



BEZMİÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ
1845

T.C.

BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA ÜROLİTİN A VE NAR
EKSTRESİNİN MİTOFAJİ VE İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Selçuk YAPAR

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mustafa Namık ÖZTANIR

İSTANBUL

2022



T.C.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA ÜROLİTİN A VE NAR
EKSTRESİNİN MİTOFAJİ VE İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Selçuk YAPAR

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Mustafa Namık ÖZTANIR

İSTANBUL

2022

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi (BAP)
tarafından 20210417 numaralı proje ile desteklenmiştir.





ÖNSÖZ

Nöroşirürji eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemedi doktorluk sanatının inceliklerini bana öğreten, başta tez danışmanım Doç.Dr. Mustafa Namık ÖZTANIR'a,

Asistanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Mustafa Aziz HATİBOĞLU, Doç. Dr. Mehmet Hakan SEYİTHANOĞLU, Doç. Dr. Erdiñ ÖZEK, Doç. Dr. Tolga Turan DÜNDAR, Doç Dr. Serkan KİTİŞ, Doç. Dr. Anas ABDALLAH, Op.Dr. Meliha GÜNDAĞ PAPAĞER'e,

Deneyisel çalışmanın yapılışı sırasında yardımlarını esirgemeyen Eczacılık Fakültesi Farmasitik Biyoteknoloji Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI'ye, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Emine Rumeysa HEKİMOĞLU'na,

Asistanlık sürecinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarım Dr. Abdurrahim TEKİN, Dr. Engin CAN, Dr. Güven GÖNEN, Dr. Sadık TOKAR, Dr. Esmâ Cemre EREN, Dr. Mehmet Ege ERDEN, Dr. Kıvanç TAŞ, Dr. Yunus Emre SAĞLAM'a,

Hayatım boyunca olduğu gibi tüm eğitim sürecim ve zorlu tez döneminde de yanımda olan, Her zaman desteklerini hissettiğim aileme, sevgili eşim Mücella'ma ve biricik oğlum Muhammed Dorukhan'a

Teşekkür ederim.

Dr. Selçuk YAPAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	v
KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xiii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Spinal Kord Embriyolojisi.....	4
2.2. Spinal Kord Anatomisi	5
2.2.1. Spinal kordun zarları.....	7
2.2.2. Spinal kordun iç yapısı.....	8
2.2.2.1. Anterior kolon hücreleri.....	8
2.2.2.2. Lateral kolon hücreleri.....	8
2.2.2.3. Posterior kolon hücreleri.....	9
2.2.3. Spinal kordun vasküler yapısı	10
2.3. Spinal Kord Yaralanmasının Tarihçesi	11
2.4. Spinal Kord Yaralanmalarının Klinik Sınıflaması ve Sendromları...12	
2.4.1. Santral kord sendromu	18
2.4.2. Brown-Sequard sendromu.....	18
2.4.3. Anterior kord sendromu	19
2.4.4. Kauda ekina sendromu	20
2.4.5. Konus medullaris sendromu.....	20
2.5. Spinal Kord Yaralanmalarında Fonksiyonel Değerlendirme ve Tanı.....	21
2.6. Spinal Kord Yaralanmalarının Fizyopatolojisi	22
2.6.1. Primer yaralanma	22

2.6.2.Sekonder yaralanma	23
2.6.3.Sistemik etkiler	26
2.6.4.Lokal vasküler etkiler	26
2.6.5.Biyokimyasal etkiler.....	26
2.6.6.Elektrolit dengesizlikleri.....	27
2.6.7.Serbest radikal oluşumu ve lipid peroksidasyonu.....	28
2.6.8.Apoptoz.....	29
2.6.9.İnflamasyon.....	31
2.6.10.Mitofaji.....	32
2.6.10.1.Makrootofaji mekanizması ile mitofaji.....	33
2.6.10.1.1.Fagofor oluşumu.....	33
2.6.10.1.2.Hasarlı mitokondrinin tanınması ve yutulması.....	34
2.6.10.2.Mikrootofaji mekanizması ile mitofaji.....	37
2.7.Spinal Kord Yaralanmalarının Tedavisi.....	39
2.7.1.Spinal kord yaralanmalarının cerrahi tedavisi.....	39
2.7.2.Spinal kord yaralanmalarının medikal tedavisi.....	39
2.7.2.1.Metilprednizolon.....	39
2.7.2.2.Opiat antagonistleri.....	40
2.7.2.3.Kalsiyum kanal blokerleri.....	40
2.7.2.4.Gangliosidler.....	41
2.7.2.5.Serbest radikal tutucular.....	41
2.7.2.6.Antiinflamatuvar ajanlar.....	41
2.7.2.7.Hiperbarik oksijen tedavisi.....	41
2.7.2.8.Ürolitin a.....	42
2.8.Deneysel Spinal Kord Travma Modelleri.....	42
3. YÖNTEM VE GEREÇLER.....	43
3.1.Deney Grupları.....	43
3.2.Çalışma Prosedürleri	44
3.2.1.Anestezi.....	44

3.2.2.Cerrahi teknik.....	44
3.2.3.Sakrifikasyon ve spinal kordların çıkarılması.....	47
3.3.İmmünohistokimyasal Analizler.....	48
3.3.1.Histolojik yöntem.....	48
3.3.1.1.Örneklerin hazırlanması.....	48
3.3.1.2.Hematoksilen- eozin boyama.....	48
3.3.1.3.İmmünohistokimyasal yöntem.....	49
3.4.Doku Il-6 Ve Tnf Alfa Düzeylerinin Elısa İle Değerlendirilmesi.....	50
3.5.Doku Örneklerinin Western Blot İle Değerlendirilmesi.....	50
3.6. İstatistiksel Analizler.....	51
4. BULGULAR.....	52
4.1.Histolojik Bulgular	52
4.2.İmmünohistokimyasal Bulgular.....	57
4.2.1.Nix immunreaksiyonu.....	57
4.2.2.Parkin immunreaksiyonu.....	62
4.3.Doku il-6 ve tnf alfa düzeyleri.....	70
4.4.Doku Western blot bulguları.....	72
5. TARTIŞMA.....	74
6. SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	80

KISALTMALAR

ASIA :Amerikan Spinal Travma Derneği

BNIP3 :BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa Etkileşimli Protein 3

BSS :Brown-Sequard Sendromu

EA :Ellagic Asit

ET :Ellagitanninler

FDA :Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi

GABA :Gama Amino Bütirik Asit

HE :Hematoksilen ve Eosin

H₂O₂ :Hidrojen peroksit

IMM :İç Mitokondriyal Zar

ISNCSCI :Spinal Kord Hasarının Nörolojik Sınıflamasının Uluslararası Standartları

LAMP-2A :Lizozom ile İlişkili Zar Proteini tip 2A

LC3-I :Sitozolik Mikrotübül İlişkili Protein-1 Hafif Zincir 3

MBP :Miyelin Bazik Protein

MDV :Mitokondri Kaynaklı Veziküller

NARE :Nar Ekstresi

NASCIS :Ulusal Akut Spinal Kord Hasarı Çalışması

NDP52 :Nükleer Nokta Proteini 52

NIX :NIP3 Benzeri Protein X

NO :Nitrik Oksit

OH :Hidroksil Radikali

OMM :Dış Mitokondriyal Zar

PTEN :Protein Tirozin Fosfataz ve Tensin Homoloğu

ROO :Organik Peroksi Radikali

SCIM :Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği

SKH :Spinal Kord Hasarı

TNFR1 :Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1

UA : Ürolitin A

YME 1 :Maya Mitokondriyal Kaçış 1

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1. ASIA ISNCSCI' ye göre anahtar kaslar	14
Tablo 2. ASIA ISNCSCI'de kullanılan kas gücü evrelemesi	14
Tablo 3. Anahtar olmayan kaslar	15
Tablo 4. Anahtar duyu noktaları	16
Tablo 5. Hafif dokunma duyusu puanlanması	16
Tablo 6. İğne duyusunun puanlanması	16
Tablo 7. Spinal kord yaralanmalarında sekonder hasar mekanizmaları.....	25
Tablo 8. Çalışma grupları	44
Tablo 9. İmmünreaksiyon dereceleri	57
Tablo 10. Deney gruplarının NİX ve Parkin ile gösterdiği immünreaksiyonun karşılaştırılması.....	68
Tablo 11. Deney gruplarının Nix ve Parkin ile immün reaksiyonunun istatistiksel olarak yorumlanması.....	69
Tablo 12. <i>TNF-α</i> elisa konsantrasyon tablosu.....	71
Tablo 13. <i>TNF-α</i> elisa konsantrasyon tablosu.....	71
Tablo 14. Parkin ve Nix'in western blot sonuçları tablosu.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Sinir sistemi embriyolojisi	4
Şekil 2. Spinal kord anatomisi	5
Şekil 3. Spinal sinirler A) Lateral görünüm B) Posterior görünüm	6
Şekil 4. Medulla spinalis zarları	7
Şekil 5. Medulla spinalisdeki sulkus ve fissürler	9
Şekil 6. Spinal kordun arter ve venleri	10
Şekil 7. Edwin Smith cerrahi papirüs belgesi	11
Şekil 8. Hipokrat'ın tarif ettiği traksiyon yönetemi (temsili).....	12
Şekil 9. Spinal kord hasarında nörolojik sınıflama ölçeği	13
Şekil 10. ASIA sınıflaması	17
Şekil 11. Santral kord sendromu	18
Şekil 12. Brown-Sequard sendromu (BSS).....	19
Şekil 13. Anterior kord sendromu	19
Şekil 14. Kauda ekina sendromu	20
Şekil 15. Spinal kord yaralanması vakası röntgen, BT ve MRG görüntülemeleri ...	21
Şekil 16. Spinal Kord Hasarın Patofizyolojisi	22
Şekil 17. Spinal kord hasarında primer ve sekonder yaralanma fazları	24
Şekil 18. Hücre hasarında kalsiyum ve sodyum imbalansı	28
Şekil 19. Spinal kord hasarında apoptoz	30
Şekil 20. Memeli hücrelerinde mitofajinin mekanizmaları	33
Şekil 21. Ubiquitin bağımlı bir şekilde, LC3 adaptörleri aracılığıyla mitokondri tanınma.....	34
Şekil 22. Ubiquitin'den bağımsız bir şekilde, LC3 adaptörleri aracılığıyla mitokondri tanınma.....	36
Şekil 23. LC3 reseptörleri aracılığıyla mitokondri tanınma	37
Şekil 24. Cerrahi hazırlık aşaması	45
Şekil 25. Laminektomi sonrası spinal kordun ortaya konulması	45

Şekil 26. Spinal kordun anevrizma klipsi ile kompresyonu	46
Şekil 27. Tüm katların primer sütürasyonu	46
Şekil 28 a.b. Sakrifikasyon sırasında alınan spinal kord görüntüsü	47
Şekil 29 a.b.c. HE ile boyanmış travma grubu kesitleri	52,53
Şekil 30 a.b.c. HE ile boyanmış sham grubu kesitleri	53,54
Şekil 31 a.b.c.d. HE ile boyanmış Ürolitin A grubu kesitleri	55,56
Şekil 32 a.b. HE ile boyanmış Nar Ekstresi grubu kesitleri	56,57
Şekil 33 a.b.c. Travma grubu Nix ile immünreaksiyon kesitleri	58,59
Şekil 34 a.b. Sham grubu Nix ile immünreaksiyon kesitleri	59,60
Şekil 35 a.b. Ürolitin A grubu Nix ile immünreaksiyon kesitleri	60,61
Şekil 36 a.b. Nar Ekstresi grubu Nix ile immünreaksiyon kesitleri	61,62
Şekil 37 a.b.c. Travma grubu Parkin ile immünreaksiyon kesitleri	62,63
Şekil 38 a.b.c. Sham grubu Parkin ile immünreaksiyon kesitleri	64,65
Şekil 39 a.b.c. Ürolitin A grubu Parkin ile immünreaksiyon kesitleri	65,66
Şekil 40 a.b. Nar Ekstresi grubu Parkin ile immünreaksiyon kesitleri	67
Şekil 41. TNF- α elisa konsantrasyon grafiği	71
Şekil 42. IL-6 elisa konsantrasyon grafiği	72
Şekil 43. Parkin ve Nix'in western blot ile değerlendirilmesi	73
Şekil 44. Parkin ve Nix'in western blot sonuçları grafiği	73

DENEYSEL OMURİLİK YARALANMASINDA ÜROLİTİN A VE NAR EKSTRESİNİN MİTOFAJİ VE İNFLAMASYON ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Giriş: Ratlarda oluşturulan deneysel spinal kord yaralanması sonrasında uygulanan Ürolitin A ve Nar Ekstresinin mitofaji ve inflamatuvar parametreler üzerine etkilerinin araştırılması.

Yöntem: Çalışmamız Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, immünohistokimya çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji Laboratuvarı'nda, elisa ve Western blot testleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Beykoz Araştırma Merkezi Beyin ve Sinir Cerrahisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız 4 gruptan oluşup tüm gruplarda 8'er adet olmak üzere toplamda 32 adet Sprague Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Tüm deney gruplarına T9-T10 laminektomi yapıldı. Sham grubu dışındaki gruplara laminektomiye takiben dura ortaya kondu ve Yaşargil Anevrizma Klibi ile omuriliğe kompresyon uygulanarak hasar oluşturuldu. Travma sonrası sham ve travma grubuna tedavi verilmezken Ürolitin A grubuna 12, 24 ve 36. saatlerde 50 mg/kg dozunda Ürolitin A gavaj ile verildi. Nar Ekstresi grubuna ise yine 12, 24 ve 36. saatlerde 1 ml Nar Ekstresi verildi. Denekler daha sonra 48. saatte sakrifiye edilerek immünohistokimya, Elisa ve Western blot incelemesi için spinal kordlarındaki hasarlı doku örnekleri alındı.

Bulgular: İnflamasyon markerlarından IL-6 ve TNF- α seviyesinin ELİSA ile değerlendirilmesinde istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilemedi. İmmünohistokimyasal incelemede hematoksilen-eozin ile boyanmada sham grubu histolojik yapısı en iyi korunan grup olurken Nar Ekstresi grubu sham grubuna en yakın grup oldu. Nix ile immün boyanmada Nar Ekstresi grubu travma grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak görüldü ($p = 0,020$). Ürolitin A grubu da aynı şekilde nix ile daha az reaksiyon vermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p = 0,769$). Nix'in Western blot ile değerlendirmesinde de bu immünohistokimya sonuçlarına paralel bir sonuç elde edildi. Parkin ise her ne kadar mitofajide önemli bir molekül olsa da gerek immünohistokimya ile gerekse Western blot ile değerlendirmede anlamlı sonuç vermedi.

Sonuç: Çalışmamızdaki verilerin neticesinde travmatik spinal kord hasarında Ürolitin A ve özellikle de Nar Ekstresinin aşırı mitofajiyi azaltarak tedavide etkili olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Travmatik spinal kord hasarı, Ürolitin A, Nar Ekstresi, mitofaji, inflamasyon

THE EFFECT OF UROLITHIN A AND POMEGRANATE EXTRACT ON MITOPHAGY AND INFLAMMATION IN EXPERIMENTAL SPINAL CORD INJURY

SUMMARY

Introduction: To investigate the effects of urolithin a and pomegranate extract applied after experimental spinal cord injury in rats on mitophagy and inflammatory parameters.

Method: Our study was carried out in Bezmialem Vakif University Medical Faculty Experimental Animals Laboratory, immunohistochemistry studies in Bezmialem Vakif University Histology Laboratory, elisa and Western blot tests in Bezmialem Vakif University Beykoz Research Center Brain and Nerve Surgery Laboratory. Our study consisted of 4 groups and a total of 32 Sprague Dawley rats, 8 in each group, were used. T9-T10 laminectomy was performed in all experimental groups. The dura was exposed following laminectomy in groups other than the sham group, and damage was created by applying compression to the spinal cord with the Yaşargil Aneurysm Clip. While no treatment was given to the sham and trauma groups after trauma, urolithin a group was given 50 mg/kg urolithin a by gavage at 12, 24 and 36 hours. The pomegranate extract group was given 1 ml of pomegranate extract at 12, 24 and 36 hours. Subjects were subsequently sacrificed at 48 hours and damaged tissue samples from their spinal cords were obtained for immunohistochemistry, ELISA, and Western blot examination.

Results: Statistically significant results were not obtained in the evaluation of IL-6 and TNF- α levels, which are inflammation markers, by ELISA. In immunohistochemical examination, the sham group was the group whose histological structure was best preserved in hematoxylin-eosin staining, while the pomegranate extract group was the closest group to the sham group. In immunostaining with Nix, the pomegranate extract group was statistically significantly lower than the trauma group. ($p=0.020$) Urolithin a group. Similarly, although it gave less reaction with nix, it was not found statistically significant. ($p=0.769$) A result parallel to these immunohistochemistry results was obtained in the evaluation of Nix with Western blot. Parkin, on the other hand, although an important molecule in mitophagy, did not yield significant results in the evaluation either by immunohistochemistry or Western blot.

Conclusion: As a result of the data in our study, it was determined that urolithin a and especially pomegranate extract were effective in the treatment of traumatic spinal cord injury by reducing excessive mitophagy.

Keywords: Traumatic spinal cord injury, urolithin a, pomegranate extract, mitophagy, inflammation

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Spinal kord hasarı (SKH) özellikle gençler ve genç yetişkinler arasında önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (1). Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yıllık spinal kord hasarı insidansının bir milyon kişi başına yaklaşık 54 vaka olduğu ve her yıl yaklaşık 17.810 yeni spinal kord hasarı vakası olduğunu göstermiştir. Ortalama yaralanma yaşı 1970' lerde 29 iken, 2015' ten bu yana 43'e yükselmiştir. Son veriler ışığında vakalarının yaklaşık %78'i erkektir. SKH'nın başlıca nedenleri arasında motorlu taşıt kazaları (%38,6), düşmeler (%32,2), şiddet (%14) ve spor (%7,8) bulunmaktadır (2). SKH tipik olarak en yaygın seviye C5 olmak üzere omurgada %50 servikal bölgeyi, %35 torakal bölgeyi, %11 ise lomber bölgeyi etkiler. (3) SKH olan bir kişiyi tedavi etmenin ortalama yaşam boyu maliyeti, yaralanmanın kapsamı ve yeri gibi faktörlere bağlı olarak 500.000 ABD Doları ile 2 milyon ABD Doları arasındadır. ABD'de omurilik yaralanması olan bireylerin bakımının toplam doğrudan maliyeti yılda 7 milyar doları aşılıyor (4). Hasta ve yakınları açısından gerek duygusal ve sosyal gerekse de finansal olarak büyük kayıplar oluşturan spinal kord hasarının halen patolojik süreci hakkında sınırlı bilgiye sahibiz.

SKH patofizyolojisinin karmaşıklığı ve omurilikte meydana gelen çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler tedavi konusunda çok fazla ilerleme kaydedilmemesine sebep olmuştur (5). Bu karışık mekanizmaların önemli bir basamağını oluşturan mitofajinin spinal kord hasarında önemli bir rol oynadığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (6). Nar meyvesinin önemli bir kaynağı olduğu Ellagitantinlerin (ET) barsaklarda dönüştüğü Ürolitinler'in (özellikle Ürolitin A) mitofajiyi indüklediği gösterilmiştir (7).

Mitofaji, mitokondrinin otofaji tarafından seçici olarak parçalanmasıdır. Genellikle hasar veya stresi takiben kusurlu mitokondrilerde görülür. Dolayısıyla SKH'dan sonra hasar gören mitokondrinin mitofaji üzerinden yenilenmesi ve hasar gören dokunun rejenerasyonunu sağlanması önemlidir.

Planladığımız çalışmada SKH'da daha önce hiç çalışılmayan Ürolitin A'nın mitofajik ve inflamatuvar değişiklikler üzerine etkisini saptamayı amaçlayarak tedavi sürecinde umut veren bir molekül olduğunu öngörmekteyiz. Nar Ekstresinde bulunmayan ancak barsak mikrobiyotası tarafından üretilen Ürolitin A, barsak florası bozulmuş bazı insanlarda üretilmemektedir, bu yüzden son zamanlarda satışa sunulan Ürolitin A'nın kullanımı Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır. Ancak bazı çalışmalar ağızdan alınan Ürolitin A'nın yeterli mitofaji etkisi gösteremeyeceğini ispat etmiştir (8). Bu yüzden

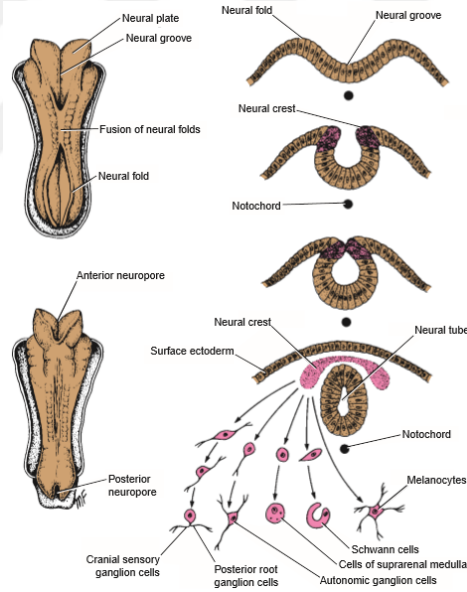
Çalışmamızda hem Nar Ekstresi kullanılıp hem de saf olarak satın alınan Ürolitin A SKH modeline uygulandı. Kemirgen hayvanların barsak mikrobiyotasının Ürolitin A üretmek için yeterli olduğu gösterilmiştir. Nar Ekstresi verilen kemirgenlerin sindirim sisteminde Ellagic Asitin (EA) probiyotikler tarafından dönüştürülmesi ile Ürolitin A oluşmaktadır. Bu yüzden bir hayvandan diğer hayvana oluşan Ürolitin A miktarındaki farklılık her bir hayvanın aldığı EA miktarının farkı ile ortaya çıkabilir. Bu yüzden çalışmamızda kullanılacak Nar Ekstrelerindeki EA miktarı ölçölüp çalışma grubundaki tüm hayvanların eşit miktarda madde alması sağlandı. Çalışmamızın bu karmaşık patolojik durumun aydınlatılmasında ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde katkısı olacağını düşünüyoruz.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Embriyolojisi

Nörülasyon, beyin ve omurilik haline gelecek olan nöral tüpü oluşturma sürecidir. İnsanlarda, döllenmeden sonraki 3. haftada başlar, sinir sistemi ektodermin kalınlaşmasıyla gelişir (9). Daha sonra mezodermin ve notokordun indüklenmesi sonucu nöral plak meydana gelir. Sonrasında nöral plaktan, krista nöralis ve nöral tüp oluşur. Periferik sinir sistemi yani kranial sinirler, spinal sinirler ve otonom gangliyonları krista nöralisin farklılaşması ile oluşurken, beyin ve omurilik yani merkezi sinir sistemi nöral tüpten oluşur (10) (Şekil 1).



