertebral venler aracılığı ile olur. Longitudinal venler üst uçta, internal juguler ven ve vertebral ven yoluyla vana cava superiora dökülürken intervertebral venler internal vertebral venöz pleksus ve eksternal vertebral venöz pleksusa katılıp azigos veni aracılığı ile superior ve inferior vana cava'ya dökülürler (3,12,13,14). Spinal kordun arteriyel dolaşımı şekil 3 ve 4'te, venöz dolaşımı ise şekil 5 ve 6'de gösterilmiştir (Interactive atlas of human anatomy F.Netter M (14,15)



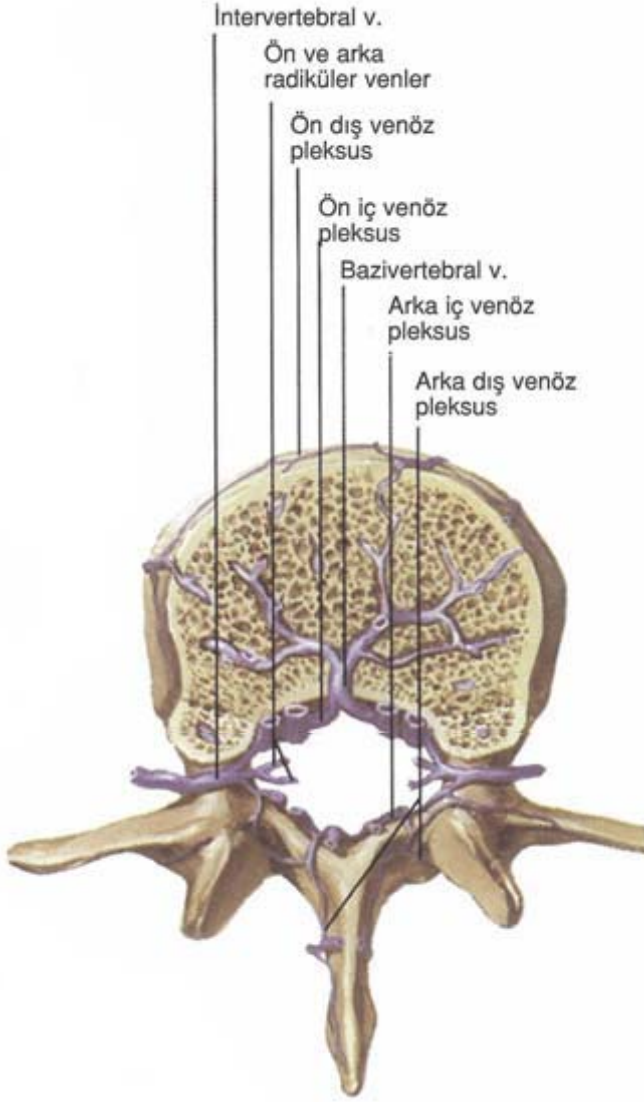
Şekil 3: Spinal kordun arteriel dolaşımını sağlayan radiküler arter, anterior spinal arter ve posterior spinal arterin kesiti (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD (14,15))



Şekil 4. Anterior spinal arter, posterior spinal arter ve radiküler arter arasındaki anastomoz (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD) (14,15)



Şekil 5. Spinal kordun venöz dolaşımı(Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD) (14,15)



Şekil 6. Venöz dolaşım; Biri dış diğeri iç iki pleksus tüm omurga boyunca uzanır, aralarında serbestçe anastomozlu oluştururlar. (Interactive atlas of human anatomy, F.Netter MD) (14,15).

SPİNAL KORD İSKEMİSİ

Spinal kord iskemisi ateroskleroz, aort disseksiyonu, emboli, vaskülit ve travma gibi patolojiler sonucunda gelişebilir (1,2,3). Spinal kord iskemisinin en sık nedenleri olan torako-abdominal anevrizma operasyonlarında % 4-30'unda ve aort disseksiyonunu cerrahisinde %40 kadar yüksek oranlarda spinal kord iskemisi geliştiği görülebilir (1,2,3). Spinal kordun venöz infarktları arteriyel infarktlara göre daha az sıklıkla gözülür (1,3).

Spinal Kordun İskemik Vasküler Sendromları

Anterior spinal arter sendromu: Spinal kordun ön 2/3'ünün tutulduğu ve 1/3 posteriorunun korunduğu akut iskemik miyelopati tablosudur. Spinal infarktların en sık görülen tipi olup ani olarak parestezi ve şiddetli ağrı, parapleji ya da tetrapleji ile birlikte lezyon seviyesinin altında refleks kaybı ve otonomik disfonksiyon gelişimi ile seyreder. Motor güç kaybı, ağrı ve ısı duyusu kaybı yanı sıra mesane ve rektum fonksiyonları bozulur (1,3,16).

Posterior spinal arter sendromu: Nadirdir, sıklıkla bu bölgenin yoğun kanlanması nedeniyle güç tanınır. İnfarkt arka traktusları ve arka boynuzları ve lateral piramidal traktusu etkileyeceğinden. omurga boyunca ağrı ve bacaklarda parestezi veya dizestezi izlenir. Lezyon seviyesinin altında anestezi ve analjezi spastik paraparezi ve refleks bozuklukları izlenebilir. Oluşan kuvvet kaybı anterior spinal arter vakalarında olduğu ağır seyretmez (1,3,16).

Spinal kordun transvers infarktı: Spinal apopleksidir. Bu sendromda lezyon seviyesinin altında flask paralizi ve duyu kaybıyla birlikte sfinkter disfonksiyonu mevcuttur. Radiküler arterlerin beslenme alanındaki tıkanmaya bağlıdır. Motor paralizi spinal veya radiküler tarzda infarkt olan seviye ile ilişkili olarak akut ağrı olur. Ağrı hızlı bir şekilde azalır ve tendon refleksleri ve karın cildi refleksleri kaybolur. Spinal şok devresi geçtikten sonra piramidal bulgular ortaya çıkar (1,3,16).

Santral kord infarktı: Anterior ve posterior spinal arterlerin kanlanmasını sağladığı bölgelerin keşişiminde gelişen iskemi bu tip infarktı oluşturur. Kliniği anterior spinal arter sendromuna benzer (1,3,16).

Venöz infarktlar: Arteriyel infarktın neden olduğu klinik tabloya benzeyen bir çok özellik gösterirler. Sınırı belli olmayan kısmi motor ve duyu kaybı görülür. Tabloya mesane ve bağırsak paralizisi eklenir. Daha çok hemorajik tarzda seyrederler (1,3).

SPİNAL KORD İNFARKTLARDA KORUNMA VE TEDAVİ:

Spinal infarktlarda primer veya sekonder korunmaya yönelik yeterli bilgi mevcut değildir. Fakat abdominal cerrahi sırasında gelişen iyatrojenik spinal kord infarktlarını engellemek için yeterli bilgi mevcuttur. Özellikle ameliyat sırasında hipotansif ataklardan korunmak önemlidir. Hipotermi koruyucu etkisi vardır. Kötü cerrahi koşullar ve uzamış aort klemleme süresi de bu riski artırır (1,3).

Somatosensoriyal uyarılmış potansiyellerin cerrahi sırasında kullanılması ameliyat sırasında iskemik harabiyetin oluşma riskini azaltacaktır. Alt ekstremitenin

iskemisi sıklıkla yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir. Epidural uyarılmış potansiyel güvenli bir monitorizasyon sağlar. Epidural soğutma yönteminin torako-abdominal anevrizma cerrahisinin olası komplikasyonlarını azaltabilir (1,3).

Akut spinal kord infarklarının kabul görmüş bir tedavisi mevcut değildir. Akut dönemde nedenin tedavisi oldukça önemlidir. Antikoagülanların, yüksek doz steroidlerin (MPZ) kullanılması, kordun revaskülarizasyonu, opiat antagonistleri ve sempatektomi uygulanabilir, Ancak bunların akut durumlardaki rolü tam bilinmemektedir. Deneysel olarak yararlılığı gösterilmiş olan nöroprotektif ajanların klinik faydası henüz tam gösterilmemiştir. Diğer nöroprotektif yöntemlerin aort cerrahisi sırasında kullanılmasının akut spontan infarkt gelişimindeki önemi büyüktür ve gösterilmiştir. Deksametazon ve ürokinazın arteriyel kullanımının yararlılığı mevcuttur. (1,3).

SPİNAL KORD HASARLANMASI VE PATOFİZYOLOJİSİ:

Spinal kord iskemisi vasküler patolojilerin yanı sıra spinal kord travması sonrasındaki sekonder hasarlanma nedeniyle de gelişebilmektedir. Primer yaralanmayı izleyen süreçte hipoksi ve iskemiye karşı fizyolojik cevapları içine alır. Sistemik hipotansiyon, hasarlı spinal kordda kan akımı kaybı, serbest radikaller ve lokalize ödem sürece katkıda bulunur. Bu süreçteki spinal kord hasarının en önemli nedeni enerji yetersizliğidir. Bunun erken dönemdeki başlıca nedeni bozulmuş perfüzyona bağlı oluşan iskemidir (4,5,7,11). Enerji yetmezliği sonucunda Na–Ca değişimci pompa mekanizması bozulur ve hücre içinde biriken Ca²⁺ fosfolipazları ve proteazları aktive eder. Fosfolipazların hücre membranını yıkmaları sonucunda ortaya çıkan araşidonik asitin siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerince yıkılması ile prostaglenler ve lökotrienler oluşur. Vazojenik ve enflamatuar özelliği olan PG ve LT'ler kan akımı azaltıp geçirgenliği artırır. Ca²⁺ hücre içinde daha fazla birikmeye başlar ve hasar döngüsü devam eder.

Enflamatuar Cevap

İskemiyeye bağlı spinal kord hasarının gelişimi ve sınırlanmasında enflamatuar mekanizmaların rolü önemlidir. Yaralanma ve iskemi bölgesinde saatler içinde başlayan enflamatuar cevap ilk 72 saat içinde en üst düzeye ulaşarak PMNL ve granülositik hücreler birikimine neden olur. Oluşan enflamatuar cevap, endotel yaralanması, enflamatuar mediatörlerin salınımı, endovasküler geçirgenliğin artışı,

ödem, periferel enflamatuar hücrelerin iskemi bölgesine göç etmesi ve mikrogliaların aktivasyonu ile devam eder. Granülositik hücrelerden salgılanan enflamatuar mediatörler olan prostaglandinler, lökotrienler, bradikinin, PAF ve serotonin enflamasyon ve hasar sürecini hızlandırır(4,5,7). İskemik yaralanma bölgesindeki enflamasyon hücrelerinin birikmesi sonucunda proteazlar ve serbest oksijen radikalleri miktarında da artış görülür. Özellikle oksidatif bir enzim olan Myeloperoksidaz (MPO) miktarındaki aşırı artışı spinal kord nöronlarının hücre membranında hasar oluşturur (7,17).

TNF-alfa, monositler, makrofajlar ve T hücrelerinden sentezlenen bir sitokindir. Yaralanma, iskemi ve reperfüzyon kompleman sistemini aktive ederek proenflamatuar komponentlerin oluşumuna neden olur. Bu komponentler TNF-alfa, IL-1 ve IL-6 oluşumunu uyararak enflamatuar cevabı artırır. TNF-alfa salınımındaki artış hızlı ve kısa sürelidir, yarı ömrü 15-18 dakika olup dokudaki miktarı 4 saat içinde ölçülmeyecek düzeye iner. Diğer taraftan TNF –alfa, doku hasarı sürecinin bir başka aşaması olan apoptoz mekanizmalarını da uyarır (7,18).

Apoptozis

Apoptozis, yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş ya da genetik hasarlı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Yunanca'daki apo (ayrı) ve ptosis (düşmek) köklerinden türetilen terim ilk kez patolog Kerr ve Ark. Tarafından 1972 yılında kullanılmıştır (4,5,7,19). Kerr apoptozisi fizyolojik olarak ölen hücrelerde çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını görerek büzüşme nekrozu olarak tanımlamıştır (7,20).

Apoptosis embriyonal fetal gelişimde, immün reaksiyonlarda, yaşlılıkta, hücre hasarlanması durumunda, hormon yetersizliğine bağlı involüsyonda, dokularda hücre homeostasisinde izlenir. Genetik olarak kontrol edilir ve fizyolojik mekanizmalarla regüle edilmektedir (4,7,20,21,22,23).

Apoptozisin üç farklı yol ile başlatıldığı gösterilmiştir (4,5,7,18). Birinci yol, hücre üzerinde yer alan TNF-Reseptörlerinin aktiflenmesi ile başlar. Bu reseptörlerin uyarımı prokaspaz-8 gibi kaspazları aktive eder. İkinci yol, mitokondri kaynaklı sitokrom c'nin apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ile birleşmesi sonucunda prokaspaz-9'un aktivasyonunu içerir. Süreç prokaspaz-3'ün aktivasyonu ile devam eder. Kaspaz-3 ve nöron kökenli kalpain özellikle mitokondrial kaynaklı hücre

ölümünde rol oynarlar (4,7,18,20). Üçüncü yolda ise endoplazmik retikulum kaynaklı prokaspaz-12'nin Ca^{+2} ve kalpain ile aktiflenmesi sonucu başlar (4,7,18,20).

Apoptozis kontrolünde bcl-2 protein ailesi önemlidir. Bu proteinler arasında yer alan bax ve bad proteinleri gibi bazıları apoptotik aktiviteye sahipken bcl-2 gibi diğerleri antiapoptotik (hücre koruyucu) proteinlerdir.

Apoptozis sürecinde aktivatör rol oynayan kaspazlar bcl-2 proteinleri tarafından aktive ya da inhibe edilirler (7,18,20,21,24,25).

Bcl-2 ailesi içinde yer alan bcl-2 proteini güçlü bir apoptozis inhibitörü olup mitokondri kaynaklıdır ve mitokondriden sitokrom c salınımını engeller (5,7,18,20, 26). Bcl-2 aynı zamanda mitokondri ve transloke olmuş nükleusdan salınan apoptoz indükleyici faktör (AIF)'ün apoptozisi tetikleme mekanizmasını inhibe eder (7,18,21, 26).

HSP 70 (Isı Şok Proteini 70)

Moleküler şaperonlar olarak bilinen ısı şok proteinlerinin bir üyesidir (7,27,28). Hücrelerin stoplazmalarında, mitokondrilerinde ve endoplazmik retikulumlarında buldukları gösterilmiştir (7,27). HSP'ler, hücre içindeki lokalizasyonlarına, molekül ağırlıklarına ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılırlar (7,28,29).

Moleküler şaperonlar, ortak özellikleri hücrelerin ani sıcaklık değişiklikleri, anoksi, reaktif oksijen metabolitleri ve glukoz düzeylerinde değişiklik gibi çevresel faktörlere maruz kaldıkları zaman üretilen bir grup proteindir. Oksidasyon ve toksik bileşenlerin parçalanması gibi faktörler hücrelerde şaperon proteinlerinin sentezine neden olur. Artmış şaperon protein seviyeleri mRNA sentezine ve stabilitesine olanak sağlar. Bu proteinler büyüme, farklılaşma, bölünme ve hücre ölümü dahil hücre metabolizmasının tüm evrelerinde rol oynarlar (7,27,28).

HSP-70 sadece protein yapılarının korunmasında değil, apoptozis ve enflamasyon cevabı üzerinde de rol oynar (7,18). HSP-70'in kaspazlarla aktive olan apoptozis sürecinde Apaf-1'e bağlanıp prokaspaz-9'un aktive olmasını engelleyerek anti-apoptotik etki gösterdiği, ayrıca bcl-2 düzeyini artırarak kaspaz bağımsız yolda da antiapoptotik etkisinin olduğu bildirilmiştir (18,28,30).

Diğer taraftan HSP 70'in inflamatuvar cevapta rol oynayan makrofaj ve monositlerden TNF-alfa salgılanmasını azalttığı gösterilmiştir (31).

GERANİLGERANİLASETON (GGA)

Japonya'da ülser ilacı olarak kullanılan bir acyclic isopronoid'dir (7,8,9). Bu etkinliği dışında GGA'nın bağırsaklar, karaciğer, kalp, retina ve sinir sisteminde HSP 70 salınımını arttırdığı gösterilmiştir (7,9).

GGA'nın deneysel serebral iskemi çalışmaları serebral dokuda HSP 70 düzeyini arttırdığı ve nekroz boyutunda azalma yaptığı bildirilmiştir (7,30,32).

Bu çalışmada yaralanma ya da iskemi sonrasında dokuda HSP 70 düzeyini arttırması nedeniyle enflamatuvar mekanizmalar ve apoptozis üzerinde etkili olabileceği ve nöroprotektif etkinlik gösterebileceği öngörüsü ile GGA'nın akut deneysel spinal kord iskemisinde ikincil hasarlanma üzerine olan etkileri incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan deneyleri Yerel Etik Kurulundan alınan 05.02.2009 tarih ve B302ADÜ.0.06.000/124-HEK/2009/002 sayılı onay ile Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Labaratuvarında üretilmiş, 6 – 8 haftalık erkek Wistar Albino cinsi ratlar kullanıldı ve ratlar 150 – 200 gr ağırlığında olacak şekilde seçildi.

Deney başlamadan 5 gün önce tüm gruplardaki ratlar aynı diyetle beslendi ve aynı odada tutuldu. Çalışmada kullanılan ratlar bir gün önceden aç bırakıldı.

Çalışma her birinde altışar rat bulunan 5 grup hayvan üzerinde yapıldı Gruplar rastgele seçilen ratlardan aşağıdaki şekilde oluşturuldu.

Gruplar:

1.Grup: Kontrol grubu Spinal kordda. iskemi oluşturulmadı 24 saat sonra denekler sakrifiye edildi laminektomi yapılarak spinal kordu çıkarıldı.

2.Grup: İntra-peritoneal 200 mg/kg GGA uygulandı. iskemi oluşturulmadı, 24 saat sonra denekler sakrifiye edildi ve spinal kordu çıkarıldı.

3.Grup: Spinal kord iskemisi oluşturulmadan 2 saat önce intra-peritoneal olarak 200 mg/kg GGA verildi. GGA verildikten 2 saat sonra iskemi oluşturuldu, 24 saat sonra denekler sakrifiye edilerek, spinal kordu çıkarıldı.