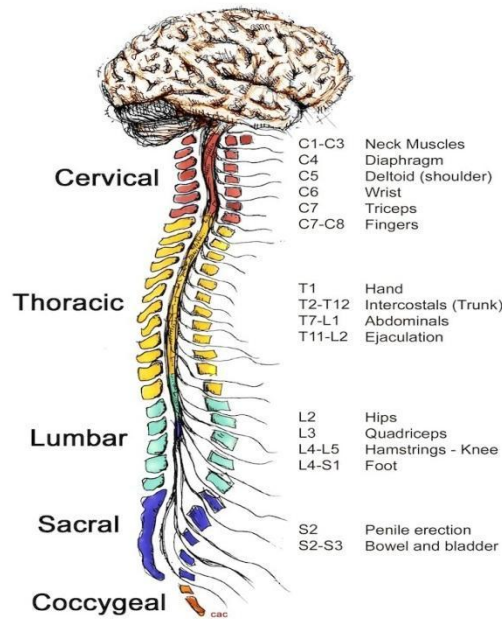
Şekil 1: Sinir sistemi embriyolojisi

Dördüncü embriyolojik haftada nöral tüpün oluşumu tamamlanır. Sonra rostral kısımdan beyin ve beyincik, kaudalinden ise spinal kord oluşur (11). Çevre mezodermden nöral tüp etrafına hücreler göç edip farklılaşarak sulkus limitans oluşturur. Bu sulkusun arkasındaki kısma alar plate, önündeki kısma bazal plate denir (12). Motor sinir hücreleri önden, duyu hücreleri ise arka kısımdan gelişirler. Oluşan yapı farklılaşır santral kanalın

etrafını çeviren kısım gri cevheri, dış kısım ise ak cevheri oluşturur. Nöral tüpün kaudalindeki hücreler kuyruk şeklinde uzanırlar. Embriyolojik sürecin 38. gününde kaudal nöral tüpün retrogresif differansiasyonu, birçok ependimal hücre topluluğu ve lümen distal filum terminale içinde organize olur, konus medullaris oluşur ve santral kanal da son halini alır.

2.2.Spinal Kord Anatomisi

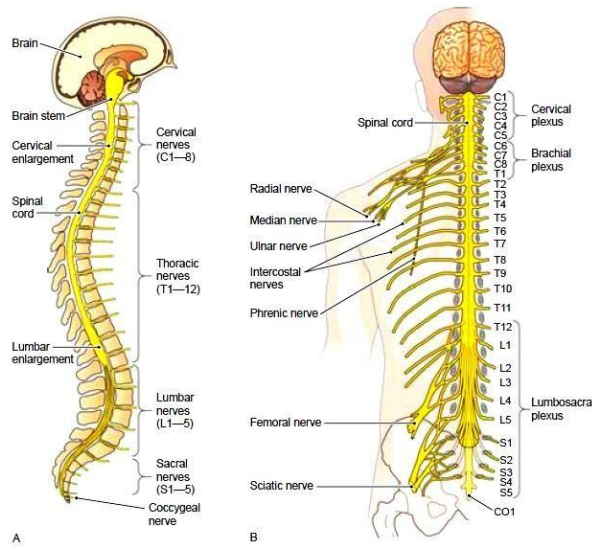
Medulla spinalis vertebral kanalın üçte ikisini kaplayan merkezi sinir sistemi bölümüdür. Erişkinlerde uzunluğu ortalama 40-50 cm olup ağırlığı 30 gram civarındadır (13). Foramen magnumdan başlayıp erişimde L1 vertebranın alt kenarı seviyesinde sonlanır (Şekil 2). Üstte beyin ile devamlılığı mevcutken altta sonlandığı kısım conus medullaris olarak adlandırılır.



Şekil 2: Spinal kord anatomisi

Medulla spinalisin uzunluğu intrauterin dönem 3. Aya kadar vertebral kanala eşittir. Sonrasında vertebral kanal daha hızlı uzar. Doğumda spinal kord yaklaşık L3 seviyesinde sonlanırken, erişkin dönemde L1-L2 vertebralar arası seviyede sonlanır. İnce bir filaman olan

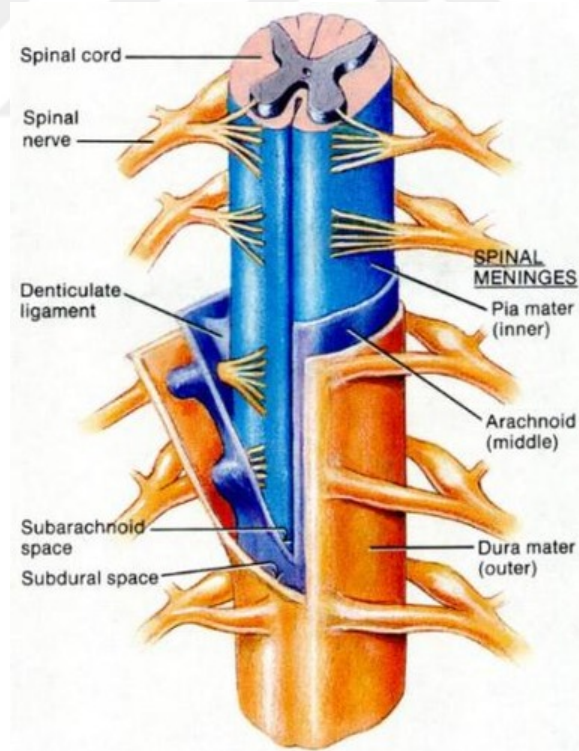
filum terminale conus medullaris apexi ile koksiksin ilk kısmı arasında uzanır. Filum terminale S2 seviyesine kadar intradural devam eder ve filum terminale internus olarak adlandırılırken S2 seviyesinden sonra dura dışına çıkarak filum terminale eksternus olur, koksikte sonlanır (14). Foromenlere transvers olarak uzanım gösteren sinir kökleri vertebral kolon ve omuriliğin gelişimindeki relatif eşitsizliğin sonucunda gelişimin ilerki dönemlerinde yukarıdan aşağıya gittikçe oblikleşir, lumbal ve sakral seviyelerde ise neredeyse vertikal bir hal alır. Omuriliğe tutunduklarındaki oluşturdukları görüntüye ise cauda equina denir. Omurga 7 servikal, 12 torakal, 5 lomber, 5 sakral ve 4 koksigeal olmak üzere 33 vertebradan oluşmaktadır. Ön ve arka köklerin birleşmesiyle bir çift spinal sinir oluşmakta olup 31 çift spinal sinir omurilikten çıkmaktadır. Servikal 1. sinir ve koksigeal sinirlerin arka kökleri bulunmamaktadır. Spinal sinirlerin seviye olarak 8 çifti servikalden ,12 tanesi torakalden, 5 tanesi lomberden, 5 tanesi sakralden ve 1 tanesi de koksigeal segmentten çıkmaktadır (Şekil 3). Servikal 1. çift spinal sinir foramen magnum ile 1 servikal vertebra arasından çıkmaktadır. 8 servikal çift spinal sinir ise 7. servikal vertebra ve 1. torakal vertebra arasından çıkmaktadır. Dolayısıyla servikalde sinirler bir alt seviyedeki vertebranın seviyesi ile söylenmektedir. Torakal ve lomber de bu durum farklıdır. Çıkan kök bir üstteki vertebra seviyesi ile adlandırılır (15). Spinal kordda iki bölgede fazla sinir hücresi barındırma amaçlı çapta genişleme görülür. Bunlara intumesentia servikalis (3. servikal vertebradan 2 torakal vertebraya kadar) ve intumesentia lumbalis (9. torakal vertebradan 12. torakal vertebraya kadar) denir.



Şekil 3: Spinal sinirler A) Lateral görünüm B) Posterior görünüm

2.2.1.Spinal kordun zarları

Spinal kord dıştan içe doğru dura, araknoid ve pia olarak adlandırılan koruyucu mebranlar ile örtülüdür. Fibröz bir mebran olan dura ikinci sakral vertebranın alt hizasında sonlanır. Bu membran vertebral kanal duvarından venöz pleksuslar ve gevşek yağ dokusu içeren epidural boşluk vasıtasıyla ayrılır. Araknoid ise mebranlardan ortada bulunan olup ince ve şeffaf bir yapıdadır ve filum terminalede sonlanır. Subaraknoid boşluk araknoid ve pia zarlarını ayıran BOS içeren biraz daha geniş bir aralıktır. Medulla spinalise yapışıp içine doğru septalar gönderen pia membranlardan en içte olanıdır. Ligamentum denticulatum pia mater tarafından oluşturulan dar bir bant olup lateral yüzeyler boyunca uzanıp seri noktasal çıkıntılar vasıtasıyla duranın iç tarafına bağlanarak omurilik ve dura mater arasındaki bağı sağlamış olur (16) (Şekil 4).



Şekil 4: Medulla spinalis zarları

2.2.2.Spinal kordun iç yapısı

Spinal kord önde anterior median fissür, arkada posterior median sulkus ile iki simetrik bölüme ayrılıp ortada komisural sinir bandıyla birleşen bir yapıya sahiptir (Şekil 5). Transvers kesitleri incelendiğinde spinal kord beyaz ve gri cevherden oluştuğu görülmektedir. Substantia grisea denilen gri madde her iki yarısı hilal şeklinde olup, laterale doğru yönelen konkavitesi ve gri kommissürü ile bir bütün olarak “H” şeklini andırır. Santral kanaldan geçen koronal plandaki hayali bir çizgi bu her iki hilal şeklini bölümlere ayırır. Önde kalan kolumna anterior (anterior kolon) denilen kısım geniş dörtgen şikindedir. Ön kısmına baş denirken arka kısmı taban olarak adlandırılır. Anterior kolonun posterolaterali torakal bölgede lateral kolon adını alarak üçgen bir alan oluşturur (13). Kolumna posterior (anteror kolon) silindirik ve uzun bir yapıdadır ve arkaya, laterale doğru uzanır. Posterolateral sulkus ile arasında Lissauer traktusu denilen ince bir ak madde tabakası bulunur. Apeks, baş, boyun ve taban kısımlarından oluşur. Lateral funikulusa doğru çıkıntılar yapan ak madde retiküler formasyon denilen anterior ve posterior kolonlar arasında bir ağ sistemi meydana getirir (13). Kanalis santralis tüm spinal kord boyunca uzanır. Kanalin önündeki gri madde anterior komissür olarak adlandırılırken arkasındaki gri madde ise posterior komissür olarak adlandırılır. 40 yaşından sonra oblitere olan vertikal uzunluğu 8-10 mm kadar olan konuş medullarisin alt tarafındaki genişlemeye terminal ventrikül denir.

2.2.2.1.Anterior kolon hücreleri

Anteromedial kolon hücreleri, medial kısım olup servikal 4-5 ve servikal 8-lomber 4'te daha belirgin olarak görülür. Lomber 5-sakral 1 de kaybolur ama sakral 2,3,4'te tekrar belirir. Bu kısmın arkasında ise dorsomedial kolon denilen küçük hücrelerden oluşan kolon yer alır. Anterolateral kısımda ise servikal 4,5,6 ve lomber 2 -sakral 2 de olmak üzere iki grup vardır. Posterolateral ise servikalın son beş lomberin son beş ve sakralın üst kısımlarındadır. Santral kısım ise lomber son dört, sakral ilk iki segmenti kapsar. Bu gruplar bacak ve kol kaslarını uyarır (13).

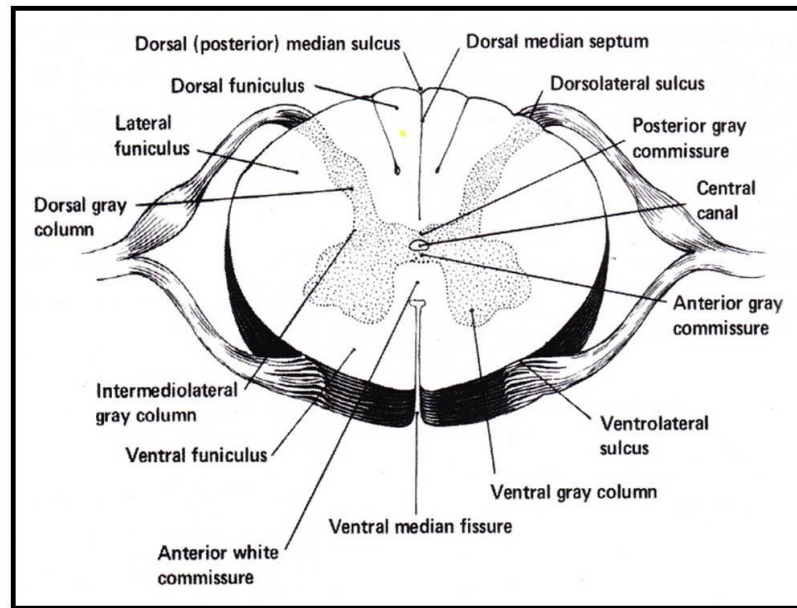
2.2.2.2.Lateral kolon hücreleri

Retiküler formasyonun anteriorunda bütün omurilik boyunca özellikle de torasik bölgede belirgin olarak izlenir. Buradaki hücreler yıldız veya fusiform şeklinde olup sempatik preganglionik liflere de katılır.

2.2.2.3. Posterior kolon hücreleri

Lomber 2 -3 seviyesinde başlayarak torakal 12 düzeyinde maksimum büyüklüğe ulaşır. Torakal 9 seviyesinde kaybolur. Dağınık hücreler servikal 3 seviyesinde bir araya gelerek servikal nükleusu, sakral bölgede bir araya gelerek de sakral nükleusu meydana getirirler. Şekilleri oval olan hücrelerin aksonları ipsilateral lateral funiküstan geçerek yukarıya doğru spinoserebellar fasikülüse doğru uzanırlar. Soliter hücreler posterior kolona yayılmış durumda iken bazıları gruplaşarak posterior bazal kolonu meydana getirirler.

Birkaç çeşit hücre topluluğundan oluşan omuriliğin gri madde bölümündeki nöron tipleri Nissl boyası ile boyanma özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Substantia alba (ak madde) 3 funikulusa (anterior, lateral, posterior) ayrılan süngerimsi bir nöroglia ağının içine gömülmüş sinir hücrelerinden oluşur. En büyük sinir hücreleri anterior funikulusta yer alırken en küçükleri Lissauer traktusunda (fasciculus gracilis) yer alır. Fasikulus veya traktus adı verilen inen ve çıkan yollar funikuluları oluşturur. Anterior ve lateral funikulusta çıkan (afferent) ve inen (piramidal veya efferent) yollar bulunurken posterior funikulusta yalnızca çıkan yollar bulunur. Fissura mediana anteriorun hemen arkasında yer alan dekussasyo komissura alba anterior inen yolların çaprazlaştığı yerdir (13).

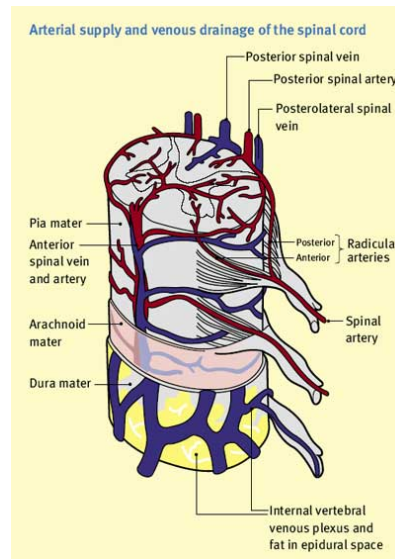


Şekil 5: Medulla spinalisdeki sulcus ve fissurlar

2.2.3. Spinal kordun vasküler yapısı

Spinal kordun beslenmesi bir adet anterior spinal arter, iki adet posterior spinal arter ve radiküler arterler yoluyla olur. Spinal kordun arka 1/3' lük kısmını besleyen posterior spinal arter arteria vertebralisten direk olarak veya arteria inferior posterior cerebellilerden indirekt olarak çıkar. Spinal kordun ön 2/3' lük kısmını besleyen anterior spinal arter ise kafatası içinde her iki arteria vertebralisten çıkan arterlerin birleşmesi ile oluşur. Her bir intervertebral foromende küçük segmenter arterler ile desteklenen anterior ve posterior spinal arterler orta hatta longitudinal olarak uzanırlar. Diğer önemli bir besleyici arter olan Adamkiewicz arteri (arteria radicularis magna) aortadan üst lomber veya alt torasik düzeylerden tek taraflı olarak çıkar, genellikle omuriliğe sol taraftan girer. Spinal kordun torakal 8 ve konus medullaris arasında kalan alt 2/3 'lük kısmının ana besleyicisidir. Watershed zone olarak adlandırılan ve tek besleyicisi torakal 4 ve 5 seviyesindeki radiküler arterler olup, nispeten daha az beslenmesi nedeniyle orta torakal bölge vasküler hasara daha yatkındır (17).

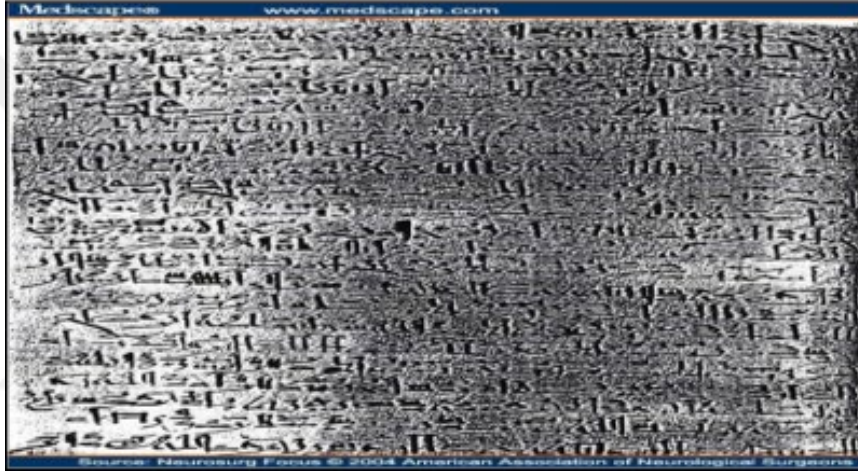
Spinal kordda venler arterlere eşlik ederler ve isimlendirilirken arterler ile aynı isimleri alırlar. Longitudinal venler üstte vertebral venve internal juguler ven aracılığı ile vena cava süperiora açılır. İntervertebral venler olarak adlandırılan her segmentten ayrılan venler hem foromenden kanal dışına çıkarak lomber, sakral, servikal ve interkostal venlere açılıp hem de internal vertebral venöz pleksus yoluyla vena kava inferiora dökülür (17). (Şekil 6).



Şekil 6: Spinal kordun arter ve venleri

2.3.Spinal Kord Yaralanmasının Tarihçesi

Eski çağlardan beri insanlığın karşılaştığı spinal travmaların tanı ve tedavisi hakkındaki çalışmalar antik döneme kadar uzanır. İlk yazılı belge MÖ 2686-2613 yılları arasında yaşamış olan mimar, astrolog ve aynı zamanda firavunun özel hekimi olan İmhotep tarafından yazıldığı düşünülen Edwin Smith cerrahi papirüsüdür. (18). (Şekil 7). Bu belgede 48 olgudan bahsetmekte olup 6 'sı omurga kırığıdır (19).

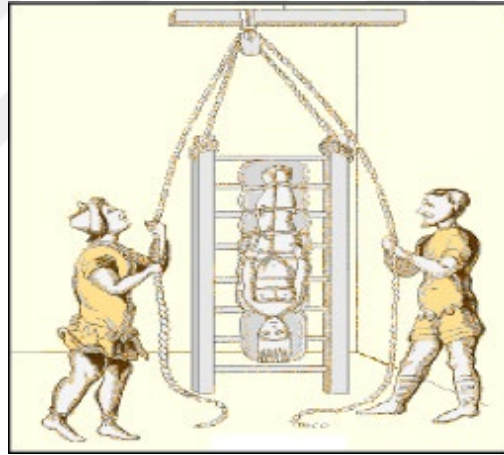


Şekil 7: Edwin Smith cerrahi papirüs belgesi

Milattan önce 400'lü yıllarda Hipokrat paraplejiyi tanımlamış olup travmaya bağlı olarak ortaya çıkan deformitlerde traksiyon yöntemleri denemiştir (20) (Şekil 8). Hipokratın teorilerini savunan Aulus Cornelius Celsus (M.Ö. 30) traksiyon cihazları geliştirmiş olup özellikle servikal travmalar sonrası akut solunum yetersizliğine bağlı ani ölüm gelişebileceğini söylemiştir (21).

Alen spinal kord kesileri ile ilgili deneyler yapmış olup kesilen segmentlerin altında motor ve duyu kaybı olduğunu göstermiştir (22). Aretaeus (M.S. 81-138) ilk defa spinal kord hasarında seviye tanımını yapan kişi olup bazı yaralanmalarda ipsilateral defisitini gösteren kişidir. Hipokrat olarak bilinen Galen de (M.S. 130-200) deneysel fizyolojinin babasıdır. Çalışmalarında spinal kord seviyelerine göre nörolojik defisitleri tarif etmiş olup alt komplet kord lezyonunu da tarif etmiştir. Çalışmalarında longitudinal ve transvers yaralanmaları

karşılaştırmış olup trasnvers yaralanmaların daha çok defisite neden olduğunu saptamış. Aynı zamanda üst seviyelerdeki hasarın alt seviyelerdekine göre daha önemli olduğunu saptamıştır (23). Egeli Paulus (625-690) traksiyon ile kord hasarının önlenemeyeceğini savunmuş olup dekopmresif cerrahi fikrini ortaya koymuştur. 1890 yılında Schamus tarafından tavşan spinal korduna travma uygulanıp gelişen patolojik değişiklikler gözlenerek yapılan çalışma bu konudaki ilk patofizyolojik çalışmadır (24). Allen 1911 yılında köpeklere laminektomi yapıp kord üzerine ağırlık düşürerek hasar oluşturmuştur. Daha sonra travma sonrası gelişen hematomyeli dekopresyonu sonrası klinik düzelme olduğunu saptamıştır (25,26). 1978 yılında Rivlin ve Tador klip ile spinal kord hasarı modelini geliştirmiş olup bu modelde hem lezyon hem de iskemi gelimesiyle insan spinal kord hasarı patofizyolojisine en yakın modeldir. Aynı zamanda kompresyon süresinin ve gücünün belirlenebilmesinden dolayı istenilen şiddette lezyon oluşturabilme olanağına sahip bir modeldir.



Şekil 8: Hipokrat'ın tarif ettiği traksiyon yönetemi (temsili)

2.4.Spinal Kord Yaralanmalarının Klinik Sınıflaması ve Sendromları

Spinal kord hasarlı hastaların değerlendirilmesi ve klinisyenler arasında ortak bir dil oluşturmak amacıyla standart skalaların gereği doğmuş olup ilk olarak 1969 yılında Frankel tarafından bir değerlendirme ölçeği geliştirilmiştir. Günümüzde ise spinal kord hasarı olan hastaların nörolojik muayensinde ve sınıflanmasında The American Spinal Injury Association (ASIA) tarafından belirlenen International Standards for Neurological Classification of Spinal

Cord Injury (ISNCSCI) önerilmektedir. Çeşitli revizyonlara uğrayıp 2013 yılında en son halini alana bu ölçek Gündüz ve ark. tarafından Türkçeye çevrilmiştir (27) (Şekil 9).