4.Grup: Spinal kordda iskemi oluşturuldu, 2 saat sonra intraperitoneal 200 mg/kg GGA uygulandı, 24 saat sonra denekler sakrifiye edilerek spinal kordu çıkarıldı.

5.Grup: Spinal kordda iskemi oluşturuldu, GGA verilmedi. 24 saat sonra denekler sakrifiye edilerek omurilikleri çıkarıldı.

Anestezi

Çalışmada kullanılan ratlar bir gün önceden aç bırakıldı. Cerrahi öncesi ratlara intraperitoneal olarak *IM 10 mg/kg Xylazin (Rompun)* ve *20 mg/kg Ketamin (Ketalar)* uygulandı anestezi sağlandı.

Cerrahi işlemler

Spinal kord iskemisi oluşturulmayan gruplar

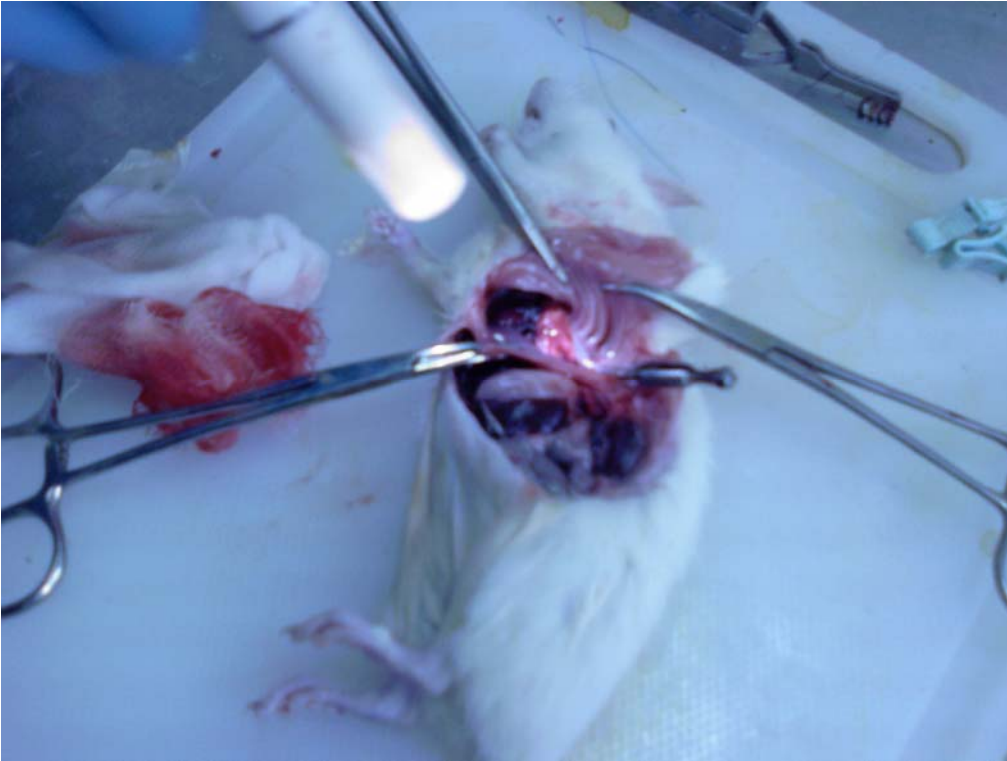
Ratlar yüksek doz eter anestezisi ile sakrifiye edildikten sonra prone pozisyonunda operasyon masasına yatırıldı. Th10 – L3 düzeyi arasında cilt insizyonunu sonrası Th10- L3 düzeylerine total laminektomi ve bilateral fasetektomi yapıldı. Bu düzeyde spinal kord tamamen görülecek şekilde ortaya çıkarıldı ve eksize edildi. Çıkarılan spinal kord iki eşit parçaya bölündü. Parçalardan birisi patolojik inceleme için % 10'luk formaldehit içine konuldu. Diğer parça immünobiyokimyasal çalışma için saklama kabına konuldu ve derin dondurucuya yerleştirildi.

Spinal kordda iskemi oluşturulan gruplar

Ratlar seçildikten sonra supin pozisyonunda operasyon masasına yatırıldı. Operasyon sahası batıkonla temizlendi Deneklere orta hat laparotomisi yapıldı. Ciltaltı ve periton geçildi. Karaciğer dalak ve mide ekarte edilerek diyafragmanın hemen altındaki seviyede abdominal aorta ortaya çıkarıldı. Aort vasküler klemple kapatılarak 10 dakika süre ile iskemi oluşturuldu. Operasyon sonrası batın anatomik plana uygun olarak kapatıldı.



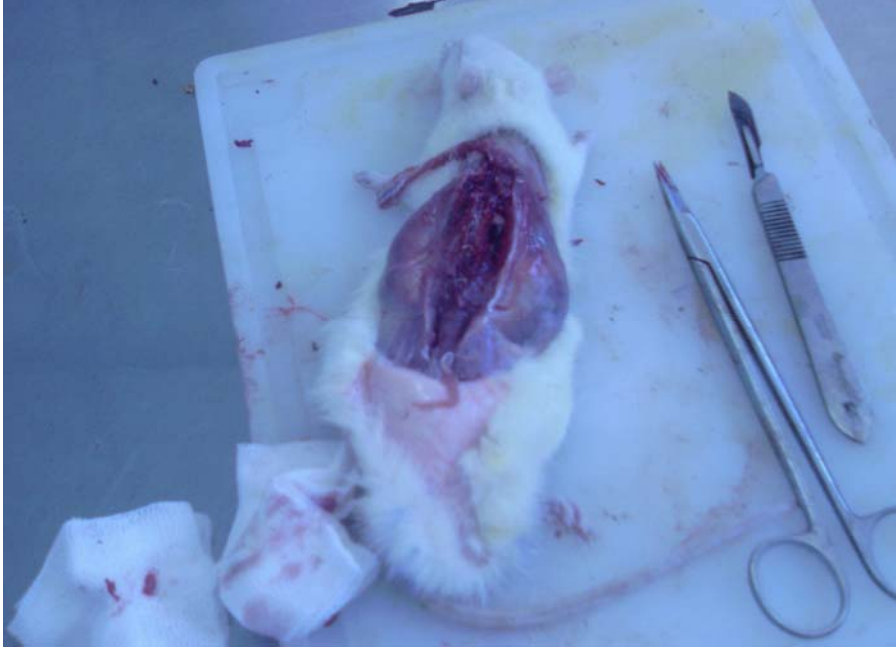
Resim 1: Batın açıldıktan sonra aortun görünümü



Resim 2: Aortun klempe edilmesi

Denekler ikişer saat aralarla 6 saat süre ile takip edildi. 24 saat sonra yüksek doz eter anestezisi altında sakrifiye edilerek Th10- L3 düzeyine total laminektomi ve bilateral fasetektomi yapıldı. Bu düzeyde spinal kord eksize edilerek çıkarıldı.

Çıkarılan spinal kord iki parçaya bölündü. Parçalardan birisi patolojik inceleme için % 10'luk formaldehit içine konuldu. Diğer parça immünoyokimyasal çalışma için saklama kabına konuldu ve derin dondurucuya yerleştirildi.



Resim 3: Spinal kord çıkarıldıktan sonraki görünüm

Patolojik inceleme

Patolojik inceleme Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalında yapıldı. İnceleme için tüm dokular %4'lük formalin ile 24 saat tespit edildi. Sinir dokusu olduğu için dik kesitler alındı ve dik olarak bloklandı. Doku takip cihazında rutin takip yapıldı. Daha sonra parafin bloklara gömülen dokulardan doku bitene kadar atlamalı 10'ar kesit alındı. Bunun için traşlama sonrası 4 µm'lik 10 kesit alınarak, 10 µm traşlama ile 10 kesit atılarak tekrar 4 µm'lik 10 kesit alındı. Böylece tüm doku örneklendi. Tüm kesitler HE ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX51, Japan) incelendi.

Histopatolojik İnceleme (Skorlama)

Th10-L3 segmenti uyan spinal kanalın distal ve kaudal kısımlarından elde edilen 4 µm kalınlıkta kesitler fiske edilerek hemotoksilen-eozin ile boyandı ve ışık mikroskobu ile incelendi. En çok ölü nöron içeren kesitler bulunarak (hotpoint) bu alandaki tüm nöronlar sayıldı. Spinal kordun ön boynuzundaki hücrelerdeki hasarlanmaya bakıldı. Bunun için eozinofilik sitoplazma ve nükleusunu kaybetmiş hücreler iskemik hasarlanmaya bağlı ölü nöronlar olarak kabul edildi. Sitoplazmik

nissle bodies içeren, ince kromatine sahip ve nükleolusları belirgin hücreler canlı olarak kabul edildi. Her spinal kord kesitindeki nöronlar incelenip canlı nöronların total nöronlara oranı bulunarak viability index hesaplandı.

(Viability İndeks: Canlı nöron sayısı / total nöron sayısı).

İmmünobiyokimyasal inceleme

İmmünobiyokimyasal inceleme Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.

Doku örneklerinin hazırlanması:

Doku örnekleri alındıktan sonra derin dondurucuda (-85 °C) homojenize edilesiye kadar saklandı. Doku örnekleri derin dondurucudan çıkartıldıktan sonra kit içinden çıkan ekstraksiyon çözeltisi ile 4°C (B. BRAUN, Germany) ile 30 saniye/1500 rpm'de homojenize edildi. Ekstraksiyon çözeltisine homojenizasyondan önce, proteaz inhibitörleri eklendi (0,1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptin, 1 µg/mL aprotinin, 1 µg/mL pepstatin). Homojenizasyondan sonra, örnekler 14.000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika santrifüj edildiler. Üstteki süpernatant ependorflara alındı ve parametrelerin tayininde kullanıldı.

TNF – Alfa düzeyinin Saptanması;

Örneklerdeki TNF- α düzeyleri IBL (Hamburg, Germany) firmasına ait ticari kit (Kat. No. BE45471) ile saptandı. Sonuçlar, ELISA okuyucusunda (ELX 800) otomatik olarak çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Sonuçlar pg/gr yaş doku olarak verildi.

HSP 70 düzeyinin saptanması;

Örneklerdeki Hsp70 düzeyleri Assay Designs (5777 Hines Drive, Ann Arbor, MI 48108 USA) firmasına ait StressXpress Hsp70 ELISA ticari kiti ile çalışıldı (Kat. No. EKS-700B, Lot No. 01120710). Sonuçlar, ELISA okuyucusunda (ELX 800)

otomatik olarak çizilen kalibrasyon eğrisinden hesaplandı. Sonuçlar ng/gr yaş doku olarak verildi.

İstatistiksel inceleme

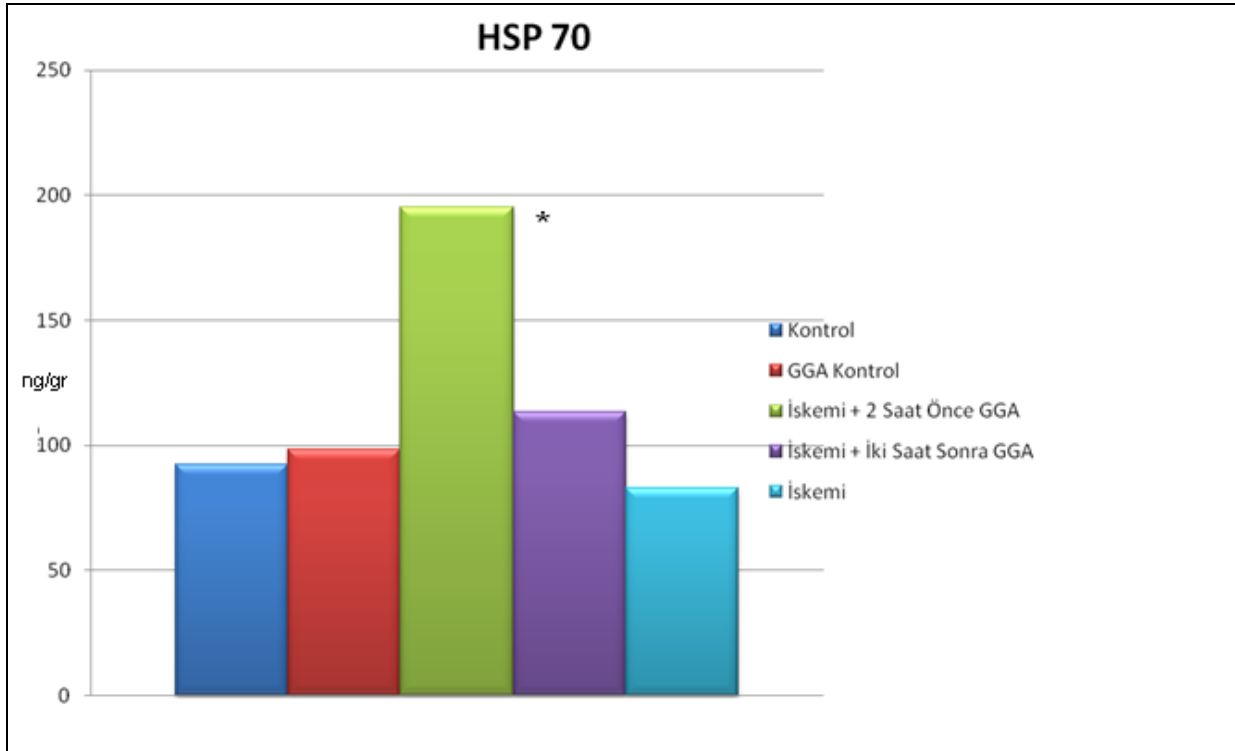
Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 13.0 paket programı kullanıldı. Veriler tek yön varyans analizi ile değerlendirildi ve post hoc test olarak Duncan testi kullanıldı.

BULGULAR

TNF- α , HSP 70 ve Vİ açısından girişimin etkisinin gruplar arasında sırasıyla ($p=0,012$, $p=0,001$ ve $p=0,000$) düzeyinde önemli olduğu saptandı.

HSP 70 DEĞERLERİ

HSP 70 değerleri için yapılan değerlendirme sonucunda iskemi oluşturulan ve iki saat öncesinde GGA alan grubun diğer gruplardan ($p=0,001$) düzeyinde anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 7).



Şekil 7: HSP 70 düzeyleri (ng / gr yaş doku).

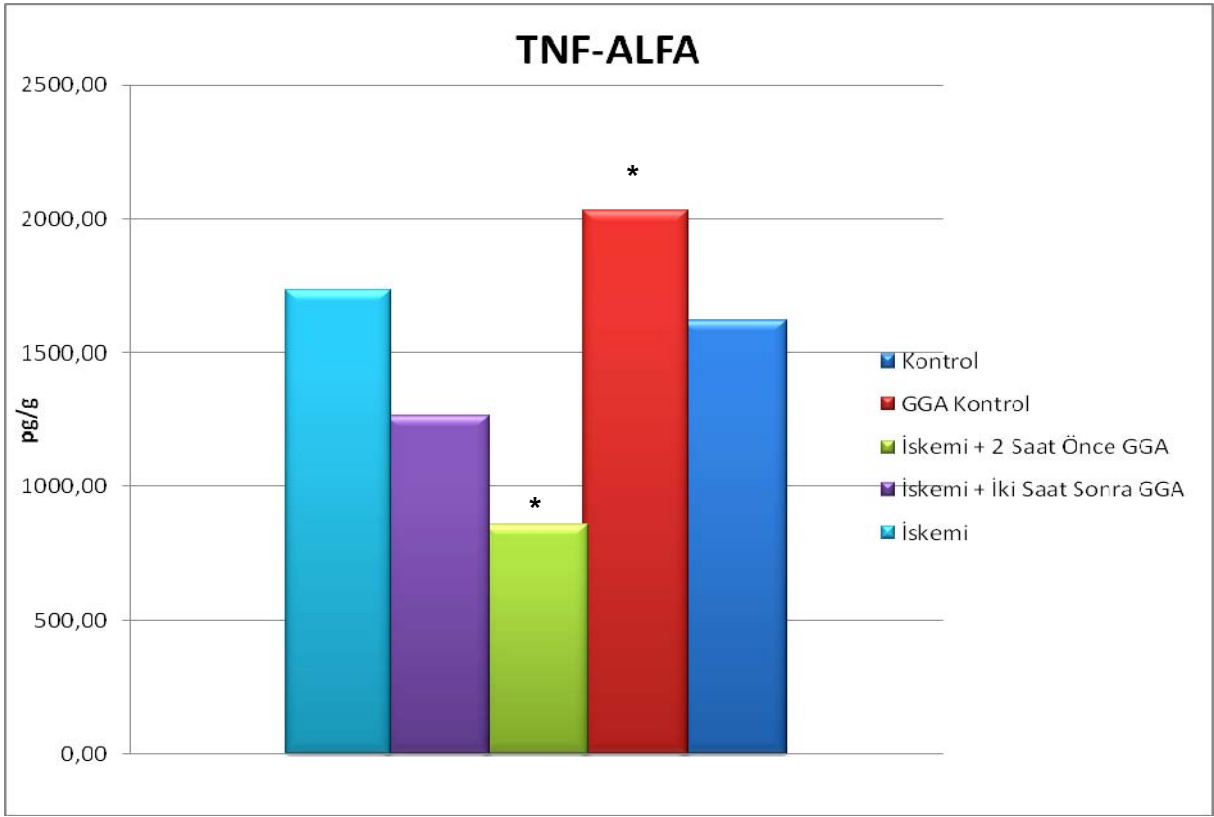
* işareti taşıyan sütun diğerleriyle anlamlıdır ($p=0.001$).

Tablo I: HSP 70 düzeyleri (ng / gr yaş doku)

Gruplar	HSP 70 Min- Max X ± SD
Kontrol	59,69 - 149,81 92,31 ± 33,04
GGA Kontrol	57,46 - 162,08 98,33 ± 34,79
İskemi + 2 Saat Önce GGA	121,36 - 317,56 195,49 ± 74,33
İskemi + İki Saat Sonra GGA	48,33 - 154,30 113,43 ± 35,23
İskemi	74,41 - 92,76 82,95 ± 33,04

TNF-ALFA (Tümör Nekroz Faktör – Alfa) DEĞERLERİ

TNF α değerlerinin diğer gruplar ile karşılaştırıldığında, iskemi oluşturulan ve iki saat öncesinde GGA verilen grupta düşük olduğu ve GGA verilen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir anlamlılığın olduğu ($p=0,012$) görülmektedir. Yine TNF- α ' nın iskemi sonrası ikinci saatte GGA verilen grupta iki saat önce GGA alan gruba benzer şekilde düşük düzeylerde kaldığı ancak bunun istatistiksel olarak onaylanmadığı görüldü ($p=0,057$, %95 CI:-21,1872 – 1908,0837) (Şekil 8).