ASIA OMURİLİK YARALANMASI NÖROLOJİK SINIFLAMASI İÇİN ULUSLARARASI STANDARTLAR **ISCS** (ISNCSCI)

Hasta adı _____ Değerlendirme tarihi/saati _____
Değerlendiren _____ İmza _____

SAG

MOTOR

Dirsek fleksörleri C5
El bilek ekstansörleri C6
Dirsek ekstansörleri C7
Parmak fleksörleri C8
Parmak abduktörleri (açık parmak) T1

UEĞ
(Üst Ekstremité Sağ)

AEG
(Alt Ekstremité Sağ)

Kalça fleksörleri L2
Diz ekstansörleri L3
Ayak bilek dorsifleksörleri L4
Başparmak uzun ekstansörleri L5
Ayak bilek plantar fleksörleri S1

(İAK) İstemsiz anal kontraksiyon (Evet/Hayır)

SAG TOPLAM (MAKSİMUM) (50) (56) (56)

MOTOR ALT SKORLAR
UEĞ + ÜEL = ÜEMS TOPLAM (50) MAKS (25)
AEG + AEL = AEMS TOPLAM (50) MAKS (25)

Anahtar Duyusal Noktalar

DUYUSAL

ANAHTAR DUYUSAL NOKTALAR
Haff Dokunma (H) İğne batırma (İ)

C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
L1
L2
L3
L4
L5
S1
S2
S3
S4-5

DUYUSAL

ANAHTAR DUYUSAL NOKTALAR
Haff Dokunma (H) İğne batırma (İ)

C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
T1
T2
T3
T4
T5
T6
T7
T8
T9
T10
T11
T12
L1
L2
L3
L4
L5
S1
S2
S3
S4-5

SOL TOPLAM (MAKSİMUM) (50) (56) (56)

DUYUSAL ALT SKORLAR
HDG + HDL = HD TOPLAM (112) MAKS (56)
İBG + İBL = İB TOPLAM (112) MAKS (56)

NÖROLOJİK SEVİYELER
Sınıflama için 1-5 basamaklar. Aşağı sayfada

1. DUYUSAL 2. MOTOR

3. NÖROLOJİK YARALANMA SEVİYESİ (NYS)

4. KOMPLET VEYA İNKOMPLET?
İnkomplet: S4-5'te duyu ve/veya motor fonksiyon

5. ASIA BOZUKLUK SKALASI (ABS)

(Bazıca banyo için yaralanma) **KİSMİ KORUNMA ALANI**

Herhangi bir inervasyon alanı en alt seviye

DUYUSAL
MOTOR

Bu form çoğaltılabilir fakat American Spinal Injury Association'ın izni olmadan değiştirilemez.
Bu form American Spinal Injury Association izni ile Türkçe'ye çevrilmiştir (B Gündüz, B Erhan)

Şekil 9: Spinal kord hasarında nörolojik sınıflama ölçeği

İyileşmenin gözlenmesi, prognoz tayini, tedavi seçimi ve klinik olarak ortak bir dil oluşması açısından bu değerlendirme önemlidir. Motor ve duyu muayenesi nörolojik muayenin önde gelen komponentleri olup hasta sırt üstü yatar pozisyonda yapılır. Motor muaye için standartlara göre sağda ve solda 10'ar (5 alt ve 5 üst ekstremité) adet olmak üzere anahtar kaslar belirtilmiştir (Tablo 1). Anahtar kas gücü muayenesinde değerlendirilecek eklem belirlenen standart pozisyonda muayene edilip kasların gücü manuel olarak değerlendirilir. Bu değerlendirmeler sonucu 0-5 arasında puanlanır (Tablo 2).

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

Tablo 1: ASIA ISNCSCI' ye göre anahtar kaslar

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

Tablo 2: ASIA ISNCSCI'de kullanılan kas gücü evrelemesi

ASIA skalasının 2013 teki revizyonunda değişiklikler olmuş olup nörolojik seviye tanımı önceki versiyonlarına göre daha ayrıntılı bir biçimde tanımlanmıştır (28). Son versiyonda öncekilerden farklı olarak anahtar olmayan kaslar da tanımlanmıştır (Tablo 3).

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

Tablo 3: Anahtar olmayan kaslar

Anahtar olmayan kaslar da ASIA seviyesinin belirlenmesinde önemlidir (ASIA B ve C ayrımında). Duyu muayenesinde de iki taraflı 28'er adet anahtar nokta kullanılmaktadır (Tablo 4). Muayenede pin-prick (iğne batması) ve hafif dokunma değerlendirilirken her dermatom için ayrı ayrı standart noktalara bakılır. Muayene sırasında hastanın gözlerini kapaması istenerek hafif dokunma duyusu bir parça pamuğun değerlendirilecek alana değdirilmesi ile yapılır. Keskin/künt ayrımı çengelli iğne yardımıyla iğnenin hem yuvarlak hem iğne bulunan kısmı dokundurularak hissedip hissetmediği, sivri/künt ayrımını yapıp yapamadığı sorularak yapılır. Şüpheli durumlarda bu muayene 10 kez yapılır ve verilen 8 doğru cevap yeterli olarak değerlendirilir. Duyu muayeneleri tablo 5 ve 6'daki gibi puanlanır

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

Tablo 4: Anahtar duyu noktaları

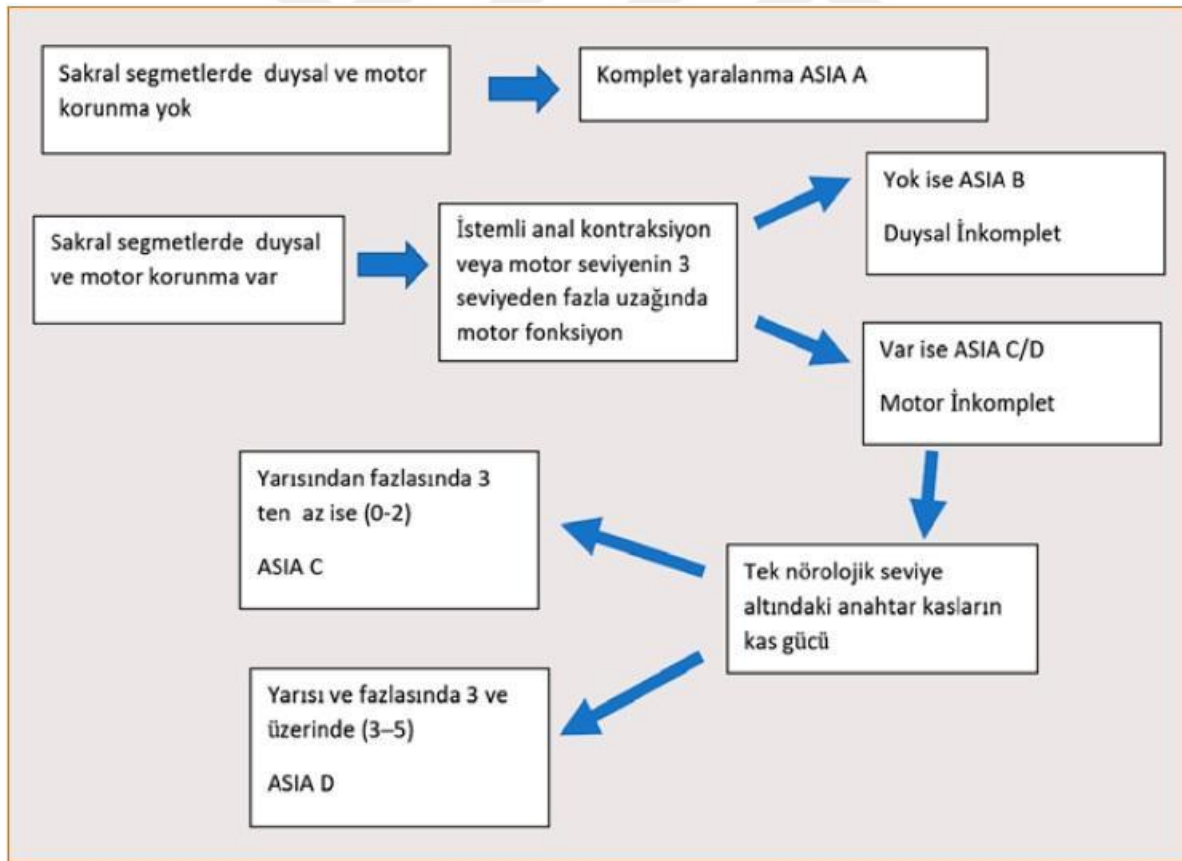
0	Yok	Hasta doğru veya güvenilir biçimde dokunmayı tarif edemiyor.
1	Bozulmuş	Hasta doğru bir şekilde dokunulduğunu ifade ediyor, fakat yanağa dokunulduğundan farklı olduğunu vurguluyor (daha fazla, daha az gibi)
2	Normal	Hasta doğru bir şekilde dokunmayı ifade ediyor ve yanak ile aynı olduğunu söylüyor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

Tablo 5: Hafif dokunma duyusu puanlanması

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

Tablo 6: İğne duyusunun puanlanması

Bu değerlendirmeler dışında istemli anal tonus ve kontraksiyon da değerlendirilerek nörolojik muayene tamamlanır. Daha sonra bu muayene verilerine göre hastalar ASIA A, B, C, D, E olmak üzere 5 sınıfta değerlendirilirler. S4, S5 seviyesinde motor veya duysal hiçbir fonksiyon korunmadıysa hasta ASIA A olarak değerlendirilir. S4, S5 seviyesinde pin-prick, derin anal basınç veya hafif dokunma duyularından biri korunmuş olup motor hareketler korunmamış ise hasta duysal inkomplet olarak değerlendirilir ve ASIA B olarak sınıflanır. Duysal inkomplet olup ipsilateral motor seviyenin ten fazla seviye altında motor yanıt korunmuş hastalara motor inkomplet denir (anahtar olmayan kaslar da motor inkompletin belirlenmesinde kullanılabilir). Hastaların hasarlı omurilik seviyelerinin altındaki anahtar kasların yarisından daha azının kas kuvveti 3/5 ve üzerinde ise ASIA C, bu kasların yarısının veya daha fazlasının kas kuvveti 3/5 ve üzerinde ise ASIA D olarak sınıflandırılırlar. Motor ve duyu muayenesinde normal olan hastalar ASIA E olarak sınıflandırılırlar (29) (şekil 10).

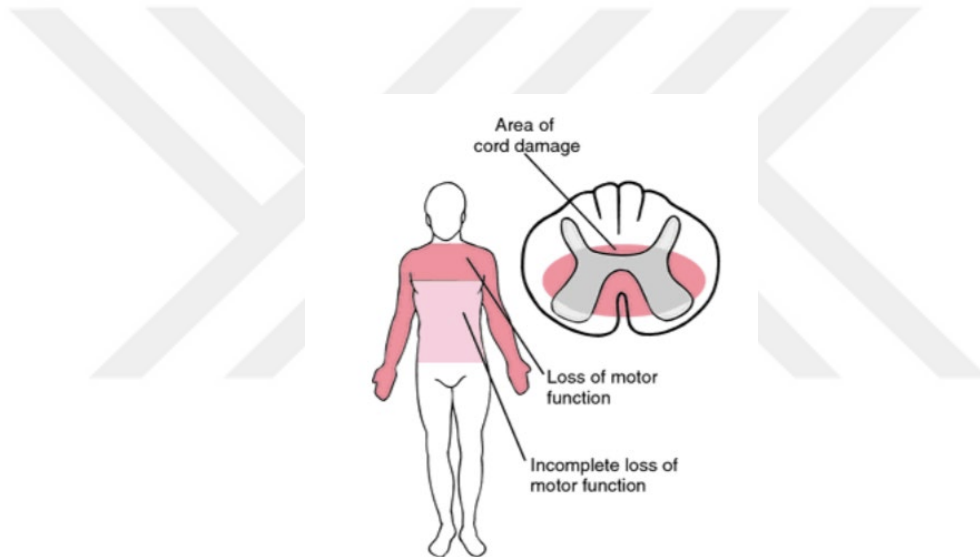


şekil 10: ASIA sınıflaması

Bazı kliink sendromların bilinmesi ASIA sınıflamasında yer almasa da inkomplet yaralanmaların değerdendirilmesi aından önemlidir. ISNCSCI 2011 versiyonunda bu sendromlar yer alır (30).

2.4.1.Santral kord sendromu

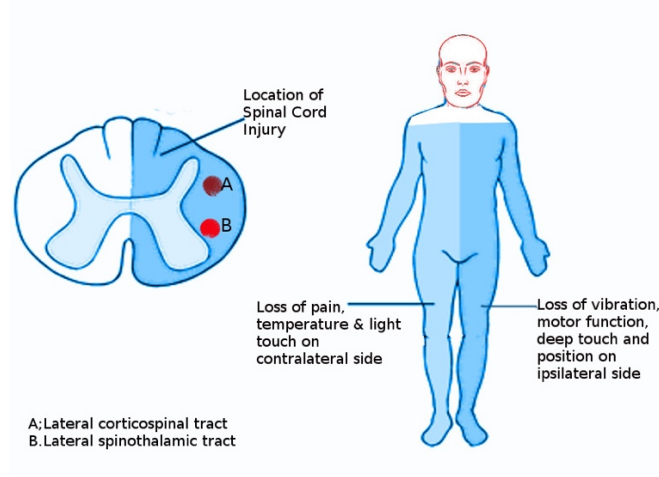
En sık görülen inkomplet spinal kord hasarı tipidir. Sıklıkla yaşı spondilozisi olan hastalarda genellikle hiperkestansiyon yaralanmalarından sonra meydana gelir. Tipik özelliği st ekstremitelerde motor ve duyuşal fonksyonlar bakımından alt ekstremitelerden daha fazla etkilenir (31) (Şekil 11).



Şekil 11: Santral kord sendromu

2.4.2.Brown-Sequard sendromu

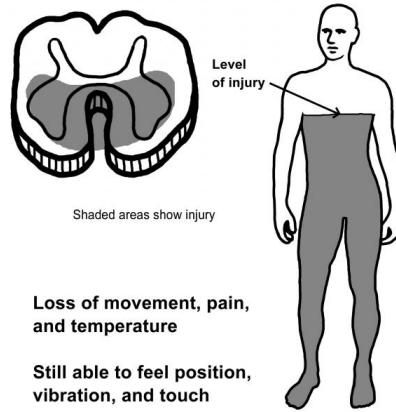
Spinal kordun yarı kesisi ile karakterize sendromdur. Yaralanmanın olduğu seviyenin altında spinotalamik traktusun, lateral kortikospinal traktusun ve çıkan yollardan dorsal kolonun etkilenmesi sonucu yaralanma seviyesinin altında ipsilateral propriyosepsiyon, vibrasyon ve motor kaybı, karşı tarafta ise ısı ve ağrı duyuşu kaybı mevcuttur. Bütün omurilik yaralanmaları içinde en yüksek iyileşme şansına sahip sendromdur (32) (Şekil 12).



Şekil 12: Brown-Sequard sendromu (BSS)

2.4.3. Anterior kord sendromu

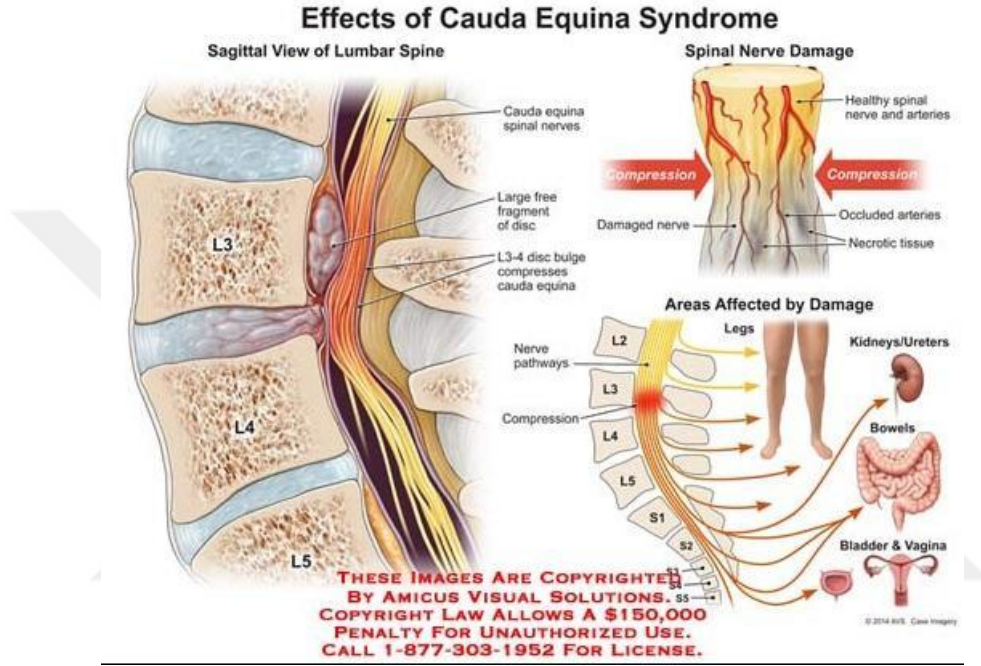
Spinal kordun ön 2/3 'lük kısmının etkilenmesi sonucu oluşan lezyon seviyesinin altında ağrı ve ısı duyusu kaybı ile birlikte motor etkilenme olan sendromdur. Posteripr kolonun korunmasından dolayı iki nokta ayırımı, vibrasyon duyusu, pozisyon ve dokunma duyusu korunmuştur. Anterior spinal arterin etkilenmesine bağlı yada fleksiyon yaralanmaları, kemik parçalarına veya disk kompresyonuna bağlı direk travma sonucu oluşur. Prognozu kötüdür. Vakaların yaklaşık %10-20'sinde motor iyileşme görülebilir (33) (Şekil 13).



Şekil 13: Anterior kord sendromu

2.4.4.Kauda ekina sendromu

L1-S5 periferik sinirlerini içine alan kauda ekina isimli yapının etkilendiği, alt motor nöron etkilenmesi sonucu arefleks mesane, flaks paralizi, barsak ve duyu etkilenmelerinin görüldüğü klinik tablodur. Bulbokavernöz refleks ve anal refleks kaybı görülür (Şekil 14).



Şekil 14: Kauda ekina sendromu

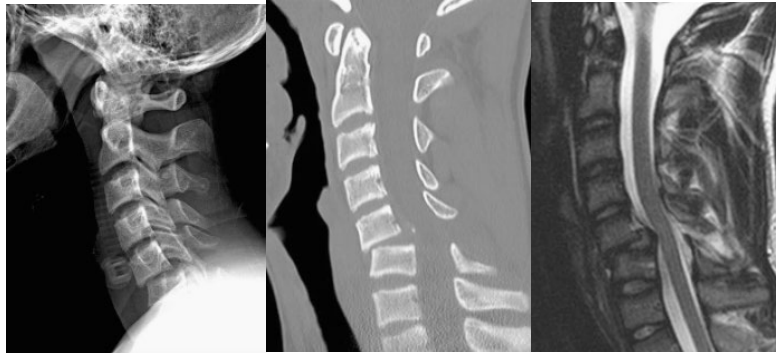
2.4.5.Konus medullaris sendromu

Etkilenme kauda ekina sendromuna göre daha rostraldir ve daha fazla sıklıkta simetrik tutulum gözlenir. T12-L2 arasındaki yaralanmalar sonrasında meydana gelebilir. Yaralanma seviyesine göre alt ve üst motor nöron etkilenim bulguları görülebileceği gibi yüksek seviyedeki konus medullaris etkilenimlerinde refleksler (anal ve bulbokavernöz refleks) korunmuş kalabilir. (34)

2.5.Spinal Kord Yaralanmalarında Fonksiyonel Değerlendirme ve Tanı

Spinal kord yaralanmalarında çeşitli ölçeklerle fonksiyonel durum değerlendirilebilir. Bu ölçeklendirmelerden bazıları spinal kord yaralanmalarına özđü iken bazıları genel fonksiyonel değerlendirme ölçekleridir. Modifiye Barthel ve Fonksiyonel Bağımsızlık Ölçeği genel fonksiyonel değerlendirme ölçekleri arasında iken Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği (SCIM), Kuadripleji Fonksiyonel İndeksi ve Spinal Kord Yaralanması İçin Yürüme İndeksi spinal kord yaralanması olan hastalara özđüdür (35,36). Hadley ve ark. yaptıkları derlemede kendine bakım, mobilizasyon, respirasyon ve sfinkter kontrolü olmak üzere üç alt başlık ve toplamda 17 sorudan oluşan SCIM III (Spinal Kord Bağımsızlık Ölçeği III) ‘ü önermektedirler (37). SCIM III’ün spinal kord yaralanması olan hastalarda geçerli, duyarlı ve güvenilir olduğu Bluvstein ve ark. tarafından 261 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada yüksek kanıt düzeyi ile gösterilmiştir (38).

Spinal kord yaralanması şüphesi olan olgularda tanı ve lezyon seviyesinin tespiti açısından radyolojik görüntülemeler yapılmalıdır. Özellikle bilinci kapalı şüpheli spinal kord yaralanması olan tüm hastaların tüm spinal aksı taranmalıdır. Öncelikli olarak direk grafi değerlendirmesi yapılıp şüpheli alanlara detaylı tarama açısından BT çekilmelidir. Kemik fraktürü en iyi BT gösterirken gerekli hastalarda çekilmesi gereken nöronal hasarlanma, hematoma, disk hernisi ve ligament hasarı gibi yumuşak doku patolojilerini en iyi MRG gösterir (şekil 15).