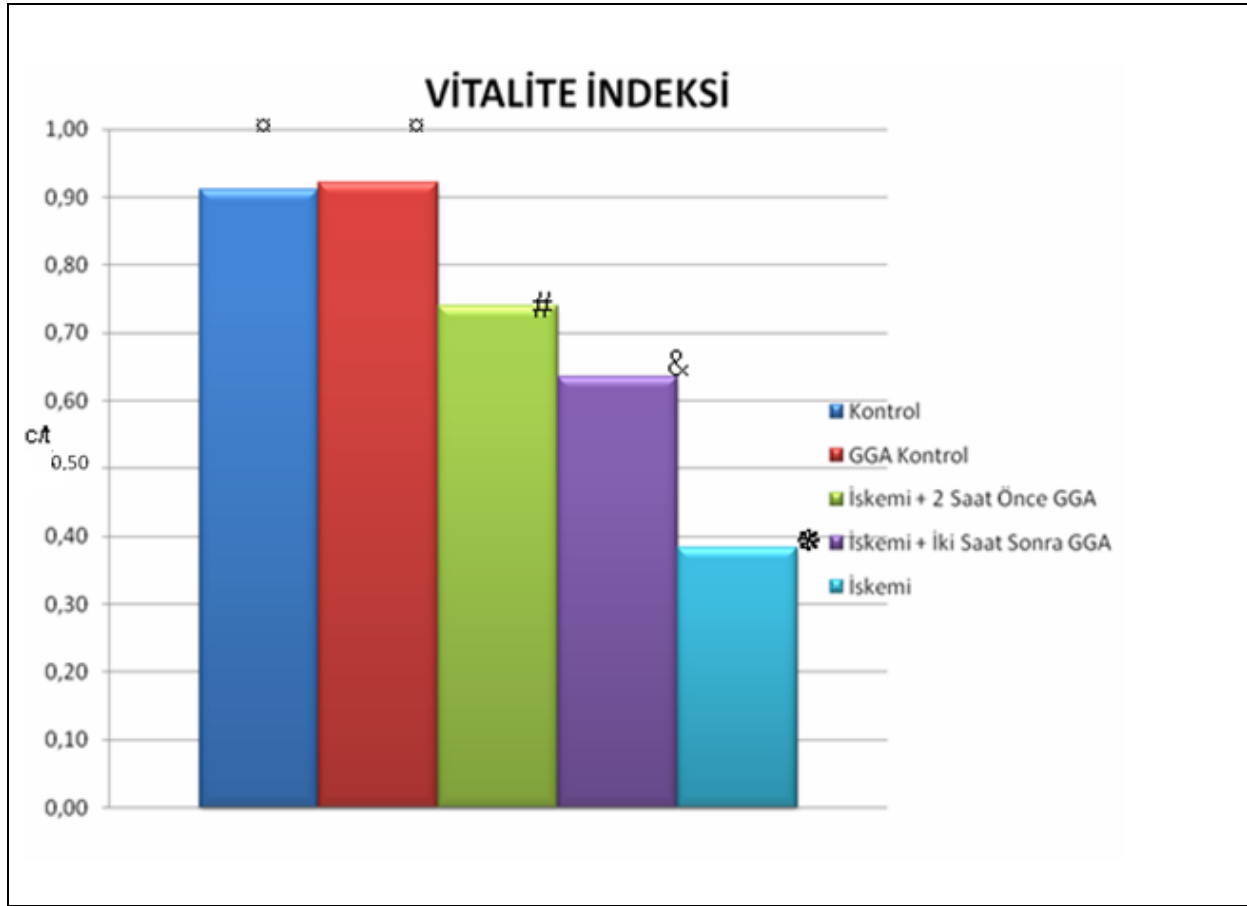
Şekil 8: TNF- α düzeyleri (pg/gr yaş doku). *; İşareti taşıyan gruplar birbiriyle anlamlıdır (p=0,012).

Tablo II: TNF- α düzeyleri

Gruplar	TNF- α Min- Max X \pm SD
Kontrol	1216,79 – 2323,06 1620,53 \pm 477,89
GGA Kontrol	849,96 -2867,57 2033,77 \pm 667,02
İskemi + 2 Saat Önce GGA	495,96 -1107,58 858,69 \pm 225,43
İskemi + İki Saat Sonra GGA	235,79 -1842,88 1090,32 \pm 634,62
İskemi	438,28 –2555,93 1559,96 \pm 700,96

İSKEMİ VE NEKROZ ALAN DEĞERLENDİRİLMESİ

VÍ açısından bulgular değerlendirildiğinde kontrol grubu ve GGA alan iskemi oluşturulmayan grubun iskemi oluşturulan ve iki saat öncesinde GGA alan grup, iskemi oluşturulup 2 saat sonra GGA verilen grup ve iskemi grubundan daha yüksek bir VÍ oranına sahip olduğu ve bunun istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlenmiştir (p=0,000). Aynı şekilde iskemi oluşturulan ve iki saat önce GGA alan grubun, iki saat sonra GGA alan gruptan daha yüksek bir VÍ sahip olduğu görülmüştür (p=0.010) (Şekil 9).

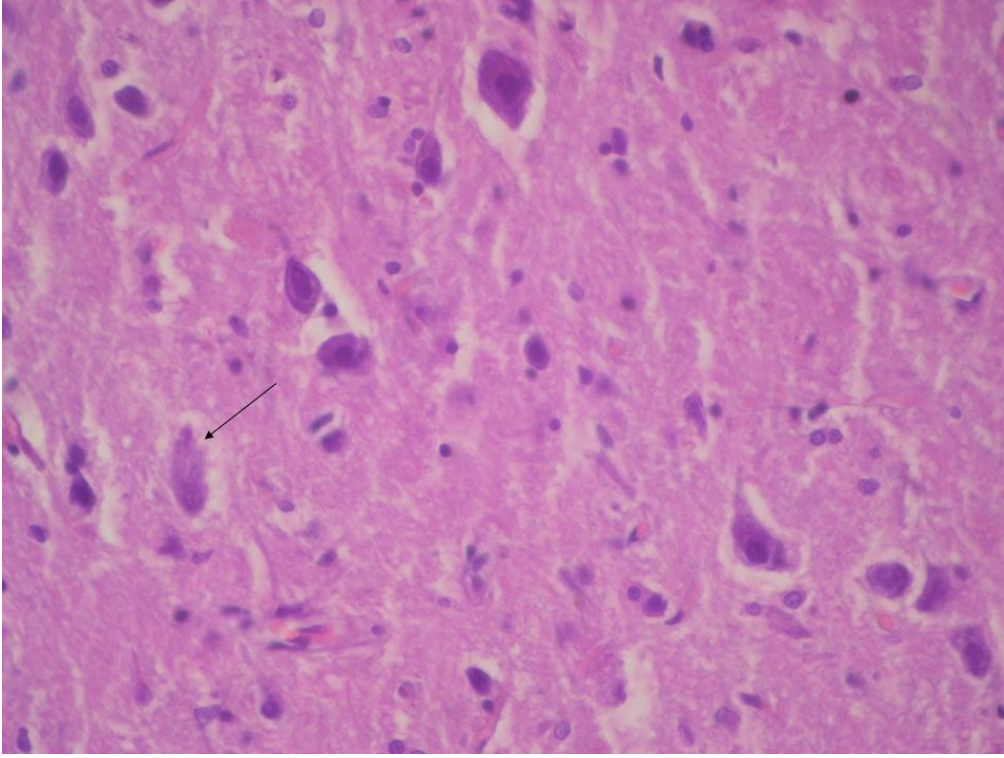


Şekil 9: Canlılık indeksi canlı nöron / total nöron)