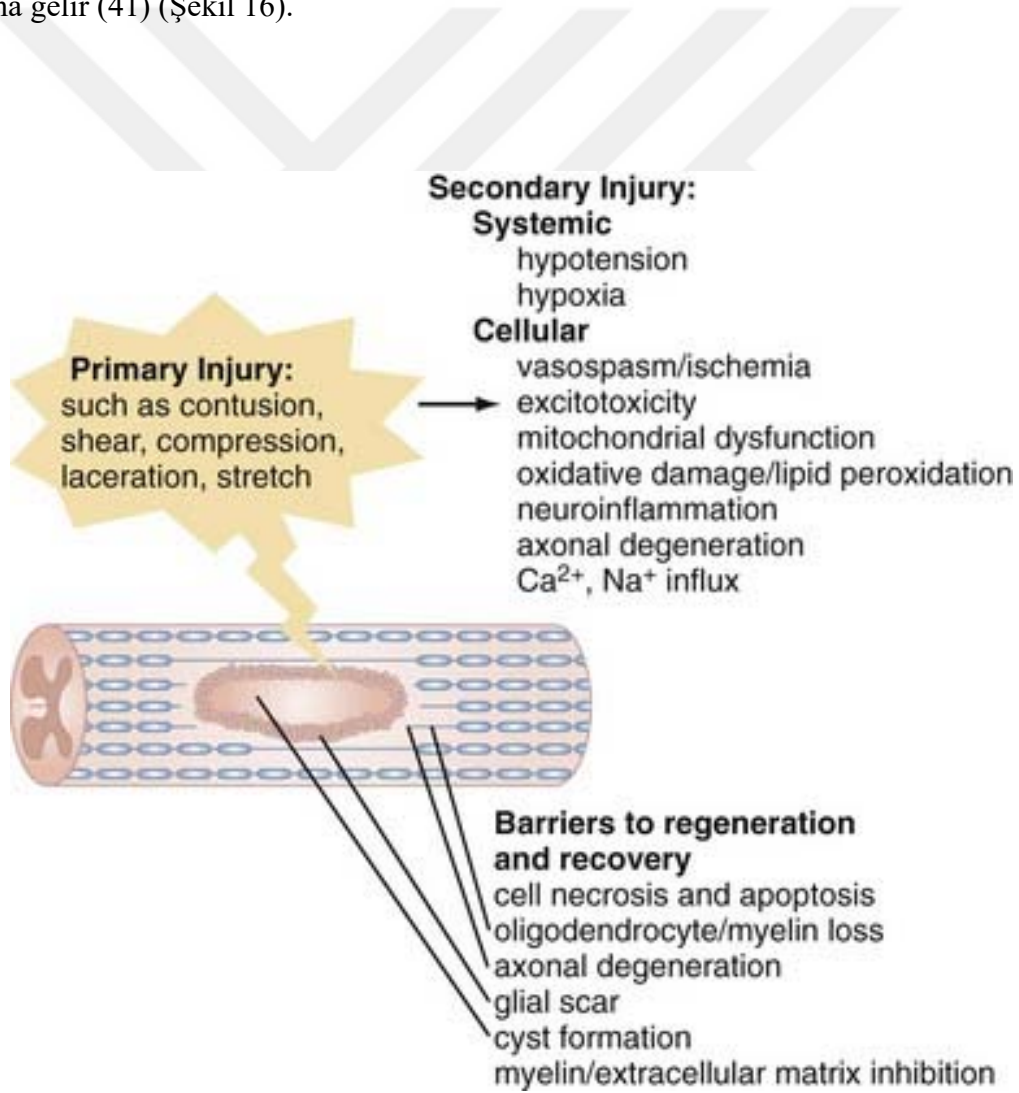


şekil 15: Spinal kord yaralanması vakası Röntgen, BT ve MRG görüntülemeleri

2.6.Spinal Kord Yaralanmalarının Fizyopatolojisi

2.6.1.Primer yaralanma

Uzun yıllar boyunca bilimsel araştırmaların önemli konularından olan spinal kord hasarının mekanizmasının ve oluşum sürecinin anlaşılması tedavi çözümleri için önemli faydalar sağlayacaktır. Spinal kord yaralanmalarının fizyopatolojisi “bifazik yaralanma” olarak adlandırılan primer (direkt) ve sekonder (indirekt) yaralanmadan oluşan bir mekanizma ile açıklanmaktadır. (39,40). Direkt hasar yani primer hasar mekanik etkiyle oluşurken indirekt hasar bir takım hücresel reaksiyonlar ve biyokimyasal sürecin direkt hasar üzerine eklenmesiyle meydana gelir (41) (şekil 16).

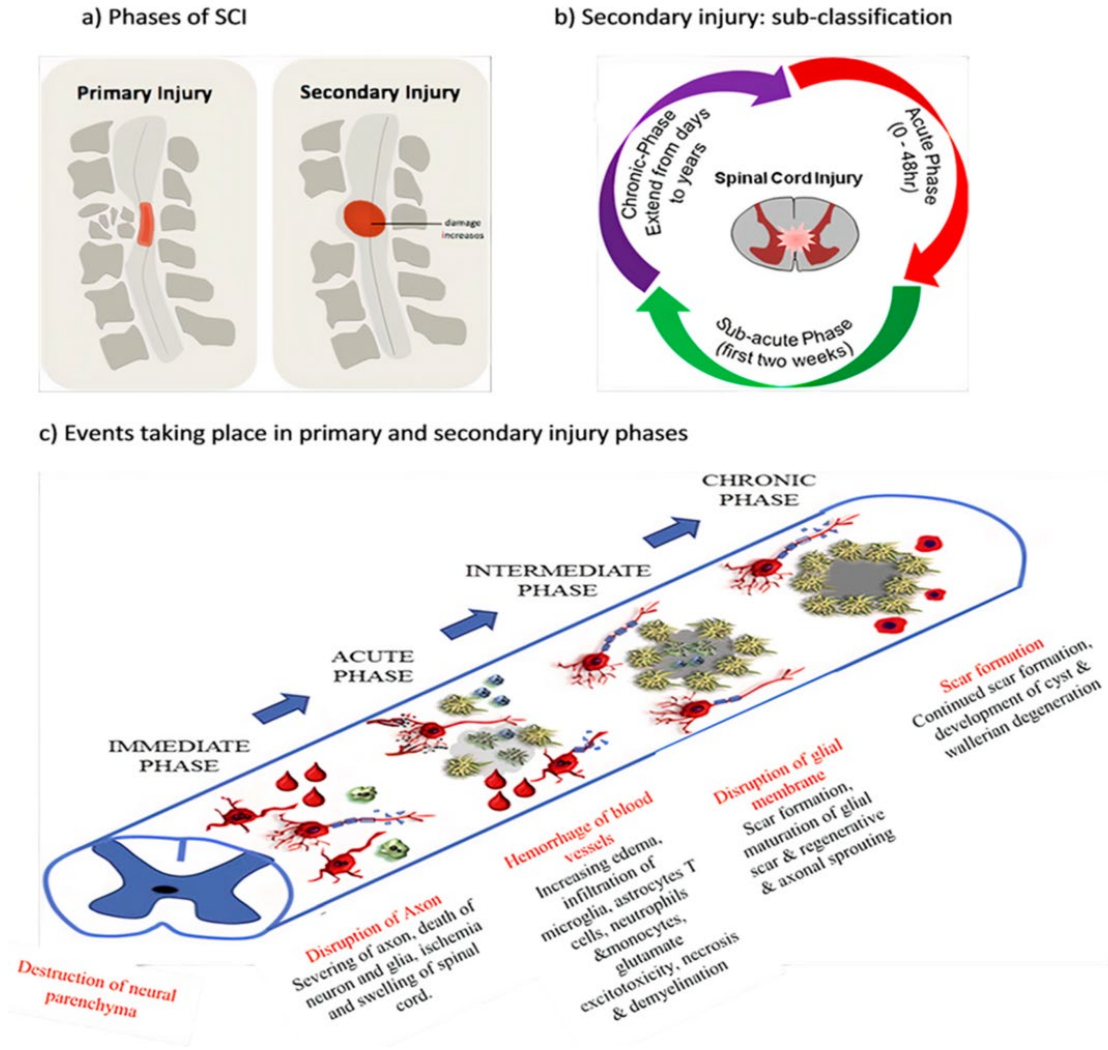


şekil 16: Spinal Kord Hasarın Patofizyolojisi

Spinal korda alınan darbe sonrası oluşan ilk mekanik hasara primer yaralanma denilir. Oluşan travmaya bağlı olarak spinal kord ve/veya çevresi etkilenebilir. Meydana gelen hasarın şiddeti çeşitli biyomekanik faktörlere bağlıdır (42). Spinal kord yaralanmalarında en sık görülen yaralanma mekanizması darbe sonrasında devam eden spinal korda basıdır (43). Hasar genellikle fleksiyon, ekstansiyon, distraksiyon, aksiyel yüklenme ve rotasyon sonucu meydana gelir. Travmanın şiddetine bağlı olarak oluşan mekanik kuvvet aksonal hasara, hücre ve doku bütünlüğünde bozulmaya, vasküler yaralanmaya, hücre membran bütünlüğünün bozulmasına ve ödeme sebep olur. Bu etkilenimlerin bütünü primer hasar olarak adlandırılır (44,45). Primer hasarın derecesi sebep olan etkinin gücünün genliğine, etki etme süresine ve spinal kord tarafından absorbe edilen enerjinin miktarına bağlıdır (46). Primer hasarın herhangi bir cerrahi ya da medikal tedavisi olmadığından dolayı tüm çalışmalar sekonder hasarı önlemeye yönelik sonuç elde etmeye yoğunlaşmıştır.

2.6.2.Sekonder yaralanma

1911 yılında ilk defa Allen tarafından sekonder yaralanma tanımı ortaya atılmıştır (47,48). Primer yaralanma sekonder yaralanmayı tetikler, bu da spinal dokularda daha fazla kimyasal ve mekanik hasar üretir. Hücreler içinde yüksek kalsiyum birikimi, nöronal eksitoksisiteye yol açar. Reaktif oksijen radikallerini ve glutamat seviyelerini artırır. Bunun sonucunda nükleik asitler, proteinler ve fosfolipidler zarar görür ve bu durum nörolojik işlev bozukluğu ile sonuçlanır (49). Sekonder yaralanma primer yaralanmayı takip eden daha uzun süren karmaşık bir patolojik süreçtir. Sekonder yaralanma üç faza ayrılır: akut, subakut ve kronik faz. Sekonder hasarın akut fazını vasküler hasar, iyonik dengesizlik, eksitotoksisite, serbest radikal üretimi, artan kalsiyum akışı, lipid peroksidasyonu, inflamasyon, ödem ve nekroz gibi klinik özelliklerle kendini gösterir (50). Sekonder hasarın subakut fazı nöronal apoptoz, aksonal demiyelinizasyon, aksonal yeniden şekillenme ve glial skar oluşumu gibi özelliklerle kendini gösterir. Kronik faz ise kistik boşluk oluşumu, Wallerian dejenerasyon ve glial skarın olgunlaşması ile karakterizedir. (Şekil 17)



Şekil 17: Spinal kord hasarında primer ve sokonder yaralanma fazları

Spinal kord hasarı sonrasında nöronal hasara sebep olan mekanizmaların anlaşılması, tedavi şekillerinin geliştirilmesinde en önemli noktalardan biridir. Birçok fizyopatolojik mekanizmanın sekonder yaralanmada rol aldığı gösterilmiştir (51,52). Aşağıdaki tabloda sekonder yaralanma oluşumunda etkili olan mekanizmalar özetlenmiştir (Tablo 7).

Sistemik etkiler (Nörojenik şok)

- Kısa süreli taşikardi, daha sonra uzun süreli bradikardi
- Kısa süreli bradikardi, sonra uzun süreli hipotansiyon
- Periferik dirençte azalma
- Kardiak debide azalma

Omurilik Dolaşımında Lokal Vasküler Hasar

- Kapiller ve venüllerde mekanik bozulma
- Mikrodolaşımında kayıp: mekanik, tromboz, vazospazm
- Özellikle gri cevherde hemoraji

Biyokimyasal Değişiklikler

- Serbest radikal üretimi
- Lipid peroksidasyonu
- Nörotransmitter birikimi
- Eksitotoksitite: glutamat
- Araşidonik asit salınması
- Ketakolaminler: noradrenalin, dopamin
- Prostaglandinler
- Eikazanoid üretimi
- Endojen opioidler
- Sitokinler

Elektrolit

- İntasellüler kalsiyumda artış
- İntasellüler sodyumda artış
- Ekstrasellüler potasyumda artış

Yangısal Yanıt

- Serbest Radikal üretimi
- Makrofajlar
- Aksonal Yıkım
- Sitokinlerin Salınması
- Miyelin Artıklarının Salınımı
- Glial hücre aktivasyonu
- Wallerian dejenerasyon
- Oligodendrositlerde sitotoksik etkiler

Ödem, Apoptozis, Enerji Metabolizmasında Kayıp

Tablo 7: Spinal kord yaralanmalarında sekonder hasar mekanizmaları

2.6.3.Sistemik etkiler

Spinal kord yaralanması yaralanmanın seviyesine ve şiddetine bağlı olarak birçok kardiyovasküler ve hemodinamik etkiye neden olabilir. Özellikle servikal bölgeyi etkileyen komplet yaralanmalar nörojenik şok tablosuna neden olabilir. Karşımıza çıkan en önemli hemodinamik ve kardiyovasküler sonuçlar nörojenik şok sonucu oluşur. Sempatik tonusun azlaması, kardiak out-put'un düşmesi sonucunda hipotansiyon meydana gelir. Oluşan hipotansiyon yaralanmadan hemen sonra oluşurken haftalarca sürebilir (53,54,55). Meydana gelen bu sistemik değişikliklerin iyi bilinmesi ve tedavisi, travma sonrası oluşan iskeminin daha da ilerlememesi açısından oldukça değerlidir.

2.6.4.Lokal vasküler etkiler

Travma sonrası erken ve geç safhalarda spinal kordda vasküler hasara bağlı değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişikliklerden en sık görüleni özellikle spinal kordun santralinde ve gri cevher de görülen hemorajidir. Mekanik darbenin ilk etkisiyle kapiller, venüller ve arterioller gibi mikrovasküler düzeyde yırtılmalar oluşup saatler içinde meydana gelen hemorojide ilerleme görülür. Daha nadir olarak anterior spinal arter gibi büyük damarlar da zarar görebilir (57,58). Travmanın etkisiyle mikrovasküler düzeydeki mikrosirkülasyon bozulması sadece travma alanında değil etkilenen alanın kaudal ve rostralinde de görülür. Bu mikrosirkülasyon bozulmasına direk travma etkisine bağlı meydana gelen vazospazmın yanında, ortaya çıkan katekolaminler , prostaglandinler ve glutamata bağlı da ortaya çıkan vazospazm da sebep olur (57).

2.6.5.Biyokimyasal etkiler

Elektrofizyolojik çalışmalara nörotransmitter olarak görev yapan aminoasitlerin monokarboksilik olan inhibitör (Gama aminobütirik asit, Glisin, Taurin, Prolin, B-Alanin) ve iki karboksilik asit içeren eksitatör (L-Aspartik asit, L-Glutamik asit) olarak iki grupta toplanabileceğini göstermişleridir. Eksitatör aminoasit birikimi biyokimyasal hasar teorileri

içerisinde önplanda düşünülen teoridir (59). Beyinde ve spinal kordda düzensiz dağılım gösteren spinal kordda yaralanma sonrası oluşan iskemide artarak eksitoksisite mekanizmasını aktive eden eksitator aminoasitlerden glutamat ve aspartat, glutamat spinal kordda özellikle arka köklerde yüksek oranda bulunur (60). Yaralanmanın şiddeti ile doğru orantılı olarak glutamat ve aspartat salınımı artar. Ağır yaralanmalarda 10 kat artış görülürken orta şiddetli travmalarda bu artış 2-4 kat seviyesinde olur. Bu artışa bağlı eksitoksisitenin birçok nörolojik hastalıklarda (inme, epilepsi, nörodejeneratif hastalık vb) nöron hasarını artırdığı düşünülmektedir (61). Glutamattaki artış hücre içine sodyum ve kalsiyum girişini artırır. Hücre içine sodyum girişinin artması sitotoksik ödem yaparken kalsiyumdaki yükselme nöroflamanların ve hücre membranının hasarına sebep olur (62).

Sinir sisteminde ana inhibitör transmitter olan Gama Amino Bütirik Asit (GABA) 'nın iyonotropik olan GABA_A ve GABA_C ve metabotropik olan GABA_B reseptörleri vardır. Örneğin benzodiazepinler GABA_A'ya etki ederek hücre içine klor akışını artırır. Bu sayede sedatif, antikonvülzan, kas gevşetici ve güçlü anksiyolitik etki yaparlar.

2.6.6. Elektrolit dengesizlikleri

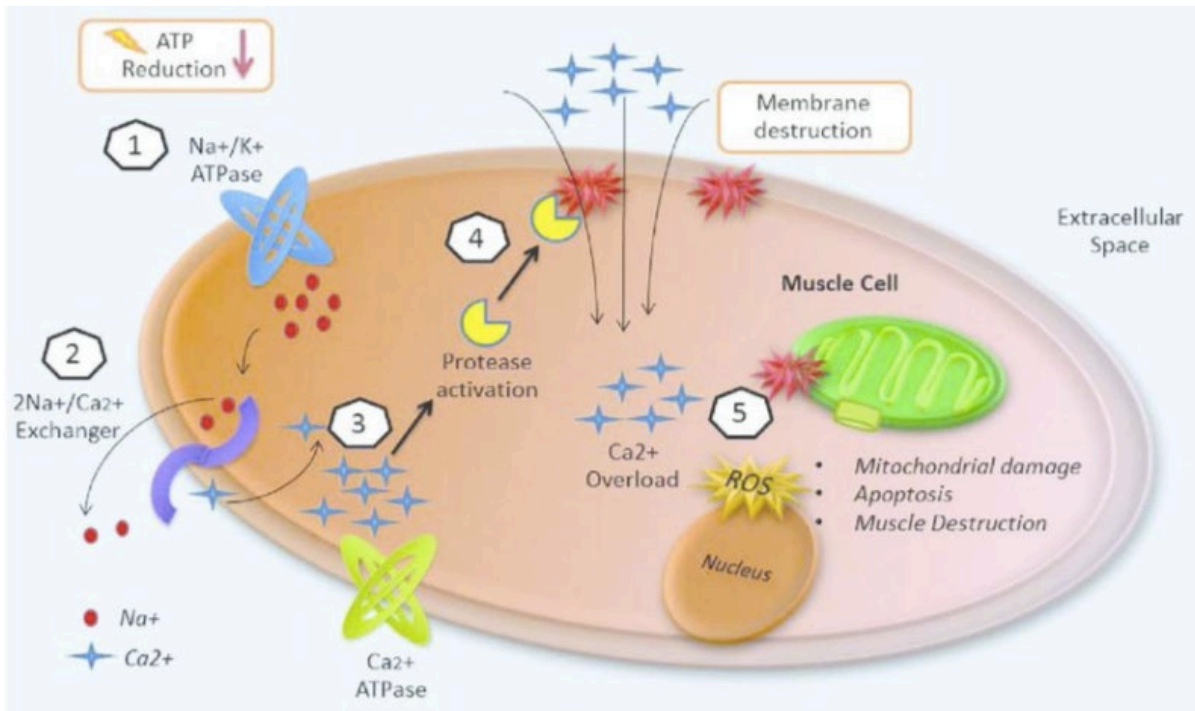
Spinal kord yaralanmasından sonra intraselüler ve ekstraselüler kompartmanlar arasında elektrolit değişiklikleri olduğu görülür (Şekil 18). Özellikle kalsiyumun hücre içine girmesi nörotoksisteyi tetikleyen en önemli değişimdir. Normal koşullarda kalsiyum hücre dışında hücre içinden yaklaşık 1000 kat fazla miktarda bulunmaktadır. Spinal kordda meydana gelen hasardan sonra hücre içine yoğun kalsiyum girişi olur. Bu kalsiyum girişi üç farklı yolla olmaktadır

- Glutamat tarafından aktive edilen Ca kanalları aracılığı ile
- Hasar görmüş olan hücre membranından direk geçiş ile
- Voltaj duyarlı Ca kanalları aracılığı ile

Kalsiyumun hücre içinde fazla miktarda birikiminin sonucu olarak Fosfolipaz A₂ aktivasyonu , serbest yağ asitlerinin salınımı , toksik eikozonoidlerin sentezi, serbest radikal oluşumu , kalsiyum bağımlı Adenozin 5'trifosfataz aktivasyonunun sonucu olarak enerji rezervlerinin tükenimi, hücre iskeletindeki mikrotübül ve nöroflamentlerin modifikasyonu ,

aksonal dejenerasyon , mitokondriyal oksidatif fosforilasyonun bozulması , litik enzimlerin (proteaz, endonükleaz, fosfataz vb) aktivasyonu meydana gelir (63,64). Kalsiyum kanal blokerlerinin sekonder hasarın önlenmesine katkı sağladığını gösteren çalışmalar mevcuttur (65).

Spinal kordda meydana gelen travmadan sonra oluşan elektrolit değişimlerinden sodyumun hücre içine girişi ve potasyumun hücre dışındaki konstrasyonundaki artış aksonal iletimi durdurduğu çalışmalarda gösterilmiştir (66).



Şekil 18: Hücre hasarında kalsiyum ve sodyum imbalansı

2.6.7.Serbest radikal oluşumu ve lipit peroksidasyonu

Dış yörüngesinde serbest elektron bulunduran, aşırı artışı hücre ölümüne neden olan kimyasal bileşiklere serbest radikaller denir. Normal hücrelerdeki antioksidan bileşikler (santral sinir siteminde önemli antioksidanlar: Alfatokoferol, Glutasyon ve Askorbattır.) serbest radikallerin zararlı etkilerini baskılarken spinal kord hasarı gibi spinal kord hasarı gibi patolojik süreçlerde bu koruma mekanizması yetersiz kalıp hücre membranının zarar görmesiyle

sonuçlanır (67,68). İnsanda birçok serbest radikal var olup en yaygın olanı oksijen kaynaklı olanlardır. Hidrojen peroksit (H_2O_2) (demir hidrojen peroksit oluşumunda önemli rol oynar), süperoksit radikali (O_2), hidroksil radikali (OH), peroksit radikali (HO_2) ve organik peroksi radikali (ROO) reaktif oksijen türevleri arasında sayılabilir (69). Vücutta hücreyi oluşturan tüm yapılar ile serbest radikaller etkileşime geçebilirler. Bu etkileşime en açık yapılar lipitlerdir (70). Serbest radikal hasarına bağlı sinir hasarı oluşmasının en önemli sebebi yüksek oranda poliansature yağ asidi içeren sinir hücre membranının bu etkileşime maruziyeti sonucu yıkılmasıdır (71).

Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin serbest yağ asidi ile oksidasyonuna verilen isimdir. Süreç serbest radikallerin ortaya çıkmasından sonra doymuş yağ asitlerinden bir hidrojen alması ile başlar. Daha sonra oluşan peroksit radikali bu sürece oksijeninde eklenmesin sonucudur. Peroksit radikali serbest yağ asidinden bir hidrojen daha koparır. Bu zincir bu şekilde devam eder ve nihayetinde hücre membran lipoproteinlerinin oksidasyonu ile hücre membran hasarı oluşur. Bu hasarın doğal sonucu olarak hücre içine anormal iyon girişi olur ve en nihayetinde de hücre ölümü meydana gelir. Bu süreç kontrol edilemezse zincir reaksiyon ile hücre ölümü yayılır (72).

2.6.8. Apoptoz

Birçok hücre ölüm mekanizması üzerine çalışmalar devam etse de spinal kord hasarında en geçerli hücre ölüm mekanizmaları apoptotik ve nekrotik ölüm mekanizmalarıdır. Netozis, piropitozis, nekropitozis gibi 12 farklı hücre ölümü mekanizması daha 2012 yılında yapılan bir çalışmada tanımlanmıştır (73,74,75).