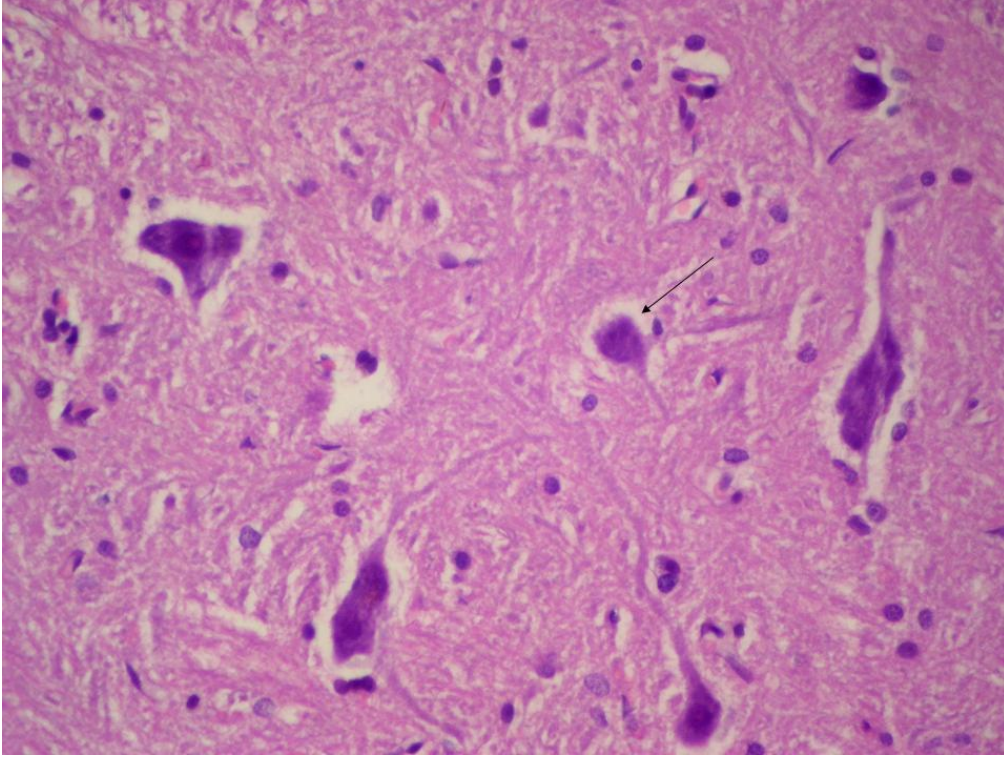
Farklı işaret taşıyan sütunlar birbiriyle anlamlıdır (p=0.000).

Tablo III: Canlılık indeksi(canlı nöron/ total nöron)

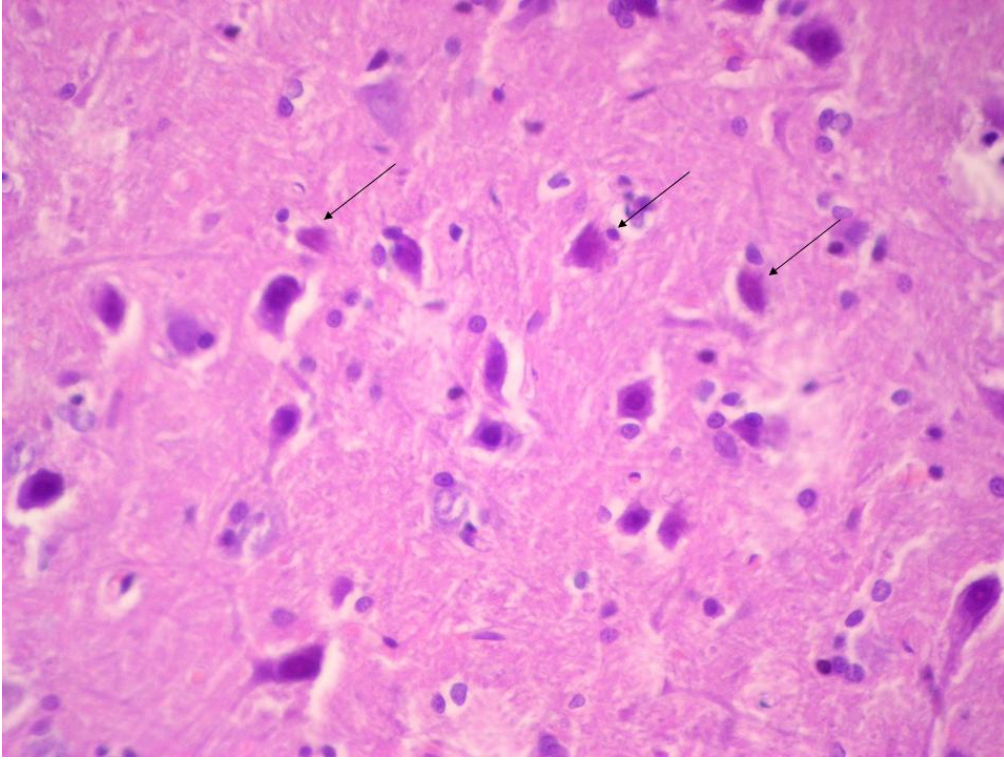
Gruplar	Vi Min- Max X ± SD
Kontrol	0,88 - 0,95 0,91 ± 0.027
GGA Kontrol	0,90 - 0,95 0,92 ± 0.024
İskemi + 2 Saat Önce GGA	0,68 - 0,85 0,74 ± 0.062
İskemi + İki Saat Sonra GGA	0,57 -,71 0,64 ± 0.063
İskemi	0,31 - 0,47 0,38 ± 0.058



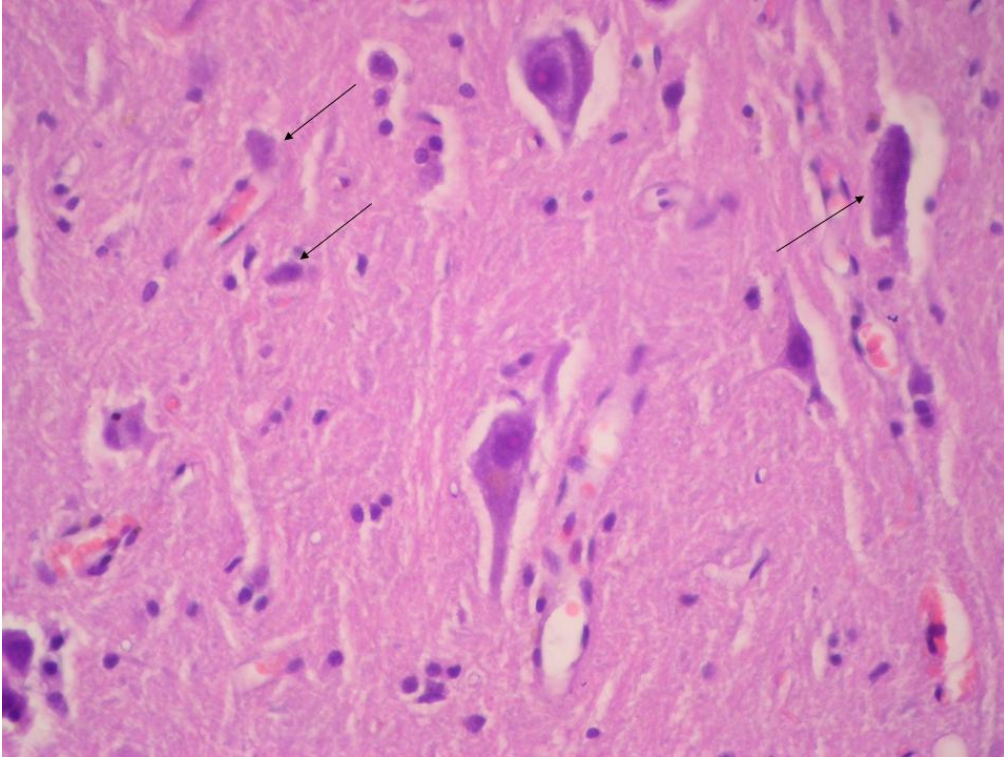
Resim 4: 1. gruptaki deneklerin Spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü [1. grupta iskemik hasara bağlı eozinofilik sitoplazma, nükleus kaybı içeren az sayıda hücre izlenmekte (Ok: ölü nöron). Sitoplazmalarında nissl cisimcikleri, nükleol belirginliği içeren nükleusa sahip canlı nöronlarda bu alanlarda gözlenmekte, viability indeks: 0,9, (HE, x400)].



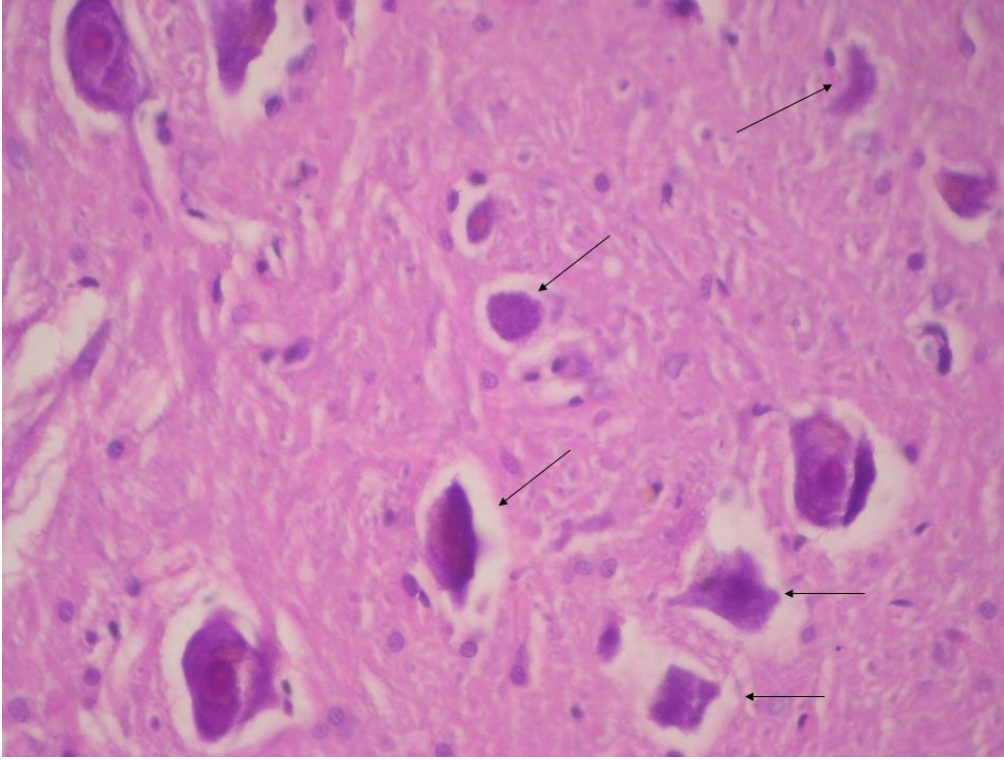
Resim 5: 2. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü [iskemik hasara bağlı eozinofilik sitoplazma, nükleus kaybı içeren az sayıda hücre izlenmekte (Ok: ölü nöron), sitoplazmalarında nissl cisimcikleri, nükleol belirginliği içeren nükleusa sahip canlı nöronlarda bu alanlarda gözlenmekte, viability indeks: 0,9, (HE, x400)].