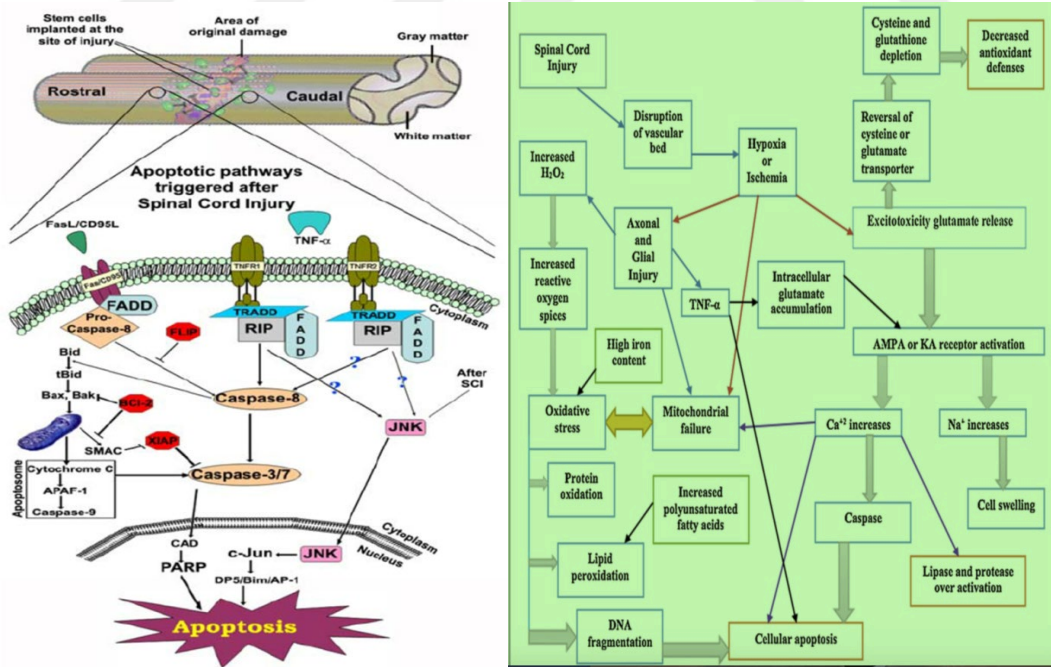
Hücre membranının lizisine ve inflamatuvar süreçlerin başlamasına sebep olan nekroz, yoğun mitokondriyal hasar ve hücre sel şişme ile seyreden bir süreçtir. Nekroz enerji bağımlı ve pasif bir süreçtir (77,78). Genomik parçalanma, kromatin agregasyonu, nükleus piknozusu ve hücre sel küçülme ile karakterize apoptoz ise enerji bağımlı aktif bir süreçtir (78,79).

Spesifik uyarılarla düzenlenebilen fizyolojik programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, çalışmalarda hasara uğrayan hücrelerde travmadan sonra yaklaşık 4. Saate başlayıp 7. Saatte pik noktasına ulaştığı gösterilmiştir (80). Apoptoz ekstrinsik ve intrinsik mekanizmalar ile düzenlenen bir

süreçtir. Bir kaspas aktivatörü olan sitokrom c'nin mitokondriyel salınımı ve kaspas 9'u aktive etmesi intrinsik yolu başlatırken, hücre yüzey ölüm resöptörlerinden Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1 (TNFR1) ve FAS'ın aktivasyonu ekstrinsik yolu başlatır (81). Proapoptotik ve antiapoptotik bazı proteinler apoptozu düzenlemede görev alır. Bunlardan bax, bak, bid, bad proapoptotikken, bcl-2 ve bcl-xl proteinleri ise antiapoptotiktir (82,83).

Spinal kord hasarındaki hücre ölümü ana mekanizmalarından FAS aktivasyonu ile olan mekanizma oligodendrositlerin apoptozunda, akut ve subakut inflamatuvar yanıtta rol alır. FAS eksikliği ve spinal kord hasarı olan fareler üzerinde yapılan çalışmada inflamatuvar yanıtta ve apoptozda azalma olduğu görülmüş ve sonuçlarda anlamlı fonksiyonel iyileşme gözlenmiş (84) (Şekil 19).

Apoptoz mekanizmalarının iyi anlaşılması regüle edilebilir bir süreç olması dolayısıyla yapılacak olumlu müdahaleler ile spinal kord hasarı tedavisinde yüzcüdüren sonuçlar verebilir.



Şekil 19: Spinal kord hasarında apoptoz

2.6.9. İnflamasyon

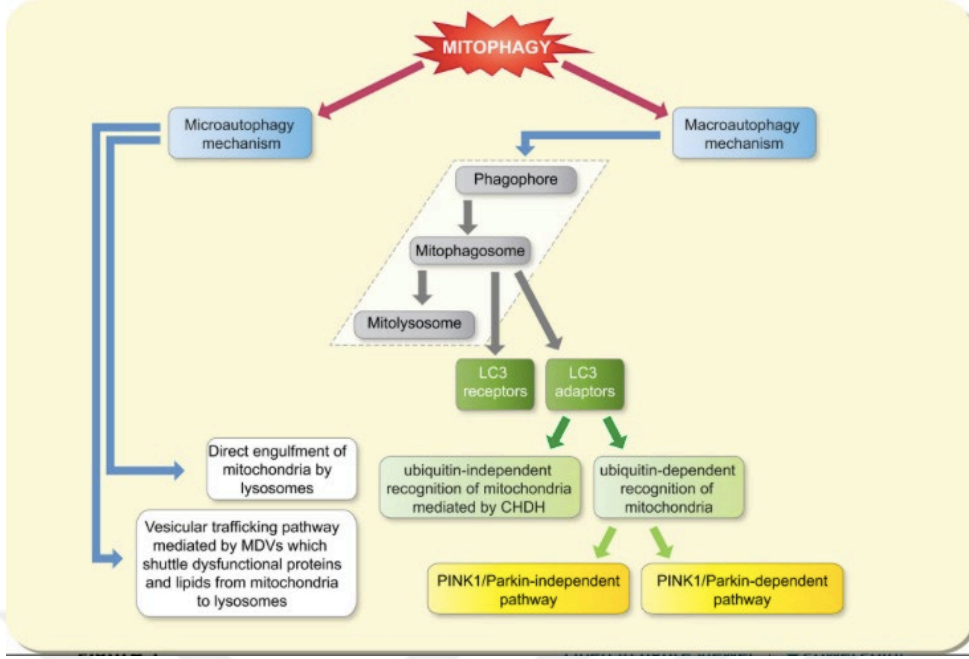
Her türlü hasara karşı vücudun ortak reaksiyonu olan inflamasyon spinal kord hasarında da güçlü bir şekilde ortaya çıkar. İnflamatuar yanıt, sekonder hasarın ana bileşenidir ve akut ve kronik spinal kord hasarı patogenezini düzenlemede hayati rol oynar (85). Bu arada inflamatuvar yanıt, nöronların ve oligodendrositlerin apoptozunun yanı sıra skar oluşumuna ve son olarak nöronal fonksiyonun azalmasına neden olabilir (86). Bu nedenle inflamasyonu azaltmanın spinal kord hasarı sonrası sekonder dejenerasyonu ve fonksiyonel defisiti azaltabileceğine inanılmaktadır. Spinal kord hasarı sonrası kan beyin bariyeri bozulur ve bu sayede kandaki nötrofiller hasar bölgesinde yoğunlaşır. Bu süreç primer hasarı takip eden sekonder hasara katkıda bulunur. Spinal kord hasarından 30-45 dakika sonra hasarlı omurilik segmenti üzerinde tümör nekroz faktörü (TNF) pozitif hücreler görülebilir. 3 ila 24 saat arasında bir sürede kontizyon bölgesinde Tümör Nekroz Faktör Alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) miktarı hızla yükselir (87,88). Çalışmalarda sıçan omuriliğinde kontizyonu takiben 15 dk kadar kısa bir süre içinde inflamatuvar sitokinlerin indüklendiği (önce TNF- α 'nın ardından IL-6'nın) gösterildi (89,90). TNF- α 'nın sıçan omuriliğinde glutamat aracılı hücre ölümünü güçlendirdiği, TNF- α antagonistinin de spinal kord hasarı ile ilişkili inflamasyon ve doku hasarı gelişimini azalttığı gösterildi (91,92,93,94). Ayrıca IL-6 reseptör monoklonal antikor tedavisi astrositik farklılaşmayı baskılamış, inflamatuvar hücre sayısını ve bağ dokusu skar oluşumunun şiddetini azaltmıştır (95,96). Çalışmalarda hiper IL-6 infüzyonu, nötrofil sayısında altı kat artışa, makrofajlar ve aktive edilmiş mikroglia tarafından işgal edilen spinal kord alanlarında iki kat artışa, lezyon bölgesindeki aksonal büyümede dört kat azalmaya neden olduğu gösterildi (97,98). Sitokinler spinal kord hasarındaki inflamatuvar yanıtı ilave sitokinler, kemokinler, nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen ekspresyonunu indükleyerek kolaylaştırır.

Spinal kord hasarından sonra ortaya çıkan inflamatuvar tepkiler, periferik olarak üretilen bağışıklık hücreleri, yaralanma sonrası çoğalan ve lezyon bölgesine göç eden aktive edilmiş glial hücreler tarafından başlatılır (99). T hücreleri makrofajları aktive etmek ve hücrel bağışıklık yanıtını ortaya çıkarmak için gereklidir. Spinal kord hasarlı ratlarda nöron iltihabına ve geçici felce neden olabilen miyelin bazik protein'in (MBP), reaktif T hücrelerini aktive ettiği skleroz (MS) hastalarında görülene yakın seviyelere ulaşır. Spinal kord hasarı ile aktive edilmiş olan B hücrelerinin patolojik potansiyeli hala doğrudan test edilmeye açık bir alandır (93). Çalışmalardan elde edilen verilere göre spinal kord hasarının primer patolojisi ile periferik

lenfosit aktivasyonu arasında doğrudan bir ilişki olduğu doğrulandı. Lenfositler yaralanma bölgesine bir kez gösterilmiştir. Spinal kord hasarında MBP ile reaktif T hücrelerinin sayısı artar ve multipl eriştiğinde süresiz olarak kalırlar. Yaralanmadan 9 hafta sonra spinal kord hasarlı farelerin lezyon bölgesinde T ve B hücrelerinin arttığı gösterilmiştir (100). Makrofajların ve nötrofillerin de lezyonun doku yıkımında ve bu yıkımın genişlemesinde önemli rolü vardır. Makrofajlar ve mikroglia kısmen sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-6 ve IL-10), interferon ve interleukin reseptörlerinin (IL-4R ve IL-2R) katkılarıyla sekonder patolojik ve inflamatuvar yanıtta katkıda bulunurlar (101).

2.6.10.Mitofaji

Otofaji gereksiz ve hasarlı sitozolik bileşenleri lizozomal yolla ortadan kaldıran bir mekanizmadır. Mitofaji ise hasarlı mitokondriyi ortadan kaldıran mitokondriyal otofajiye denir. Yapılan çalışmalar spinal kord hasarı patogenezinde mitofajinin etkili olduğunu göstermiştir (6). Klasik olarak otofaji 3 tipe ayrılır; makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (102,103). Makrotofaji ve mikrotofaji süreçlerinde veziküller oluşması gereklidir. Makrotofajide sitozolde otofagozom olarak bilinen çift zarlı veziküller bir yapı oluşur. Otofagozom gereksiz hasarlı sitozolik bileşenleri içine alır, sonra lizozom ile birleşir (102,104). Buna karşılık şaperon aracılı otofajide sitozolik proteinler vezikül oluşmasına gerek kalmadan yıkılırlar. Proteinler yapısal bir şaperona bağlanarak tanınır ve lizozomal membran hedeflenir (102,103,105). Hedeflenen proteinler LAMP-2A (lizozom ile ilişkili zar proteini tip 2A) 'nın sitozolik kuyruğu ile etkileşime geçer ve lizozom lümenine doğru yer değiştirir. Makrotofaji ve mikrotofajinin mitofajiye dahil olduğu gösterilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20: Memeli hücrelerinde mitofajinin mekanizmaları

2.6.10.1.Makrootofaji mekanizması ile mitofaji

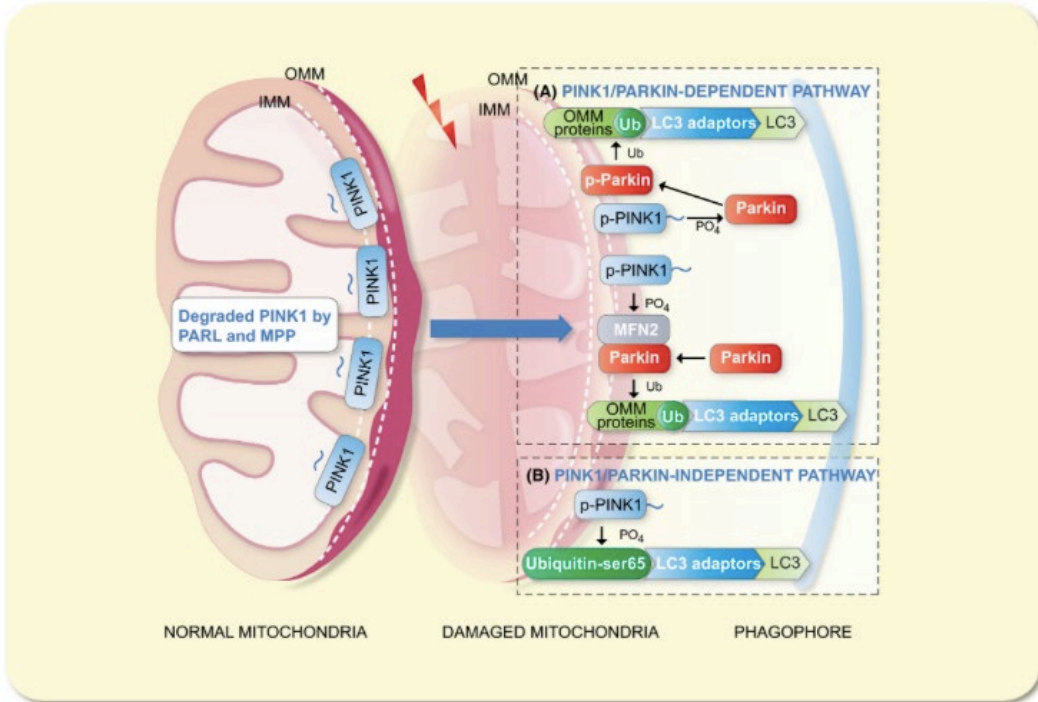
Mitofaji terimi ilk olarak 2005 yılında Lemasters tarafından kullanılmıştır (106). Artan kanıtlara göre mitokondrinin makrootofaji tarafından bozulabileceği gösterilmiştir. Makrootofaji tarafından mitokondrinin parçalanma süreci 3 adıma ihtiyaç duyar; a) sözde fagofor oluşumu b) mitofagozom oluşturmak için hasarlı mitokondrinin tanınması ve yutulması c) mitofagozom lizozom ile birleşerek mitolizozom oluşması (102,107,108).

2.6.10.1.1.Fagofor oluşumu

Fagofor memelilerdeki endoplazmik retikulumdan izole olan bir membran yapısıdır (109,110). Fagofor oluşumundaki en önemli olay sitozolik mikrotübül ilişkili protein-1 hafif zincir 3 (LC3-I)'ün fosfotidiletanolamin ile LC3-fosfotidil-tanolamin konjugatını (LC3-II) oluşturmak üzere yaptığı konjugasyondur (107,111,112).

2.6.10.1.2. Hasarlı mitokondrinin tanınması ve yutulması

Mitofaji seçici bir süreçtir. Fagofor oluşumundan sonra mitofagozomları oluşturmak için LC3 adaptörleri veya LC3 reseptörleri ile hasarlı mitokondrinin tanınması ve yutulması gerekir (102,113). Verilere göre optineurin, p62/SQSTM1, BRCA1 gen 1'in komşusu (NBR1), nükleer nokta proteini 52 (NDP52) ve TAX1 bağlayıcı protein 1 (TAX1 BP1) olmak üzere 5 adet LC3 adaptörü tanımlanmıştır (102,107,113). Bu adaptörler LC3 kaplı fagoforlar ve hedef mitokondri arasında köprü olarak hasarlı mitokondrinin tanınma ve yutulmasına aracılık eder (102,113,114). Mitokondri, ubiquitin bağımlı ve ubiquitin bağımsız etkiler ile tanınır ve etkilenir (113,115) (Şekil 21).



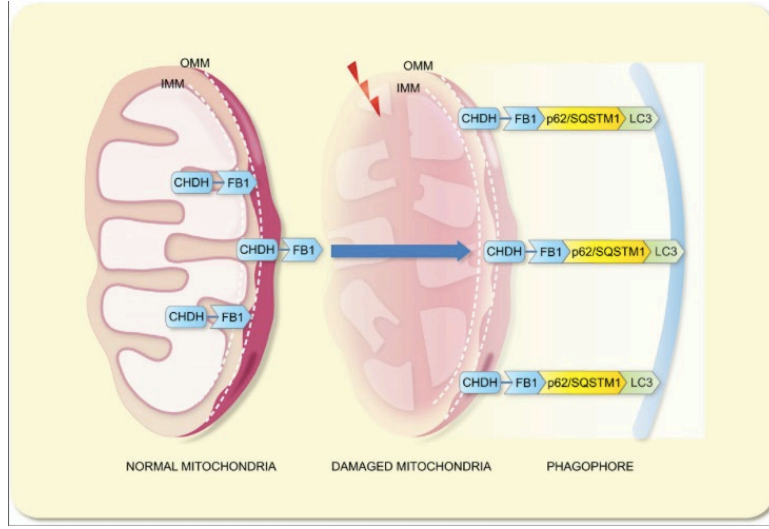
Şekil 21: Ubiquitin bağımlı bir şekilde, LC3 adaptörleri aracılığıyla mitokondri tanıma

Ubiquitine bağımlı bir şekilde Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ile indüklendiği varsayılan kiraz proteini (PINK1) mitokondri etiketini düzenleyen anahtar moleküldür. PINK1 iç mitokondriyal zarında (IMM) bulunur ve sağlıklı mitokondride mitokondriyel işleme peptidazı (MPP) ve presenilin ile ilişkili eşkenar dörtgen benzeri molekül (PARL) tarafından sürekli yıkılır. Mitokondri hasar sonucu depolarize olduğunda PINK1'in yıkımı azalır ve daha sonra hasarlı mitokondrinin dış zarında (OMM) PINK1 birikimi olur (102,113,116,117).

OMM üzerindeki PINK1 otoposforile edilir ve aktive edilir. Aktivasyondan sonra PINK1 işaretlenir. Aktivasyondan sonra işaretli PINK1 iki yolla mitokondriye zarar verir. PINK1/Parkin'e bağlı yol birinci yoldur. Klasik ve en çok çalışan yoldur. Parkin, bazal koşullar altında otoinhibisyona uğramış sitozolik E3 ubiquitin ligazıdır (118,119). Hasarlı mitokondri olduğunda Parkin OMM'ye yer değiştirir ve aktive olur. Aktive Parkin OMM proteinlerini çoğaltır (120,121). Ubiquitasyon LC adaptörlerinin hasarlı mitokondriyi mitolizozomların tanıyıp hedeflemesi için etiketleme görevi görür. Parkin'in OMM'ye yer değiştirmesi ve aktive olması için PINK1 gereklidir. PINK1, Parkin'in T175 bölgesini (korunmuş bir serin/treonin bölgesi) fosforile ederek OMM lokalizasyonu doğrudan düzenler (122). Ayrıca PINK1 Parkin translokasyonunu OMM'ye alan MFN2'yi fosforile edebilir (124,124). PINK1 iki aşamalı bir mekanizma aracılığı ile OMM Parkin'i etkinleştirir (119,125). İlk adım PINK1 tarafından Ubl aracılı otoinhibisyonu azaltmak için Parkin'in C-terminali ve Ubl alanı arasındaki etkileşimi bozan Parkin Ser65'in fosforilasyonudur. İkinci adım, Parkin'i doğrudan aktive etmek için ubiquitin Ser65'in PINK1 tarafından fosforilasyonudur.

PINK1/Parkin'den bağımsız yol diğer bir yoldur. Lazarou ve ark. PINK1/Parkin'e bağlı yolun yanı sıra, hasarlı mitokondrinin PINK1/Parkin'den bağımsız yolla işaretlenebileceğini buldu (114). Bu yolda, PINK1, Parkin'in yardımını olmaksızın hasarlı mitokondriyi işaretlemek için tek başına hareket eder. PINK1, OMM üzerinde ubiquitin Ser65'i fosforile eder. Ser65 fosfo-ubiquitin yapısal olarak benzersizdir, bu nedenle OMM proteinlerinin Parkin tarafından ubiquitinasyonu olmaksızın hasarlı mitokondrinin bir belirteçidir. Optineurin ve NDP52'yi içeren LC3 adaptörleri, etiketli mitokondriyi tanımak için ubiquitin bağlama alanları aracılığıyla Ser65 fosfo-ubiquitin ile doğrudan etkileşime girebilir (114).

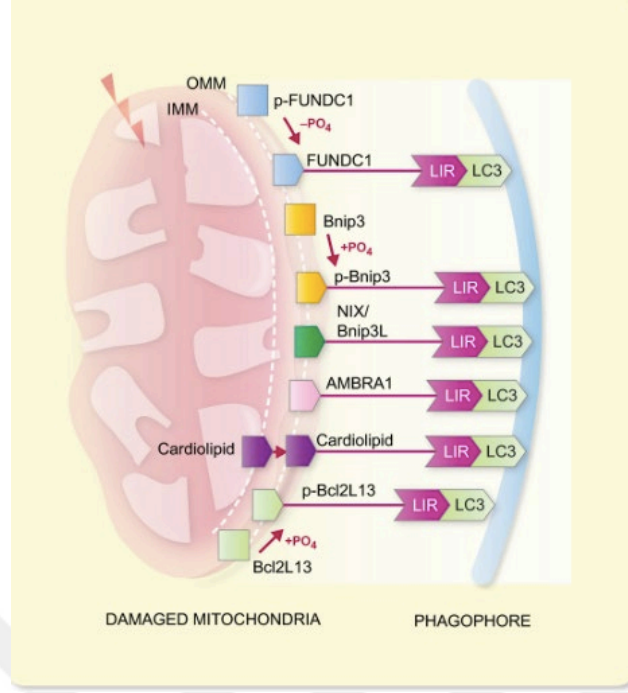
Ubikuitinden bağımsız bir şekilde, hasarlı mitokondrinin tanınmasına kolin dehidrojenazın aracılık ettiği gösterilmiştir (Şekil 22).



Şelil 22: Ubiquitin'den bağımsız bir şekilde, LC3 adaptörleri aracılığıyla mitokondri tanıma

CHDH, mitokondride kolinin betain aldehid dehidrojenasyonunu katalize eden bir enzimdir. Park ve ark. CHDH'nin betain üretimindeki iyi bilinen rolünün ötesinde, hasarlı mitokondrinin tanınmasında önemli olduğunu göstermişlerdir (115). Normal mitokondride CHDH, OMM ve IMM'de sekestre edilir. Buna karşılık, depolarize mitokondride CHDH, FAD/NAD (P)-bağlanma alanı 1'in sitozolik p62/SQSTM1'in Phox ve Bem 1 alanı ile etkileştiği OMM'de birikir ve sonuç olarak p62/SQSTM1'i hasarlı mitokondriye alır (115). CHDH'nin işlevi PINK1 gerektirmez, bu nedenle ubiquitinden bağımsızdır (113,115).

Mitofaji reseptörleri; BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa etkileşimli protein 3 (BNIP3), NIP3 benzeri protein X (NIX/Bnip3L), FUNDC1, BCL2 benzeri 13 (Bcl2L13), otofaji/Beclin1 regülatör 1 (AMBRA1) ve kardiyolipiddir (102,107,113,126). OMM'de buldukları için mitofaji reseptörlerinin hasarlı mitokondrileri etiketlemesi gerekli değildir. Mitofaji reseptörleri, hasarlı mitokondriyi mitofagosomlara tanıtmak ve hasarlı mitokondrinin yutulması için LC3 etkileşimli bölge (LIR) aracılığıyla fagofor üzerindeki LC3 ile doğrudan etkileşime girebilir (107,108,124) (Şekil 23).