Resim 6: 3. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü [iskemik hasara bağlı eozinofilik sitoplazma, nükleus kaybı içeren hücreler izlenmekte (Oklar: ölü nöronlar), sitoplazmalarında nissl cisimcikleri, nükleol belirginliği içeren nükleusa sahip canlı nöronlarda bu alanlarda gözlenmekte, viability indeks: 0,72, (HE, x400)].



Resim 7: 4. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü [iskemik hasara bağlı eozinofilik sitoplazma, nükleus kaybı içeren hücreler izlenmekte (Oklar: ölü nöronlar), sitoplazmalarında nissl cisimcikleri, nükleol belirginliği içeren nükleusa sahip canlı nöronlarda bu alanlarda gözlenmekte, viability indeks: 0,70, (HE, x400)].



Resim 8: 5. gruptaki deneklerin spinal kord kesitlerinin histopatolojik görünümü [iskemik hasara bağlı eozinofilik sitoplazma, nükleus kaybı içeren çok sayıda hücre izlenmekte (Oklar: ölü nöronlar), sitoplazmalarında nissl cisimcikleri, nükleol belirginliği içeren nükleusa sahip canlı nöronlarda bu alanlarda gözlenmekte, viability indeks: 0,43, (HE, x400)].

TARTIŞMA

Spinal kord infarktları ateroskleroz, aort disseksiyonu, emboli ve vaskülit sonucunda görülebildiği gibi sıklıkla torakoabdominal bölgedeki anevrizma cerrahisine bağlı olarak gelişebilmektedirler (1, 2, 3).

Spinal korda travma yada akut iskemi sonrasında gelişen birincil hasarlanmadan sonra ikincil hasarlanma birbirini takip eden olaylar zinciri şeklinde gelişmektedir. Spinal kord iskemisinde koruma ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Bu nedenle günümüzde spinal kord travması ve iskemisi ile ilgili deneysel çalışmalar önemini korumaktadır. Güncel deneysel çalışmalar çoğunlukla ikincil hasarlanmayı önlemeye yönelik olarak gerçekleştirilmektedirler.

Omurilikte iskemi oluşturmak üzere çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Zivin ve DeGirolami tavşanlarda aortanın infrarenal segmentinin oklüzyonu ile barsak ve böbrek iskemisi ve kardiyak dilatasyon gibi nadir komplikasyonlara neden olan bir spinal kord iskemi modeli tanımlamışlardır (33) Ancak bu model insanlardaki durumu yansıtmayabilir, çünkü insanlarda Adamkiewicz arteri nedeniyle infra aortik klememenin parapleji oluşturması oldukça nadir bir durumdur.

Sulfanova ve arkadaşları spinal kord iskemisi oluşturmak üzere ratlarda abdominal aorta ve dallarının intravasküler oklüzyonunu deneysel model olarak tanımlamışlardır (34).

Lang-Lazdunski ve arkadaşları, farelerde aorta, sol subklavian arter ve internal mamrian arteri 9 ya da 11 dakika süreyle klemleyerek spinal iskemi oluşturmuşlardır (35).

Boğa ve arkadaşları tavşanlarda oluşturdukları deneysel bir modelde spinal kord iskemisinde N-Asetilsistein ve iloprostun önleyici etkilerini incelemişlerdir (36).

Tator ve Rivlin ise spinal kord iskemisi yaratmak için klip kompresyon modelini tanımlamışlardır (4,6,7,37).

Bu çalışmamızda ratlarda laparotomi sonrası abdominal aortu klemleyerek Lang-Lazdunski ve arkadaşlarının modeline benzer şekilde spinal korda iskemi oluşturulması amaçlanmıştır. Ratlarda abdominal aorta 10 dakika süreyle vasküler klemle kapatılmıştır. Aortun klempe edilerek kapatıldığı ratların tümünde histopatolojik inceleme ile spinal kord iskemisine bağlı değişikliklerin olduğu saptanmıştır.

Çalışmada spinal kord iskemi modelinde geranilgeranilaseton'un sekonder yaralanma mekanizmaları üzerine olan etkinliği dokuda TNF-alfa ve HSP-70

düzeylerinin ölçümü ile histopatolojik olarak enfark alanı ölçümlendirmesi ile araştırılmıştır.

GGA'nın HSP 70 salınımını arttırıcı etkisi Rokutan tarafından gösterilmiştir (7, 30, 38).

Yasuyuki Nagai ve arkadaşları ratlarda kalıcı MCA tıkanması ile lezyon oluşturulmadan 48 saat önce ve 800 mg/kg verilen GGA'nın nekroz miktarında azalma ve HSP 70 düzeyinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (7, 32).

Hiroshi Yasuda ve arkadaşları farelerde kalıcı MCA tıkanması oluşturup lezyon oluşturulmadan 1 saat önce intraperitoneal verilen GGAnın HSP 70 düzeyindeki artış ve nekroz hacmindeki azalmanın doza bağlı değişim gösterdiğini bildirmişlerdir (7, 30).

Fujuki ve arkadaşları ratlarda GGA'nın serebral dokuda HSP 70 salınımı arttırdığını bildirmişlerdir (7, 39).

Nakada ve arkadaşları, ratlarda GGA'nın dokudaki TNF-alfa düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğünü ve HSP 70 düzeyini arttırdığını göstermişlerdir (7, 40).

T.Nishida ve arkadaşları da GGA'nın farelerde karaciğerde HSP 70 düzeylerin, arttırdığını ve asetaminofene bağlı nekroz boyutunu azatlığını bildirmişlerdir (7, 41).

Bu çalışma, GGA'nın ratlarda spinal korda iskemisi oluşturulmadan 2 saat önce verildiğinde iskemi ve nekroz alanını azalttığını göstermiştir. Spinal kordda iskemi oluşturulduktan 2 saat sonra GGA verdiğimizde iskemi ve nekroz alanındaki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Aynı şekilde doku HSP 70 düzeylerindeki artışın iskemiden 2 saat önce GGA verilen grupta anlamlı olduğu ancak iskemiden 2 saat sonra GGA verilen grupta anlamlı olmadığı görülmüştür. TNF-Alfa düzeyleri değerlendirildiğinde de iskemiden 2 saat önce GGA verilen grupta anlamlı derecede azalma olduğu saptanırken iskemiden. 2 saat sonra GGA verilen grupta azalmanın anlamlı derecede olmadığı izlenmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda da GGA'nın hasar oluşturulmadan önce verildiğinde HSP70, TNF-alfa ve iskemi/nekroz alanı üzerinde anlamlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik taşımaktadır.

Bu çalışma GGA'nın iskemik spinal kord hasarlarında HSP 70 düzeyini arttırarak nöroprotektif etki oluşturabileceğini göstermektedir. Bu etki hem TNF-alfa düzeylerinde düşme ve buna bağlı olarak enflamatuar mekanizmaların engellenmesi hem de antiapoptotik etki sayesinde olabilir.

SONUÇ

Bu alışma ile deneysel olarak ratlarda oluşturulan spinal kord iskemi modelinde GGA'nın iskemi oluşturulmadan 2 saat önce verildiğinde doku TNF-alfa düzeylerini düşürdüğü, HSP-70 düzeylerini arttırdığı ve iskemi/nekroz boyutunu azalttığı saptanmıştır.

ÖZET

'DENEYSEL AKUT SPİNAL KORD İSKEMİSİNDE GERANYLGERANYLACETONUN İKİNCİL HASARLANMA ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ'

Amaç: Çalışmada, deneysel bir modelde spinal kord iskemisinde geranilgeranil asetonun (GGA) nöroprotektif etkileri incelenmiştir.