Şekil 23: LC3 reseptörleri aracılığıyla mitokondri tanıma

2.6.10.2. Mikrootofaji mekanizması ile mitofaji

Çalışmaların çoğu makrotofaji mekanizması ile mitofajiye odaklanmasına ve makrotofajinin mitokondriyal bozulmanın ana yolu olduğunu göstermesine rağmen, bazı çalışmalar mikrootofajinin de mitokondriyal bozulmada da rol oynadığını göstermektedir (127,128,129,130). Mikrootofaji mekanizması ile mitofaji, mikromitofaji olarak da adlandırılır (129). Mikromitofaji, lizozomal membranın invajinasyonu ve ardından veziküllerin lizozomal lümenine tomurcuklanmasıyla mitokondrinin lizozoma aktarılmasıdır (131).

Mayalarda vakuoller lizozomal bölmelerdir (131). Campbell ve Thorsness, maya mitokondriyal kaçış 1 (yme1) mayasındaki anormal mitokondrinin fiziksel olarak vakuollerle ilişkili olduğunu buldu (132). Bir yme1 suşunun vakuol ile ilişkili mitokondrileri, makrotofajik veziküller içinde bulunmaz. Mdm38-tükenmiş maya hücrelerinde mitokondri, vakuollerle yakından ilişkilidir ve vakuoller tarafından yutulur (133). Bu veriler mitokondriyal bozulmanın mayada mikrootofaji ile gerçekleştiğini göstermektedir. Bildirilen verilere göre mayada mikromitofajinin iki alt tipi vardır. Biri, sadece mitokondrilerin vakuoller tarafından yutulduğu seçici mikromitofajidir. Bir diğeri, mitokondrinin sitozolik bileşenlerle birlikte vakuoller tarafından sekestre edildiği seçici olmayan mikromitofajidir. (129,134,135). Diğer

mekanizma üzerine yapılan çalışmalar, OMM'de lokalize bir protein olan Uth1'in varlığının, yalnızca seçici mikromitofaj için gerekli olduğunu göstermiştir (134,136). Mikromitofajinin her iki alt tipinde sitozolden vakuole taşınma Atg proteinlerine (Atg11, Atg17, Atg29) bağlıdır (134,136,137). Ek olarak, bir maya mitokondriyal protein fosfataz homologu olan Aup1, iki mikromitofajinin alt tipi sürecinde de yer alır (134,138).

Mikromitofaj, memeli hücrelerinde de bulunur (127,130). Şimdiye kadar, memeli hücrelerinde iki tür mikromitofaj tanımlandı (Şekil 20). Bunlardan biri bozulma için lizozomlar tarafından hasarlı mitokondrinin doğrudan yutulmasını ifade eder. Bu sürece mitokondriyal GAPDH aracılık eder. Mikromitofajinin bu şeklinin varlığı kardiyomiyositlerde, PC 12 hücrelerinde ve beyin dokularında kanıtlanmıştır (127,128,129,130). Diğer bir form olan ve veziküler kaçırma diye tabir edilen bu forma mitokondriden tomurcuklanan (MDV'ler) aracılık eder (fizyopat 69,84/124,139) MDV'ler, yıkım için mitokondriden lizozomlara işlevsiz proteinleri ve lipitleri aktarabilir (71,140,141,142). MDV üretimi ve lizozomlara teslimi, ATG5 ve LC3 gibi makrotofajik bileşenlerden bağımsızdır, ancak Parkin ve PINK1'in katılımını gerektirir (71,140). Parkin, PINK1'e bağlı bir şekilde MDV'lerle birlikte bulunur (140).

BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa etkileşimli protein 3 (Bnip3) ve NIP3 benzeri protein X (NIX/Bnip3L) mitofajiye dahil olan yalnızca mitokondriyal BH3 proteinleridir. Son çalışmalar, mitofajinin BNIP3 ve onun homologu Nix tarafından spesifik olarak aktive edildiğini göstermiştir. Bu anlamda Nix bir mitofaji markerı olarak kabul edilebilir. Yapılan bir çalışmada spinal kor hasarından sonra mitofajinin aktive olduğu ve BNIP3, Nix ve p53'ün arttığı gözlemlenmiştir (6). Bu çalışmada yaralanmadan 24 saat sonra hasarlı nöronlarda elektron mikroskopuyla mitofajinin göstergesi olarak yorumlanan mitofagozomlar gösterilmiş. Western blot analizinde de BNIP3 ve Nix ekspresyonunun yaralanmadan 6 saat sonra belirgin şekilde arttığını, 24 saatte zirveye ulaştığını ve 96 saat sonra düşmeye başladığı gösterilmiş (6).

Nix'in fare embriyonik fibroblastlarında parkin translokasyonunu ve parkin aracılı mitofajiyi desteklediği bildirilmiştir (143). Bir E3 ubiquitin ligazı olan Parkin, mitofajiyi teşvik etmek için PINK1 ile etkileşim yoluyla depolarize mitokondriye alınır (144,145). Mitokondriyel parkin seviyesindeki artma mitofajiyel aktivitenin önemli bir göstergesidir (146,147).

2.7.Spinal Kord Yaralanmalarının Tedavisi

Spinal kord yaralanmalarında tedavideki asıl amaç ikincil hasarı azlatmaktır. Gerek medikal gerekse cerrahi tedavi ile patolojik süreç engellenmek istenir. Medikal tedavide ilaçlar gerek tek gerekse kombine şekilde deneysel olarak araştırılmıştır. Günümüzde daha çok yoğunlaşılın tedavi yaklaşımı ile ilgili çalışmalarda özellikle aksonal rejenerasyonun sağlanması amaçlanır. Ayrıca hipotermi de güncel tedavi yöntemleri arasında değerlendirilebilir (148).

2.7.1.Spinal kord yaralanmalarının cerrahi tedavisi

Yaralanma sonrası acil şartlarda ilk 24 saat yapılacak dekompresif yaklaşımlar ve anatomik stabilizasyonun sağlanması oluşacak olan sekonder hasarın şiddetinin azaltılması açısından faydalı olabilir.

2.7.2.Spinal kord yaralanmalarının medikal tedavisi

Medikal tedavi akut dönem için nöroprotektif ajanları içermekte olup antioksidanlar, nörotransmitter reseptör blokerleri, fosfataz inhibitörleri ve fosfokinaz stimulatorleri olarak dört gruba ayrılır (149). İyileşme ve kronik fazında kullanılan medikal tedaviler aksonal remiyelinizasyon ve denerve dokuların plastisitesinde iyileşmeyi amaçlayarak fonksiyonel geri dönüşümü artırmaya katkıda bulunur.

2.7.2.1.Metilprednizolon

Uzun zamandan beri spinal kord yaralanması tedavisinde kullanımı olan kortikosteroidlerden en sık kullanılanı metilprednizolon olup hidrokortizon ve deksametazonun da kullanımı mevcuttur. Posttravmatik iskeminin azlatılması, doku kan akımı ve aerobik enerji metabolizmasının düzenlenmesi, hücre içi kalsiyum birikimini engellemesi, lipid peroksidasyonunu inhibe etmesi, spinal nöronlardaki eksitabiliteyi azaltması, prostaglandin

F2 α ve tromboksan A2 oluşmasını engellemesi metilprednizolonun etki mekanizmaları arasında gösterilir (150).

The National Acute Spinal Cord Injury Study (NASCIS)'in metilprednizolon ile ilgili çalışması referans çalışma olup ilk 8 saatte uygulanması nörolojik iyileşmeye belirgin oranda katkı sağladığı gösterilmişti. NASCIS-3 çalışmasında metilprednizolonun 24 ve 48 saatlik uygulamaları değerlendirilmiş olup, yaranama sonrası ilk 3 saat metilprednizolon başlanan hastaların 24 saat, yaranama sonrası 3-8 saat aralığındaki bir saat diliminde metilprednizolon başlanan hastaların ise 48 saat boyunca tedavisinin devamı gerektiği bildirilmişti. Analizlerde travma sonrası ilk 8 saatte metilprednizolon tedavisinin başlanmasının etkinliği görülmüştür (151,152). Fakat son çalışmalarda gerek etkinliğine ait kanıtlardaki yetersizlik gerekse de yan etki fazlalığı dolayısıyla metilprednizolonun spinal kord hasarındaki kullanımı önerilmemektedir (153,154,155,156).

2.7.2.2.Opiat antagonistleri

İkincil hasara karşı etkilerini opiat reseptörlerini bloke ederek gösterirler. Tirotropin salınma hormonu (TRH), TRH analogu YM-14673, Naloksan gibi bu gruptaki ilaçlar hasar sonrası endorfin salınımını nötralize edip spinal kord kan akımını artırarak etki gösterirler (157).

2.7.2.3.Kalsiyum kanal blokerleri

Spinal kord yaralanamsından sonra hücre içine kalsiyum girişindeki artışa bağlı olarak kalsiyum kanal blokerlerinin bu artışı engelleyerek nöroprotektif etki sağlayabileceği düşünülmüş olsada çalışmalarda doku hasarını azaltmada ve nörolojik fonksiyonlarda iyileşmede belirgin etkilerinin olduğu görülmemiştir. Kullanım olarak yaranama sonrası ilk bir saat içinde verilmelidir aksi taktirde bu süreden sonra olumlu bir etkisi yoktur (158).

2.7.2.4.Gangliosidler

Glikosfingolipid yapısında ilaçlar olup çalışmalarda nöron gelişimi üzerinde olumlu etkileri görülmüş ve apoptozisi baskılayıcı etkileri de saptanmıştır. 600 mg yükleme dozu sonraı 56 gün boyunca 200 mg/gün idame şeklinde tedavi önerisi yapılan klinik çalışmalarda önerilmiştir. Uygulama sonrası ilk 6 saat sonrasında belirgin nörolojik düzelme gözlenmiştir (159).

2.7.2.5.Serbest radikal tutucular

Hasar sonrası oluşan serbest radikalleri nötralize eden bileşiklerdir antioksidanlar. Hücre membranında poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonunu engelleyen E vitamini serbest radikalleri redükte eder. Hidrojen peroksidi redükte eden glutatyon peroksidazin kofaktörü de Selenyumdur (160).

2.7.2.6.Antiinflamatuvar ajanlar

Siklooksijenaz inhibitörleri, lipookisjenaz inhibitörleri, sindometazin ve glukokortikoid gibi antiinflamatuvar ilaçlar araşidonik asit metobolzimasını engelleyerek etki gösterirler. Ancak spinal kord hasarında nöroprotektif etki için verilecek dozlarının toksik olduğu belirtilmiştir (161).

2.7.2.7.Hiperbarik oksijen tedavisi

Yaralanmanın erken döneminde (ilk 6 saat) uygulanması sonucu aksonal ve miyelin hasarını azalttığı, nöronal rejenerasyonu sağladığı, nörolojik iyileşme sağladığı gösterilmiştir.

Etki olarak oluşan vazokonstriksiyonu azaltarak vazojenik ödemi azalttığı ve aynı zamanda kanamanın yayılmasını önlediği bildirilmiştir (162,163).

2.7.2.8. Ürolitin a

Ellagitanninler (ET), esas olarak nar, böğürtlen ve çilek gibi bazı meyvelerde bulunan hidrolize edilebilir tanenlerin çeşitli bir sınıfını oluşturur (164). Daha sonra bağırsakta hidrolize edilerek Ellajik Asidi (EA) oluştururlar. Hem ellagitaninlerin hem de ellajik asidin bağırsak bakterileri tarafından metabolize edilmesi üzerine Ürolitin A (UA), Ürolitin B (UB), Ürolitin C (UC) ve Ürolitin D (UD) türleri bulunan Ürolitinler oluşur. (165) Ürolitin türleri arasında, Ürolitin A (UA), insanlarda gözlenen başlıca metabolittir (166). Önceki çalışmalar, Ürolitinlerin antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve mitofajiyi idikleme özellikleri dahil olmak üzere birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir (167,168,7). Bu veriler ışığında spinal kord hasarında tedavi açısından ümit vadeden bir bileşiktir. Çalışmamızda biz de bu bileşiği kullandık.

2.8. Deneysel Spinal Kord Travma Modelleri

Spinal kord yaralanması yapmak için birçok deneysel model vardır. Güncel kullanımı en çok olan modeller yüksekte ağırlık düşürme ve anevrizma klipsi ile spinal korda kompresyon uygulanması modelleridir (169,170). İlk yöntem Allen tarafından tanımlanmış olup laminektomi yapılan spinal kord alanına belli bir yükseklikten bilinen bir ağırlık bırakılarak yapılır (170). İkinci yöntemde ise Yaşargil Anevrizma Klipsi (24 g gücünde) yaklaşık 30 veya 60 sn kadar korda kompresyon amacı ile tutturulur ve travma oluşturulur (171). Çalışmamızda spinal kord travması oluşturmak için anevrizma klips yönetemi kullanılmıştır.

3. YÖNTEM VE GEREÇLER

Bu çalışmamızda Avrupa Konseyi'nin önerdiği standartlara (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes) (ETS 123) uyulmuş olup, çalışmamız Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 31/03/2021 tarihli 2021/62 sayılı onay kararı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın deneysel kısmı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda, immünohistokimya çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Histoloji Laboratuvarı'nda, Elisa ve Western blot testleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Beykoz Araştırma Merkezi Beyin ve Sinir Cerrahisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Deneysel gruplarımızda 250-300 gr ağırlığında 8-10 haftalık 32 adet dişi Sprague Dawley sıçanlar kullanıldı. Rastgele 4 gruba ayrılan sıçanlar her grupta 8 rat olacak şekilde gruplandırılmıştır. Sıçanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Sıçanlar işlem öncesi ve sonrasında takibi kafeslerde oda sıcaklığı (22-25C)'nda 12 saat gündüz/12 saat gece sirkadiyen siklusu halinde izlendi. Normal diet ve suya erişimi deneysel sürecinde serbest bırakıldı

3.1. Deneysel Grupları

Grup 1 (SHAM Grubu): Bu gruptaki denekelere sadece T9-T10 laminektomi yapıp 48. Saat sakrifiye edilip doku spesimenleri alındı.

Grup 2 (Travma Grubu): Bu gruptaki denekelere T9-T10 laminektomi yapıp spinal kord hasarı yapıldı. Hiç tedavi verilmeden 48. saat sakrifiye edilip doku spesimenleri alındı.

Grup 3 (Ürolitin A Grubu): Bu gruptaki denekelere T9-T10 laminektomi yapıp spinal kord hasarı yapıldı. 12, 24. ve 36. saatlerde gavaj ile daha önceki çalışmalar referans alınarak 50 mg/kg dozdan Ürolitin A verildi. (172) Daha sonra 48. Saat sakrifiye edilip doku spesimenleri alındı.

Grup 4 (Nar Ekstresi Grubu): Bu gruptaki denekelere T9-T10 laminektomi yapıp spinal kord hasarı yapıldı. 12. 24. ve 36. saatlerde gavaj ile 1ml olacak şekilde yoğunluğu artırılmış Nar Ekstresi (gavaj ile verilmesine engel oluşturmayacak, mümkün olan en fazla yoğunlukta ve içindeki EA miktarı standartize edilerek hazırlandı) verildi. Daha sonra 48. Saat sakrifiye edilip doku spesimenleri alındı.

Grup	Cerrahi Prosedür	Tedavi
SHAM Grubu	T9-T10 laminektomi	Verilmedi
Travma Grubu	T9-T10 laminektomi + kord hasarı	Verilmedi
Ürolitin A Grubu	T9-T10 laminektomi + kord hasarı	12,24,36. Saat 50 mg/kg Ürolitin A
Nar Ekstresi Grubu	T9-T10 laminektomi + kord hasarı	12,24,36. Saat 1 ml Nar Ekstresi

Tablo 8: Çalışma grupları

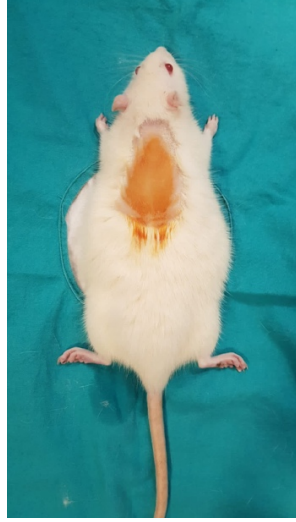
3.2.Çalışma Prosedürleri

3.2.1.Anestezi

Deneyimizdeki sıçanlara cerrahi işlemden önce genel anestezi sağlamak amacıyla intraperitoneal 90 mg/kg ketamin (Parke Davis, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun % 2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer-Türk İlaç Ltd. İstanbul) uygulandı. Genel anestezi süresince ratlar spontan solunumla izlenip ek solunum desteğine ihtiyaç duyulmamıştır.

3.2.2.Cerrahi teknik

Sedasyondan emin olunduktan sonra sıçanlarındorsal bölgesi traş edildi. Prone pozisyonda T9-T10 işelm bölgesine uyan alanın Povidon iyodin (Batticon st solüsyon, Adeka, Samsun / Türkiye) ile antisepsisi sağlandı (Şekil 24).



Şekil 24: Cerrahi hazırlık aşaması

Daha sonra orta hatta 2 cm lik insizyon yapılarak cilt, ciltaltı ve fasya geçildi. Prvertebral adaleler disseke edilip laminalar ortaya konuldu. Daha sonra tüm gruplara T9-T10 laminektomi yapıldı (Şekil 25).



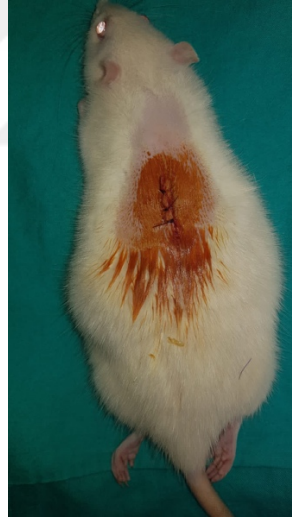
Şekil 25: Laminektomi sonrası spinal kordun ortaya konulması

Artından SHAM grubuna ek işlem yapılmazken travma, Ürolitin A ve Nar Ekstresi grubuna T9-T10 laminektomi sonrası spinal korda geçici anevrizma klipsi (kapanma kuvveti 90 g (0.88 N) olan Yaşargil geçici anevrizma klipi (FT262T, Aesculap, Tuttlingen, Almanya) ile 30 sn. ekstradural kompresyon yapıldı. (Şekil 26)



Şekil 26: Spinal kordun anevrizma klipsi ile kompresyonu

Daha sonra tüm sıçanların cilt, ciltaltı dokusu 3/0 atravmatik ipek suture ile uygun bir şekilde kapatıldı (Şekil 27).



Şekil 27: Tüm katların primer sutureasyonu

Sıçanlar uyandıktan sonra yapılan muayenede SHAM grubu hariç tüm gruplardaki sıçanların paralejik olduğu görüldü. Bütün sıçanlara erken postop dönemde intraperitoneal olarak 10 mg/kg parasetamol (Perfalgan, 10mg/mL infüzyon, Bristol Myers SQUIIB, Fransa) uygulanarak aneljezi sağlandı. Paralejik sıçanların mesanesi günde iki kez olmak üzere el ile kompresyon yapılarak boşaltıldı.

Daha sonra Ürolitin A grubuna 12, 24 ve 36. saatlerde gavaj ile Ürolitin A 50 mg/kg (Shandong HRC Chemical Co., Ltd., China) dozunda verildi. Nar Nkstresi grubuna ise yine 12, 24 ve 36. saatlerde gavaj ile her uygulamada 1ml olacak şekilde konvansiyonel meyve suyu sıkacağında hazırlanıp daha sonra döner buharlaştırıcıda yoğunluğu artırılmış Nar Ekstresi verildi. Nar Ekstresinin yoğunluğu gavajda akışkanlığa sorun teşkil etmeyecek şekilde ayarlandı. Elde edilen bu özütün içindeki ellagic asit miktarı HPLC cihazında ölçülerek (bir litre özütte 341,49 mg ellagic asit mevcut) özüt standartize edildi.

3.2.3.Sakrifikasyon ve spinal kordların çıkarılması

Bütün gruplardaki sıçanlar 48. saatte genel anestezi altında sakrifiye edildi. Sonra spinal kordun hasarlı bölgesi ve yaklaşık 1 cm periferi (distal ve proksimal) çıkarılarak kord örnekleri alındı ve immünhistokimya, Elisa ve Western blot incelemeleri için eppendorf tüplerine alınıp -80 derece dolabına yerleştirildi (Şekil 28 a-b).



Şekil 28 a-b: Sakrifikasyon sırasında alınan spinal kord görüntüsü

3.3.İmmünohistokimyasal Analizler

3.3.1.Histolojik yöntem

3.3.1.1.Örneklerin hazırlanması

Sakrifiye edilen ratlardan alınan doku örnekleri Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal inceleme yapılmak üzere takibe alındı. Alınan doku örnekleri fosfat tamponu (PBS) içinde hazırlanmış %10 tamponlu nötral formaldehitte 1 gün tespit edildi. Tespit edilen doku örnekleri rutin ışık mikroskop doku takip yöntemine göre dereceli alkollerden geçirilerek dehidrate edildi, ksilolde şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömüldü. Doku takibi sırasında optimizasyonun sağlanabilmesi için sabit vakumlu bir doku takip cihazı kullanıldı (Leica, model TP 1020). Parafin bloklardan rotary mikrotom ile 3- 4 µm kalınlığında kesitler krom alüm jelatin ile kaplı rodajlı lamlara alındı.

3.3.1.2.Hematoksilen- eozin boyama

Rodajlı lamlara alınan 3- 4 µm kalınlığındaki paraffin kesitler 1 gece etüvde deparafinize edildikten sonra aşağıdaki sırayla boyama işlemi yapıldı.

- 3 kere 15' er dakika ksilolde bekletildi.
- Sırasıyla %96, %96 ve %80' lik alkollerde 10 ar dakika bekletilerek rehidrate edildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- Kullanılmadan önce süzülen Hematoksilende 15 dakika bekletildi.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere asit alkole batırılıp çıkartıldı.
- Akar suda 10 dakika yıkandı.
- 2 kere amonyaklı suya batırılıp çıkartıldı.
- 60 sn eozinde bekletildi.

- Sırsıyla %80, %96, %96'lık alkollerden geçirildi.
- Kurutulup, 45 dakika ksilolde bekletildikten sonra Kanada balsamı ile lamlar kapatıldı

3.3.1.3.İmmünohistokimyasal yöntem

Mitofajiyi göstermek için Nix (E-1) (sc-166314) ve Parkin (PRK8) (sc-32282) ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Sekonder anikor olarak Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (ABCAM- ab64261) kiti kullanıldı.

Rodajlı lamlara alınan 3- 4 µm kalınlığındaki paraffin kesitler 1 saat etüvde deparafinize edildikten sonra;

- 2 kere 10' er dakika ksilolden geçirildi.
 - 2 kere %90'lık alkolde bekletildi.
 - 10 dakika H₂O₂' de bekletildi.
 - Distile suda 10 dakika yıkandı.
 - %10' luk sitrat bufferda 20 dakika tutuldu.
 - Blocking serum damlatıldı ve 15 dakika oda ısısında bekletildi.
 - Blocking serum uzaklaştırıldıktan sonra primer antikor damlatıldı ve +4C⁰' de overnight beklendi.
 - Ertesi gün PBS ile yıkandıktan sonra sekonder antikor damlatıldı, 1 saat beklendi.
 - PBS ile yıkandı.
 - HRP damlatıldı ve 20 dakika beklendi.
- DAB ile Mayer hematoksilen ile boyanarak kapatıldı.

Kapatılan örnekler hücreler Nikon (Eclipse 920248, U.S.A.) ışık mikroskopunda değerlendirildi ve görüntüler Nikon Marka DS-Fi2-U3 Model kamera ile tam uyumlu görüntüleme yazılımı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

3.4.Doku Il-6 Ve Tnf Alfa Düzeylerinin Elisa İle Değerlendirilmesi

- Sakrifikasyon sonrasında alınan doku homojenatlarından süpernatı elde etmek için 2-8 derece 500xg' de 5-10 dk santifürüj yapıldı. Daha sonra süpernatlar kuyucuklara yüklenmek için Eppendorf tüplerine alındı.
- Dilüsyon tampon ile sulandırılan standart 1 ml örnekler, son konsantrasyonu 200 – 100 – 50 – 25 - 12.5 - 6.25 - 3.12 pg/ ml olacak şekilde standartlar seri olarak dilüe edildi ve her bir kuyuya standart veya numune olacak şekilde 100'er µl kadar yüklendi ve 37 derecede 90 dakika inkübe edildi.
- Kuyulardaki sıvılar çekildi, sonrasında 100'er µl Biotin antikor solüsyonu eklenip 37 derecede 60 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra kuyudaki sıvılar aspire edildi ve 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Daha sonra kuyulara 100'er µl HRP konjugatı eklenip 37 derecede 30 dakika inkübe edildi.
- Sonrasında kuyulardaki sıvılar aspire edilip 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Kuyulara 90'ar µl substrat reaktifi konulup 37 derecede 15 dakika inkübe edildi.
- Kuyularda renk değişimi olduktan sonra 50'şer µl stop solüsyonu eklenip, 450 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.
- Elde edilen standart eğri grafiğine göre örneklerdeki TNF-α ve IL-6konstrasyonları belirlendi.

3.5.Doku Örneklerinin Western Blot İle Değerlendirilmesi

- Öncelikle Resolving Gel ve Stacking Gel adlı iki jel hazırlandı. Resolving gel için 1950 µl Acrylamide, 16.25 µl pH:8.8 Tris HCl, 65 µl SDS, 2827 µl H₂O, 3.25 µl TEMED ve 32.5 µl APS karıştırıldı. Kalıba döküldü. Üzeri tarakla kapatıldı. 45 dakika 37C inkübatörde bekletildi. Ardından Stacking Gel hazırlamak için 300 µl Acrylamide, 756 µl pH:6.8 Tris HCl, 30 µl SDS, 1908 µl H₂O, 3 µl TEMED ve 15 µl APS karıştırılıp elde edilen karışım Resolving Gel'in üzerine eklenerek 45 dakika daha 37C inkübatörde katılaşması beklenildi.

- 1.kuyuya 4 µl marker eklendi. Diğer kuyulara ise istenilen proteinler yüklendi. Jel, running buffer dolu tanka koyuldu. Ardından yürütme için cihaz çalıştırıldı. 1 saat 80V ardından 2 saat 120V dozajda yürütüldü.
- Yürütmenin sonunda jel, PVDF membran ve blotting sheetler Transfer bufferda bekletildi. Blotting sheet, PVDF membran, jel ve blotting sheet üst üste konularak sandviç yapıldı. Üzerine transfer buffer koyuldu. Transfer cihazında 2,5 saat 0.65 mA dozajda cihaz çalıştırıldı.
- Sürenin sonunda sandviç cihazdan alındı. Membran 5 dakika boyunca wash bufferda yıkandı. Ardından 1 saat boyunca Blocking bufferda, shakerda inkübe edildi. Daha sonra Primer antibody içerisine +4 C’de overnight olarak bırakıldı.
- Ertesi gün, membran antibody’den alındı. 5’er dakika olmak üzere 5 defa wash buffer ile shakerda yıkandı.
- Yıkamanın ardından jel alınır, Secondary antibody içerisinde 1 saat oda sıcaklığında shakerda inkübe edildi. Ardından 4 defa 5 dakika, 1 defa 10 dakika olmak üzere wash buffer ile yıkandı.
- Membran ECL solüsyonu ile muamele edilerek chemiluminescence ışımaya görüntüleme cihazı yardımıyla tespit edildi. Protein saptandı.

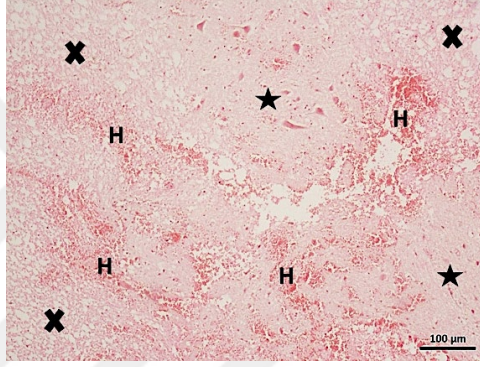
3.6. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen sonuçlar için IBM Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 22 programı kullanıldı ve Bezmialem Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı’nda analiz edildi. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil edildi. Verilerin normal dağılıp dağılmadığına bakıldı ve tüm veriler parametrik olmayan testlerle analiz edildi. (Gruplar arasındaki karşılaştırmalar için parametrik olmayan Kruskal Wallis testi uygulanıp, çoklu karşılaştırma için Dunn Bonferroni'nin çoklu karşılaştırma testi kullanıldı.) Farkın $p < 0.05$ 'ten küçük olması anlamlı kabul edildi.

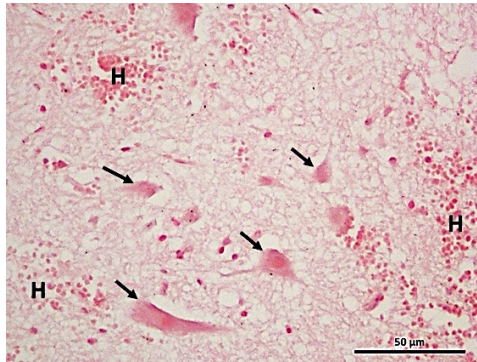
4. BULGULAR

4.1.Histolojik Bulgular

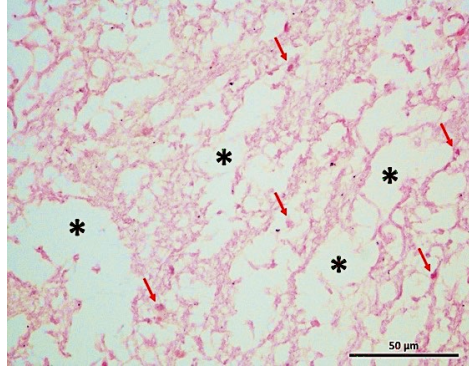
Travma grubuna ait spinal kordların hematoksilin ve eosin (HE) ile boyanmış kesitlerinde gri ve beyaz cevherin beklenen düzenini kaybettiği, doku ödemi ve kanama alanlarının ortaya çıktığı (Şekil 29 a), gri cevherde nöron çevresi ödemin belirgin olduğu (Şekil 29 b), beyaz cevherde doku hasarı olduğu, gliya hücre sayısının da nispeten azaldığı izlendi (Şekil 29 b-c).



Şekil 29 a. Travma grubuna ait spinal kordda gri cevher (yıldızlar) ve beyaz cevherin (X işaretleri) beklenen düzenini kaybettiği görülüyor. Yaygın hemoraji (H), beyaz cevherde ödem ve doku hasarı izleniyor. H-E; X 100.

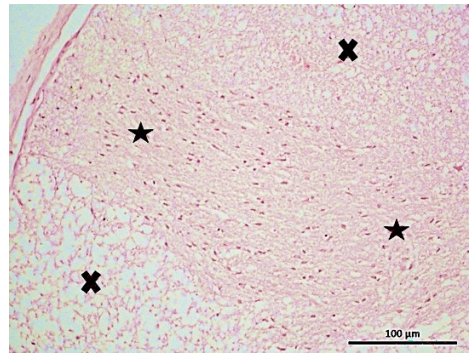


Şekil 29 b. Travma grubuna ait spinal kordun gri cevherinde hemoraji (H) ve dejenere olmuş nöronlar (oklar) işaretlenmiştir. Nöronların çevresinde ödem olduğu anlaşılmaktadır. Beyaz cevherde de belirgin ödem görülmektedir (şeklin sağ üst bölümü). H-E; X 400.

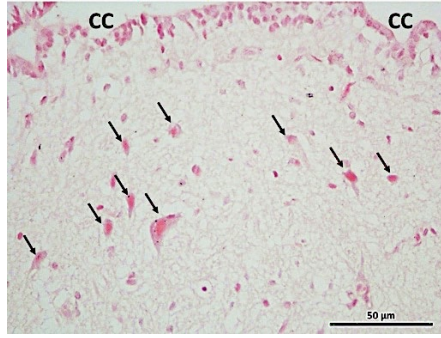


Şekil 29 c. Travma grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde belirgin ödem alanları (yıldızlar) görülüyor. Bu ödemli dokuda gliya hücrelerinin (oklar) seyrekleşerek aralıklı yerleştiği izleniyor. H-E; X 400.

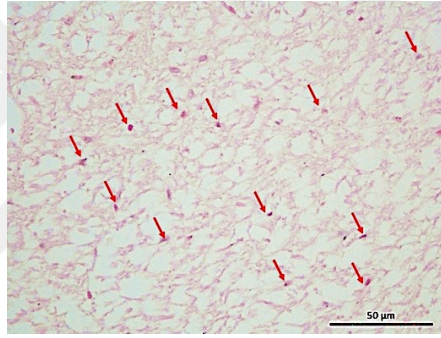
Sham grubuna ait spinal kordların hematoksilin ve eosin ile boyanmış kesitlerinde gri ve beyaz cevherin normal histolojik yapısını koruduğu izlendi (Şekil 30 a-b-c). Beyaz cevherdeki yer yer hafif ödem görüldü (Şekil 30 a-c), gliya hücre sayısı normaldi (Şekil 30 c).



Şekil 30 a. Sham grubuna ait spinal kordun gri (yıldızlar) ve beyaz cevherinin (X işaretleri) olağan düzenini koruduğu görülüyor. Beyaz cevherde (özellikle resmin sol alt bölümünde) hafif ödem görülüyor. H-E; X 200

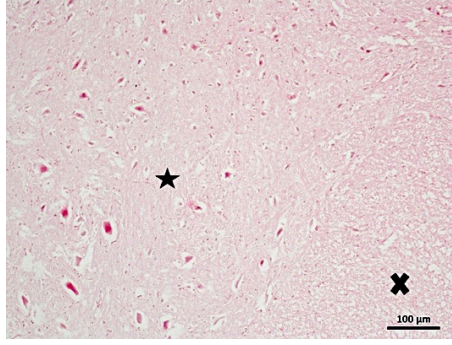


Şekil 30 b. Sham grubuna ait spinal kordun gri cevherinde nöronların (oklar) ve gliya hücrelerinin dağılımının normal olduğu görülüyor. Santral kanalı (CC) döşeyen ependim hücreleri de sağlıklı görülüyor. H-E; X 400.

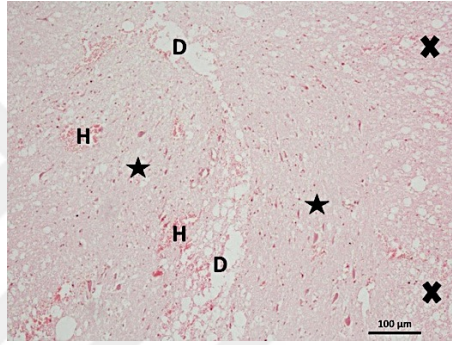


Şekil 30 c. Sham grubuna ait spinal kordun beyaz cevheri yer yer hafif ödem dışında normal görünüyor. Gliya hücreleri kırmızı oklarla işaretlenmiştir. H-E; X 400.

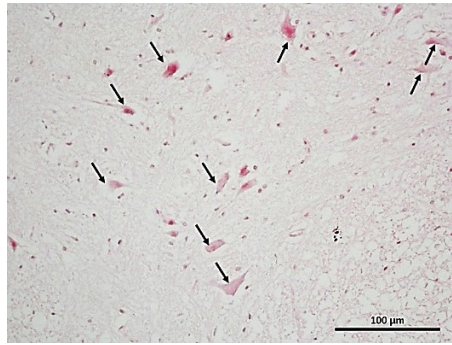
UA grubuna ait spinal kordların hematoksilin ve eosin ile boyanmış kesitlerinde gri ve beyaz cevherde normal histolojik yapısını koruyan alanlar görüldü. Ancak yine de yer yer doku düzeninin ve bütünlüğünün bozulduğu, kanama alanlarının ve ödemin ortaya çıktığı görüldü. Beyaz cevherde gliya hücre dağılımı normaldi (Şekil 31 a-b-c-d).



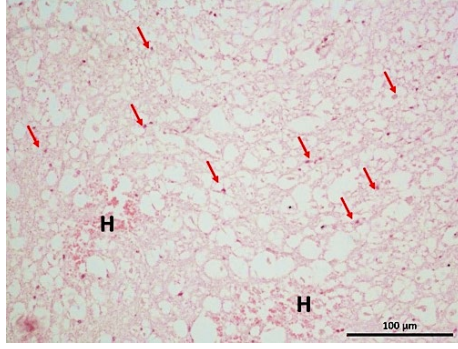
Şekil 31 a. UA grubuna ait spinal kordun gri (yıldız) ve beyaz cevheri genel olarak normal görülüyor. Gri cevherde nöron çevresinde ödem izleniyor. Beyaz cevherde ödem görülmemektedir. H-E; X 100.



Şekil 31 b.UA grubuna ait spinal kordda ödemin yol açtığı dejenere alanlar (D) ve çok geniş olmayan kanama alanları (H) görülüyor. Beyaz cevherde ödem görülmektedir. H-E X 100.

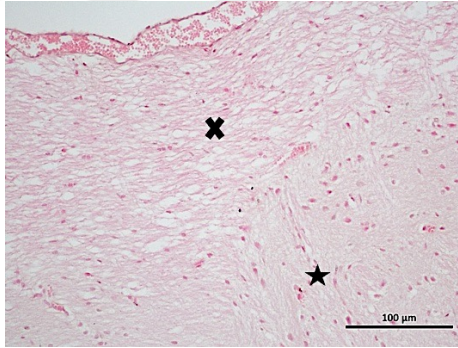


Şekil 31 c. UA grubuna ait spinal kordda gri cevherde nöron ve gliya hücre dağılımı normal görünüyor. Nöronların çevresinde ödem izlenmektedir. H-E; X 200.

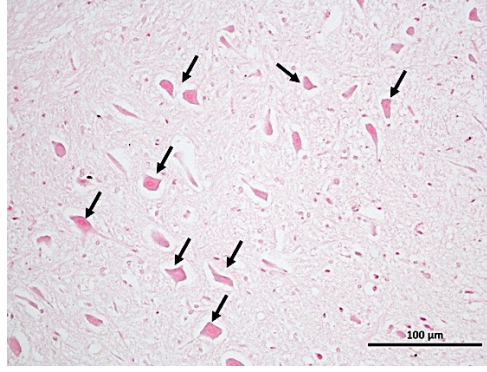


Şekil 31 d.UA grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde yaygın olmayan kanama alanları (H) ve ödem görülüyor. Gliya hücreleri işaretlenmiştir. H-E; X 100.

NARE (Nar Ekstresi) grubuna ait spinal kordların hematoksilin ve eosin ile boyanmış kesitlerinde gri ve beyaz cevherin sham grubuna yakın görünümde olduğu, genel olarak normal histolojik yapısını koruduğu görüldü. Gri cevherde az da olsa kanama alanlarına rastlandı. Beyaz cevherde gliya hücre dağılımı normaldi (Şekil 32 a-b).



Şekil 32 a. NARE grubuna ait spinal kordda gri (yıldız) ve beyaz cevher (X işareti) normal görünüyor. Doku içindeki damarlarda ve subaraknoid mesafedeki damarda konjesyon görülüyor. H-E; X 100.



Şekil 32 b. NARE grubuna ait spinal kordun gri cevherinde nöron (oklar) ve gliya hücre dağılımı normal görünüyor. Nöron çevresi ödem izlenmektedir. H-E; X200.

4.2.İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünoreaksiyon derecesinin belirlenmesi amacı ile Tsai HD ve arkadaşlarının kullandığı derecelendirme yöntemi kullanıldı (Tablo 9) (173). Buna göre %0 boyanma (-), %1-30 boyanma (+; zayıf), %31-60 boyanma (++; orta), %61-100 boyanma (+++; şiddetli) olarak kabul edildi.

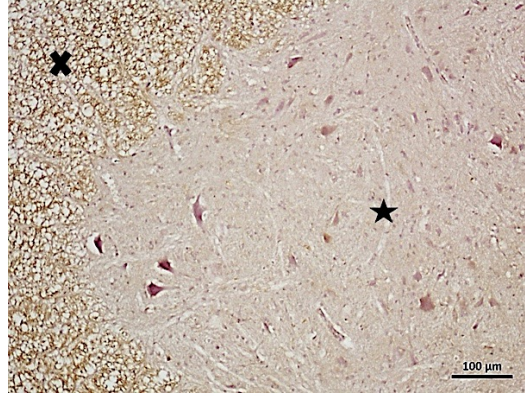
Kullanılan Simge	Şiddeti
-	Sıfır (immünoreaktivite yok)
+	Zayıf
++	Orta
+++	Şiddetli

Tablo 9: İmmünreaksiyon dereceleri

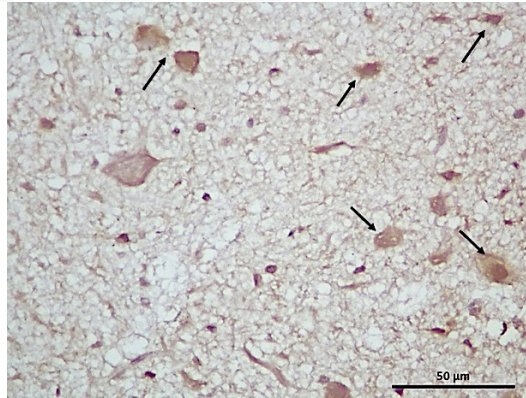
4.2.1.Nix immunreaksiyonu

Travma grubuna ait Nix immünohistokimyasal işaretleme yöntemi uygulanan spinal kordlarda beyaz cevherde daha yüksek olmak üzere (beyaz cevher: +++, gri cevher: ++) her iki cevherde de immünopozitif boyanma olduğu izlendi (Şekil33a). Gri cevherde bulunan nöron

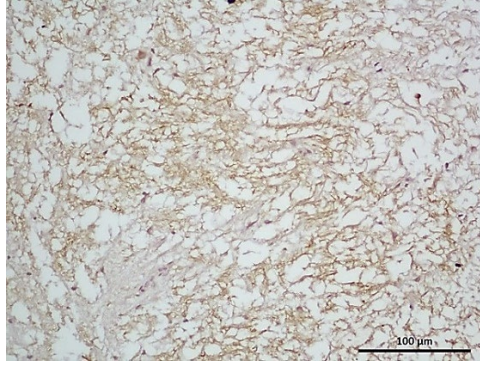
ve gliya hücrelerinin gövdelerinde nükleus ve sitoplazmada immunreaksiyon saptandı (++)
Beyaz cevherde de immünoreaksiyon özellikle aksonlarda görüldü (+++) (Şekil 33 b-c).



Şekil 33 a. Travma grubuna ait spinal kordda gri cevherde (yıldız) nöronlarda ve gliya hücrelerinde, beyaz cevherde gliya hücrelerinde ve sinir liflerinde pozitif boyanma izleniyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 100.

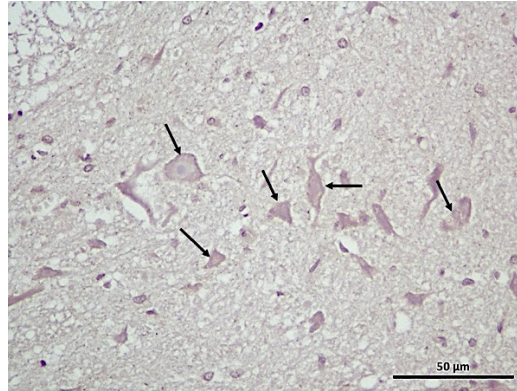


Şekilm33 b. Travma grubuna ait spinal kordun gri cevherinde nöron ve gliya hücrelerinin gövdelerinde nükleus ve sitoplazmalarında pozitif reaksiyon belirgin olarak görülüyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 400.

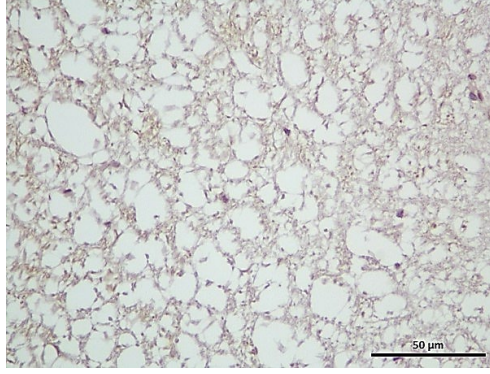


Şekil 33 c. Travma grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde gliya hücrelerinde ve aksonlarda pozitif boyanma izleniyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 200.

Sham grubuna ait Nix immünohistokimya yapılan spinal kordlarda nöronların ve gliya hücrelerinin nükleuslarında pozitif reaksiyon görülmedi. Sitoplazmalarında ise zayıf bir immünoreaksiyon izlendi (+) (Şekil 34 a-b). Beyaz cevherde aksonlarda da reaksiyon zayıftı (Şekil 34 b).

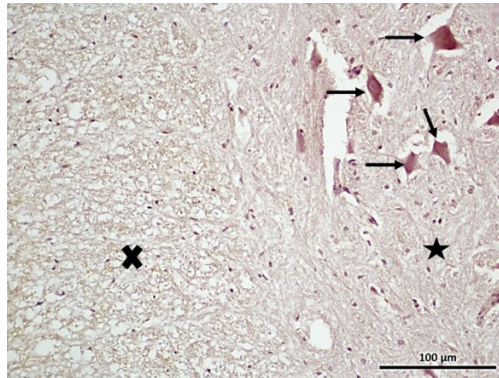


Şekil 34 a. Sham grubuna ait spinal kord gri cevheri, siyah oklar: zayıf immünopozitif boyanmış nöron hücreleri (+) (Nix antikoru, ABC yöntemi X400)

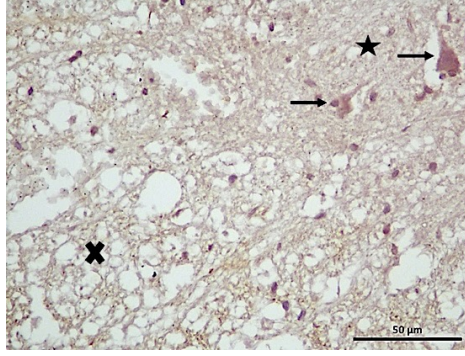


Şekil 34 b. Sham grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde aksonlarda zayıf (+) immünopozitif boyanma görülüyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 400.