Gereç ve yöntem: 30 Wistar albino tipi rat rastgele beş gruba ayrıldı (her grupta n=6). Grup 1 kontrol grubu olarak belirlendi, cerrahi işlem uygulanmadı ve GGA verilmedi. Grup 2'de ratlara spinal kord iskemisi oluşturulmadı, ancak intraperitoneal olarak GGA verildi. Grup 3'te spinal kord iskemisi oluşturulmadan 2 saat önce intraperitoneal olarak GGA verildi. Grup 4'te spinal kord iskemisi oluşturulduktan 2 saat sonra intraperitoneal olarak GGA verildi. Grup 5'te spinal kord iskemisi oluşturdu ancak GGA verilmedi. Spinal kord iskemisi oluşturulduktan 24 saat sonra ratlar sakrifiye edilerek spinal kordları örnekleme ve histopatolojik inceleme için çıkartıldı. Histopatolojik inceleme ile dokudaki iskemi ve nekroz alanı ölçümlendirilip canlılık endeksi (VI) saptandı. İmmünoyokimyasal inceleme ile çıkartılan spinal kord örneklerinde doku HSP-70 ve TNF- α düzeyleri ölçüldü.

Sonuçlar: Grup3 ve 4'te canlılık endeksi (özellikle grup 3'te), grup 5'e göre anlamlı derecede yüksekti. Grup 3'te, HSP-70 düzeyleri diğer gruplardakine göre anlamlı derecede yüksekti. Grup 3'te, TNF- α düzeyleri diğer gruplardakine göre anlamlı derecede düşüktü.

Sonuç: Spinal kord iskemisi oluşturulmadan 2 saat önce intraperitoneal olarak 200 mg/kg dozunda verilen GGA'nın ratlarda spinal kord iskemisini azalttığı ve nöroprotektif etki gösterdiği saptandı.

SUMMARY

'EFFECTS OF GERANYLGERANYL ACETON ON SECONDARY INJURY IN EXPERIMENTAL ACUTE SPINAL CORD ISCHEMIA'

Objectives: This study investigated the neuroprotective effects of geranylgeranylacetone GGA on spinal cord ischemia in an experimental model.

Material and method: Thirty Wistar albino rats were included in five study groups randomly (n=6 for each group). Group 1 is defined as control group. In group 2, we have applied intraperitoneally GGA to the rats. In group 3, we have applied intraperitoneally GGA before the surgery and than spinal cord ischemia has been carried out by clamping abdominal aorta through laparotomy. In group 4, we have applied GGA intraperitoneally after the laparotomy. In Group 5, we have carried out spinal cord ischemia in rats and not applied any medication. After 24 hours, spinal cords of rats have been exized and evaluated hystopathologically. Vitality index (VI) has been analised. HSP-70, TNF- α levels in tissue have been analised.

Results: In group 3 and 4 (particularly in group 3), VI was significantly higher than that in group 5. In group 3, HSP-70 levels were significantly higher than that in other groups. In group 3, TNF- α levels were significantly lower than that in other groups.

Conclusion: GGA has neuroprotective effect in experimental spinal cord ischemia model. GGA application results in increased HSP-70 levels, decreased TNF- α levels.

KAYNAKLAR

1: Leira, EC. Vascular disorders of the spinal cord. For Neurobase CD ROM. S Demeter (Ed.), San Diego: Arbor Publishing Corporation, 1996, yearly updated

2: Leys D, Weerts J, Pruvo JP. Spinal ischemic strokes. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. Cerebrovascular disease. Cambridge, MA: Blackwell Scientific Publications, Inc., 1998;1560–1568.

3: Önal Z, Bora B. Spinal kordun vasküler hastalıkları. Balkan S. (ed) 2 baskı. Güneş kitabevi 2005;149-65

4: Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Temel Nöroşirurji (Türk Nöroşirurji Derneği Yayınları) 2005; 1144-53

5: Sekhon LHS, Fehlings MG. Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. Spine 2001;26:12

6: Mautes AEM, Weinzierl MR, Donovan F, Noble LJ. Vascular events after spinal cord injury: contribution to secondary pathogenesis. Physical Therapy 2000;80:673-87

7: Tekin C. Deneysel akut spinal kord travmalarında geranyl geranylasetonun ikincil hasarlanma üzerine etkilerinin incelenmesi. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2007:15-44

8: Ushijima H, Tanaka K, Takedo M, Katsu T. Geranylgeranylacetone protect membranes against nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Mol Pharmacol. 2005 Oct;68(4):1156-61

9: Katsuno M, Sang C, Adachi H, Minamiyama M. Pharmacological induction of heat shock proteins alleviates polyglutamine–mediated motor neuron disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 15;102(46):16801-6

10: avdar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Zileli M, zer FA (eds), 1.baskı, Saray Medikal Yayınevi, Bornova, İzmir, 1997;1: 3-38

11: Gökhan Y. Deneysel spinal kord yaralanma modelinde clopidogrel in koruyucu ve tedavi edici etkisinin araştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi 2007:13-39

12: Lea Febiger. Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body an yahoo education. Philedelphia 1918, Newyork Bartleby.com. 2000

13: Ceylan S. Omuriliğ in vasküler anatomisi ve kan akımı. Omurilik ve Omurga Cerrahisi (ed). Zileli M, zer FA, 1.baskı, Saray Medikal Yayınevi, Bornova, İzmir, 1997; 3: 49-53

14: Ekmekçi H. Spinal kord yaralanma modelinde ambroksol hidroklorürün morfolojik ve ultrastrüktürel etkisi Tıpta Uzmanlık Tezi. 2007;16-23

15: Netter FH. The Netter Collection of Medical illustration Nervous System, Volume 1: Part I: Anatomy and Physiology, Ed: Brass A, Elsevier Saunders 2007:36-66

16: Sturzenegger M. Spinal stroke syndromes (ed). Bogousslavsky J, Caplan L. Stroke syndromes. Cambridge University pres. Second Edition, 2000;691-704

17: Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA. The cellular inflammatory response in human spinal cord after injury. Oxford Journals Medicine Brain 2006;129:3249-69

18: Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffarda RG. Antiapoptotic and Anti-inflammatory Mechanism of Heat Shock Protein Protection. New York Academy of Sciences 2005;1053:74-83

19: Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.

20: Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience* 1997;17:5395-406

21: Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-62

22: Wingrave JM, Schaecher KE, Sribnick EA, Wilford GG. Early induction of spinal cord injury factors causing activation of calpain and mitochondria-mediated neuronal apoptosis following spinal cord injury in rats. *The Journal of Neuroscience Research* 2003;73:95-104

23: Lang-Rollin ICJ, Rideout HJ, Noticewala M. Mechanism of caspase independent neuronal death: Energy depletion and free radical generation. *The Journal of Neuroscience* 2003;23:11015-25

24: Young W. Spinal cord injury pathophysiology and therapy. In: Narayan RK, Wilberger JE, Povlishock JT. (eds). *Neurotrauma*. New York: McGraw-Hill 1996:1075-1093

25: Jaattela M, Wising D, Kokholm K, Kallunki T, Egeblad M. Hsp 70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3 like proteases. *The EMBO journal* 1998;17:6124-34

26: Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xl and cytochrome C. *Molecular and Cellular Biology* 1998;18:608-15

27: Adhern K, Mathews C, VanHold KE. Heat shock proteins—structure and overview. *Biochemistry* third edition. New York 2000

28: Fink AL. Chaperone-mediated protein folding. *Physiological Reviews* 1999;79:425-49

29: Dick D, Mosser, Antonie W, Caron, Lucie Bourget, Anatoli B. The Chaperone Function of HSP 70 is required for protection against stress-induced Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20:7146-7159

30: Yasuda H, Shichinohe H, Kuroda S, Ishikawa T. Neuroprotective effect of a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone in permanent focal cerebral ischemia. *Brain Research* 2005;1032:16-82

31. Meng X, Harken AH. The interaction between Hsp70 and TNF- α expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression. *Shock*. 2002;17(5):345-53.

32: Nagai Y, Fujiki M, Inoue R, Uchida S, Çetinalp NE. Neuroprotective effect of geranylgeranylacetone, a noninvasive heat shock protein inducer, cerebral infarction in rats. *Neuroscience Letters* 2005;374:183-8

33: Zivin JA, De Girolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model. *Stroke* 1980;11:200-2

34: Sufianova GZ, Usov LA, Sufianov AA, Shapkin AG, Raevskaya LY. New minimally invasive model of spinal cord ischemia in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002;133:116-20

35: Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JG, Moskowitz MA. Spinal cord ischemia development of a model in the mouse. *Stroke* 2000;31:208-13

36: Boğa M, Disçigil B, Özkısacık E, Gürcün U, Badak İ, Dikicioğlu E ve ark. The combined effect of iloprost and N-Acetylcysteine in preventing spinal cord ischemia in rabbits. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006;31:366-72

37: Tator CH, Kaptanoğlu E. Strategies for Neuroprotection after spinal cord injury. In: Zileli M, Özer AF (eds). *Omurilik ve Omurga cerrahisi* 2002:813-32

38. Rokutan K. Role of heat shock proteins in gastric mucosal protection. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar;15 Suppl:D12-9..

39: Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Ishii K. Astroglial activation accompanies heat shock protein upregulation in rat brain following single oral dose of geranylgeranylacetone. *Brain Research*. 2003;991:254-7

40: Nakada J, Matsura T, Okazak N. Oral administration of geranylgeranyl acetone improves survival rate in a endotoxin shock model: administration timing and heat shock protein 70 induction. *Shock* 2005;24:482-7

41: Nishida T, Matsura T, Nakada J, Togawa A. Geranylgeranylacetone protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by inducing heat shock protein 70. *Toxicology* 2006;219:187-96