Ürolitin A grubuna ait Nix immünohistokimya işaretleme yöntemi uygulanan spinal kordlarda gri cevherde beyaz cevherden daha fazla olmak üzere (beyaz cevher: ++, gri cevher: +++) immünopozitif boyanma olduğu izlendi (Şekil 35 a-b). Gri cevherde bulunan nöronların ve gliya hücrelerinin gövdelerinde nükleus ve sitoplazmada pozitif reaksiyon saptandı (+++). Beyaz cevherde de immünoreaksiyon gliya hücrelerinde ve aksonlarda görüldü (++).

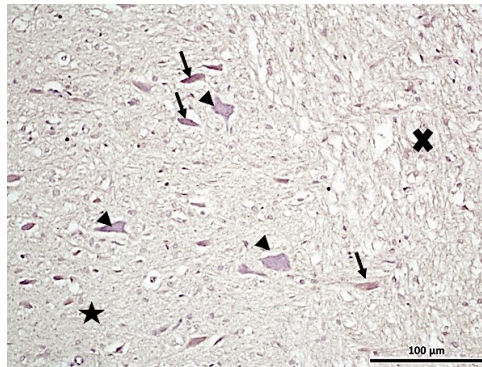


Şekil 35 a. Ürolitin A grubuna ait spinal kordun gri cevherinde nöron (oklar) ve gliya hücrelerinin gövdelerinde nükleus ve sitoplazmada pozitif reaksiyon belirgin olarak görülüyor. Beyaz cevherde de (X işareti) gliya hücrelerinde ve aksonlarda reaksiyon izleniyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 200.

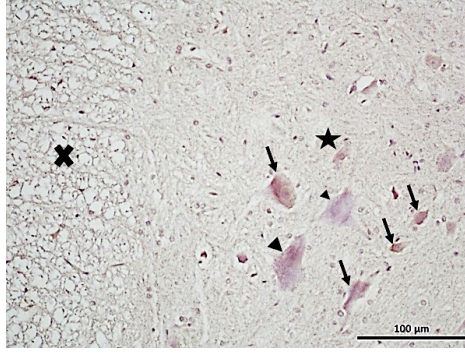


Şekil 35 b. Ürolitin A grubuna ait spinal kordda gri cevherde (yıldız) ve beyaz cevherde (X işareti) nöron (oklar) ve gliya hücrelerinin gövdelerinde nükleus ve sitoplazmada pozitif reaksiyon belirgin olarak görülüyor. Beyaz cevherde (X işareti) gliya hücrelerinde ve aksonlarda reaksiyon izleniyor. Nix antikoru, ABC yöntemi; X 400.

NARE grubuna ait Nix immünohistokimya yöntemi ile işaretlenen spinal kordlarda gri cevherde orta ve beyaz cevherde zayıf immunreaksiyon gözlemlendi. Gri cevherde bulunan bazı nöronların sitoplazmalarında ve glia hücrelerinde orta (++) reaksiyon gözlenirken beyaz cevherdeki gliya hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf reaksiyon (+) saptandı (Şekil 36 a-b).



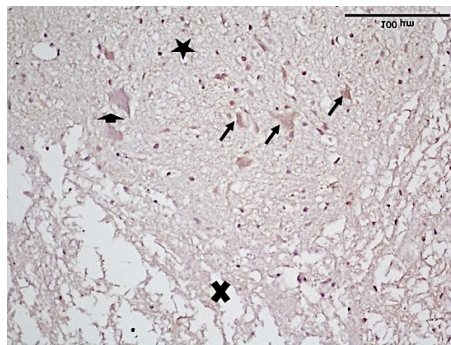
Şekil 36 a. NARE grubuna ait spinal kordda gri cevherde (yıldız) nöron ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında orta (++) reaksiyon görülüyor. Nükleer boyanma görülmemektedir. Beyaz cevherde de gliya hücrelerinin sitoplazmalarında ve aksonlarda boyanma zayıftır (+). Nix antikoru, ABC yöntemi; X 200.



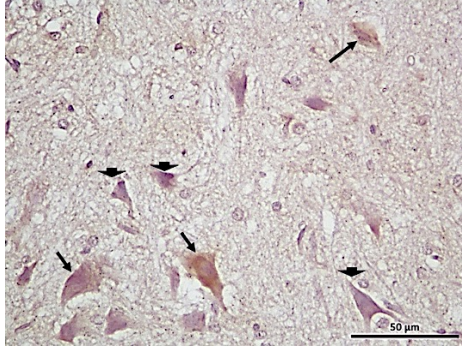
Şekil 36 b. NARE grubuna ait spinal kordda gri cevherde (yıldız) nöron (oklar) ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında orta (++) reaksiyon görülüyor. Nükleer boyanma görülmemektedir. Bazı nöronlarda sitoplazmik boyanma da belirgin değildir (ok başları). Beyaz cevherde de gliya hücrelerinin sitoplazmalarında ve aksonlarda boyanma zayıftır (+). Nix antikoru, ABC yöntemi; X 200.

4.2.2.Parkin immunreaksiyonu

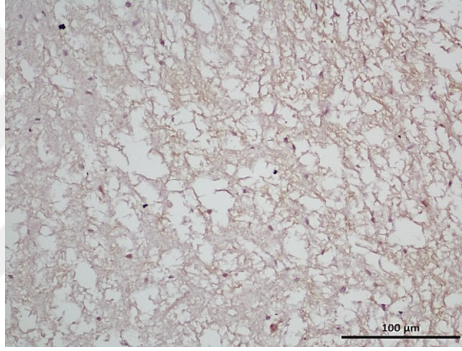
Travma grubuna ait Parkin immünohistokimyasal teknik uygulanan spinal kord kesitleri incelendiğinde gri ve beyaz cevherde nöronların ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında orta (++) immünreaksiyon izlendi (Şekil 37 a-c). Gri cevherdeki nöronların ve gliya hücrelerinin bir kısmında ise nükleer veya sitoplazmik reaksiyon görülmedi (Şekil 37 a-b).



Şekil 37 a. Travma grubuna ait spinal kordun gri cevherinde (yıldız) orta (++) sitoplazmik immünreaksiyon gösteren hücreler oklarla, reaksiyon göstermeyen bir hücre ise kalın okla işaretlenmiştir. Beyaz cevherde de (X işareti) orta boyanma dikkat çekiyor. Bu alanda ödem ve doku hasarı belirgin görülüyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 100.

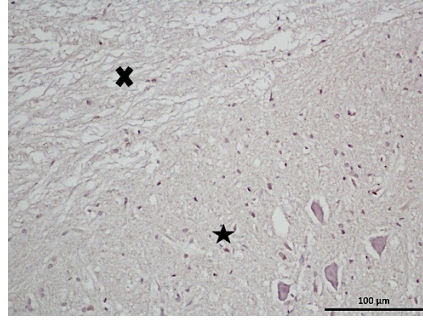


Şekil 37 b. Travma grubuna ait spinal kordun gri cevherinde immunreaksiyon gösteren hücreler oklarla, göstermeyenler kalın oklarla işaretlenmiştir. Alandaki gliya hücrelerinde nükleer veya sitoplazmik pozitiflik görülmemektedir. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

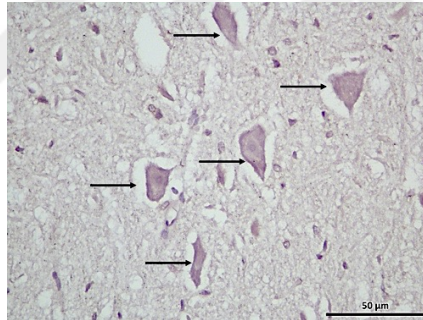


Şekil 37 c: Travmagrubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde aksonlarda orta (++) immünopozitif boyanma görülüyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

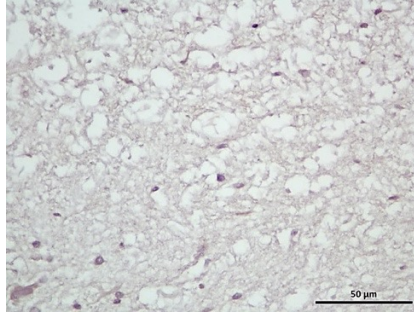
Sham grubuna ait Parkin immünohistokimyasal tekniği uygulanan spinal kord kesitlerinde gri cevher ve beyaz cevherde nöronlarda, gliya hücrelerinde ve aksonlarda genellikle immünoreaksiyon görülmedi. Ancak nadiren nöronların ve gliya hücrelerinin periferik sitoplazmalarında hafif reaksiyon saptandı (Şekil 38 a-b-c).



Şekil 38 a. Sham grubuna ait spinal kordun gri (yıldız) ve beyaz cevherinde (X işareti) belirgin bir immunreaksiyon görülüyor. Ancak resmin sağ alt yarısında görülen nöronların sitoplazmalarının membrana yakın periferik bölgelerinde zayıf (+) boyanma izleniyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 100.

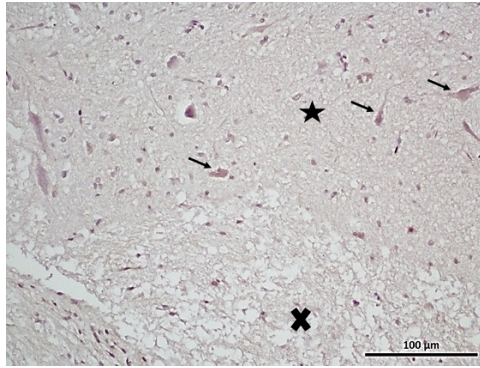


Şekil 38 b. Sham grubuna ait spinal kordun gri cevherinde sadece periferik sitoplazmalarında zayıf (+) reaksiyon görülen nöronlar işaretlenmiştir. Bu durum gliya hücrelerinin bazıları için de geçerlidir. Her iki hücre grubunda da nükleer boyanma izlenmemektedir. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

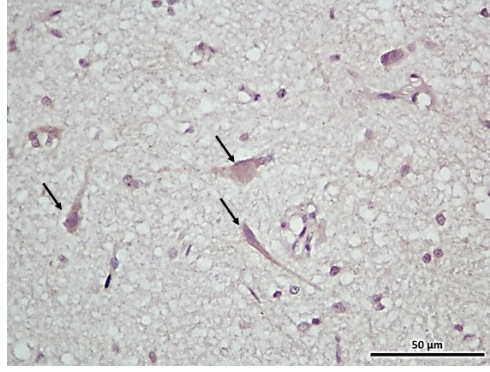


Şekil 38 c. Sham grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde aksonlarda pozitif boyanma görülüyor. Bazı gliya hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf reaksiyon izleniyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

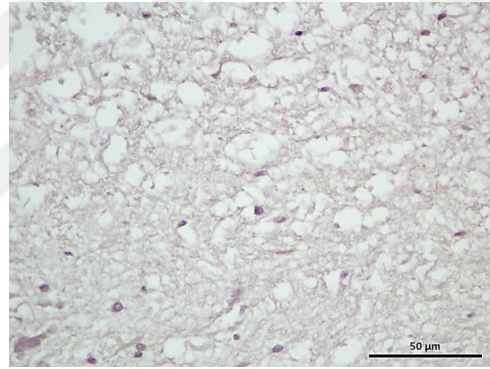
Ürolitin A grubuna ait Parkin immünohistokimyasal tekniği uygulanan spinal kord kesitlerinde gri cevherde bazı nöronların ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf immünopozitif (+) boyanma görüldü. Beyaz cevherde de gliya hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf immünopozitif boyanma saptandı (Şekil 39 a-b-c). Aksonlarda reaksiyon yoktu veya çok zayıftı (Şekil 39 a-c).



Şekil 39 a. Ürolitin A grubuna ait spinal kordun gri cevherinde (yıldız) ve beyaz cevherinde (X işareti) bazı nöronlarda (oklar) ve gliya hücrelerinde zayıf boyanma görülüyor. Aksonlarda da belli belirsiz bir reaksiyon izleniyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 100.

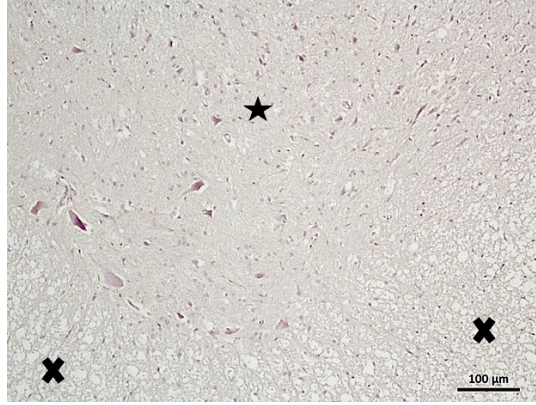


Şekil 39 b. Ürolitin A grubuna ait spinal kordun gri cevherinde bazı nöronların (oklar) ve gliya hücrelerinin periferik sitoplazmalarında zayıf boyanma görülüyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

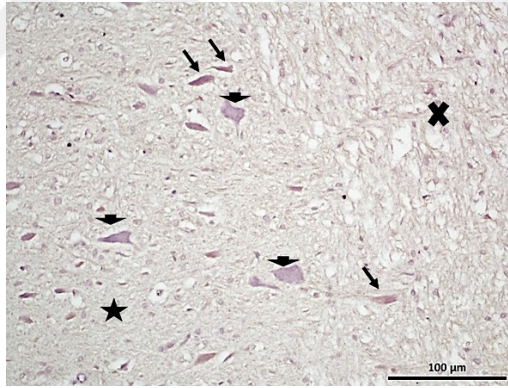


Şekil 39 c. Ürolitin A grubuna ait spinal kordun beyaz cevherinde aksonlarda immunreaksiyonun olmadığı veya çok zayıf olduğu görülüyor. Gliya hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf pozitif reaksiyon izleniyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 400.

Nar Ekstresi grubuna ait Parkin immünohistokimya yapılan spinal kord kesitleri incelendiğinde Ürolitin A grubuna benzer şekilde gri cevherde bazı nöronlarda ve gliya hücrelerinde zayıf immünopozitif (+) boyanma, bazılarında ise negatif boyanma saptandı. Nükleer reaksiyon yoktu. Beyaz cevherde de zayıf immünopozitif boyanma olduğu görüldü (Şekil 40 a-b).



Şekil 40 a. Nar Ekstresi grubuna ait spinal kordun gri cevherinde (yıldız) ve beyaz cevherinde (X işareti) zayıf (+) veya negatif boyanma görülüyor. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 100.



Şekil 40 b. Nar Ekstresi grubuna ait spinal kordun gri cevherinde (yıldız) sitoplazmik reaksiyon gösteren nöronlar oklarla, reaksiyon göstermeyen nöronlar kalın oklarla işaretlenmiştir. Beyaz cevherde de (X işareti) boyanma belirgin değildir. Parkin antikoru, ABC yöntemi; X 200.

GRUP	NİX		PARKİN	
	Beyaz cevher	Gri cevher	Beyaz cevher	Gri cevher
Travma 1	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Travma2	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Travma3	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Travma4	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Travma5	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Travma 6	+++ (%80)	++ (%50)	++ (%50)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron++ (%45)
Sham 1	-(%0)	+ (%15)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
Sham 2	-(%0)	+ (%15)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%30)
Sham 3	-(%0)	+ (%15)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%30)
Sham 4	-(%0)	+ (%15)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
Sham 5	-(%0)	+ (%20)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
Sham 6	-(%0)	+ (%20)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
Sham 7	-(%0)	+ (%15)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
Sham 8	-(%0)	+ (%20)	-(%0)	Bir kısım nöron -(%0) Bir kısım nöron+ (%25)
NARE 1	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
NARE 2	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
NARE 3	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
NARE 4	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
NARE 5	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
NARE 6	+ (20)	+ (%34)	+ (%15)	+ (%15)
ÜRA 1	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)
ÜRA 2	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)
ÜRA 3	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%12)
ÜRA 4	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)
ÜRA 5	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)
ÜRA 6	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)
ÜRA 7	++ (%40)	+++ (%80)	-(%0)	+ (%13)

Tablo 10: Deney gruplarının NİX ve Parkin ile gösterdiği immünreaksiyonun karşılaştırılması

Deney gruplarının gösterdiği immün reaksiyonların derecelerinin Tsai HD ve arkadaşlarının kullandığı derecelendirme yöntemi referans alınarak verilen yüzdelerinin istatistiksel değerlendirilmesi yapıldı

	1-Travma	2-Sham	3-Nar Ek.	4-Uro A	P
Nix beyaz cevher	80(80-80)	0(0-0)	20(20-20)	40(40-40)	<0,001 2-4 0,004 2-1 <0,001 3-1 0,020
Nix gri cevher	50(50-50)	15(15-20)	34(34-34)	80(80-80)	<0,001 2-1 0,011 2-4 <0,001 3-4 0,023
Parkin beyaz cevher	50(50-50)	0(0-0)	15(15-15)	0(0-0)	<0,001 2-3 0,039 2-1 <0,001 4-3 0,049 4-1 <0,001
Parkin gri cevher	45(45-45)	25(25-25)	15(15-15)	13(12-13)	<0,001 4-2 0,004 4-1 <0,001 3-1 0,010

Tablo 11: Deney gruplarının Nix ve Parkin ile immün reaksiyonunun istatistiksel olarak yorumlanması

Nix'in beyaz cevherdeki immün reaksiyonun deney grupları arasındaki karşılaştırılmasına bakıldığında en büyük değer travma grubunda iken en düşük değer sham grubunda görülmüştür. Travma grubu ile sham grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). Nar Ekstresi tedavisi Nix in beyaz cevherde verdiği immün reaksiyonu travma grubuna göre belirgin azaltmaktadır ve sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,020$). Ürolitin A tedavisi de Nix'in bu yanıtını düşürür ama istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildir ($p=0,769$).

Nix'in gri cevherdeki immün reaksiyonuna bakıldığı zaman en yüksek değer Ürolitin A grubunda olup en düşük yine sham grubundadır ($p < 0,001$). Travma grubunda Nix reaksiyonu sham grubuna göre anlamlı yüksek olup ($p=0,011$). Nar Ekstresi grubu Ürolitin A grubuna göre anlamlı şekilde düşüktür ($p=0,023$). Bu durumda Ürolitin A tedavisi gri cevherdeki Nix reaksiyonu travma grubuna göre artırırken nar ekstresi tedavisi azaltmaktadır.

Parkin'in beyaz cevherdeki immün reaksiyonuna bakıldığında yine en yüksek sonuç travma grubunda iken en düşük sonuçlar sham ve Ürolitin A grubunda görüldü ($p < 0,001$). Ürolitin A tedavisi ile beyaz cevherdeki Parkin immünreaksiyonu travma grubuna göre anlamlı şekilde azalırken ($p < 0,001$), Nar Ekstresi tedavisindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,871$).

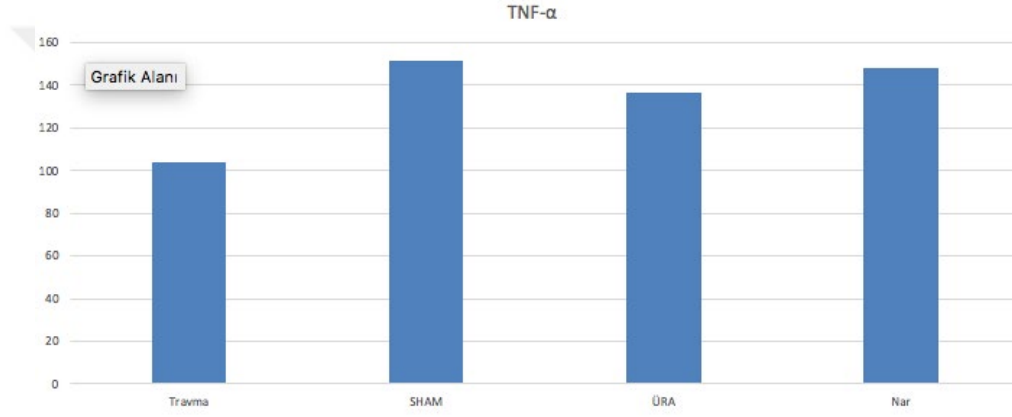
Parkin'in gri cevherdeki immün reaksiyonuna bakıldığında ise en yüksek yanıt travma grubunda iken en düşük yanıt Ürolitin A grubunda görülmüştür. ($p < 0,001$) Nar Ekstresi tedavisinde de ($p=0,010$) Ürolitin A tedavisinde de ($p < 0,001$) travma grubuna göre Parkin gri cevher immünreaksiyonunda anlamlı azalma görülmüştür.

4.3.Doku il-6 ve tnf alfa düzeyleri

Deney gruplarından alınan dokun örneklerinin pool edilerek elisa yöntemi ile değerlendirilmesi sonucu deney grupları ile standartların optik dansitelerinin karşılaştırılması ile gruplara ait TNF- α ve IL-6 konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Çalışma iki tekrarlı yapılarak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. (TNF- α için $p=0,0718$, IL-6 için $p=0,2250$)

ÖRNEK	KONSANTRASYON
Travma	104,0302pg/ul
Sham	151,4199pg/ul
Ürolitin A	136,8973pg/ul
Nar Ekstresi	148,3625pg/ul

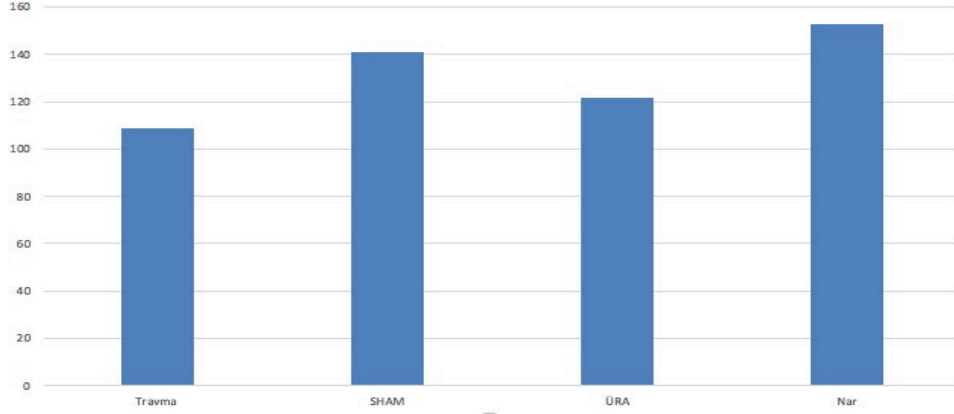
Tablo 12: TNF- α elisa konsantrasyon tablosu



Şekil 41: TNF- α elisa konsantrasyon grafiği

ÖRNEK	KONSANTRASYON
Travma	108,710126pg/ul
Sham	140,987544pg/ul
Ürolitin A	121,664015pg/ul
Nar Ekstresi	152,790973pg/ul

Tablo 13: IL-6 elisa konsantrasyon tablosu

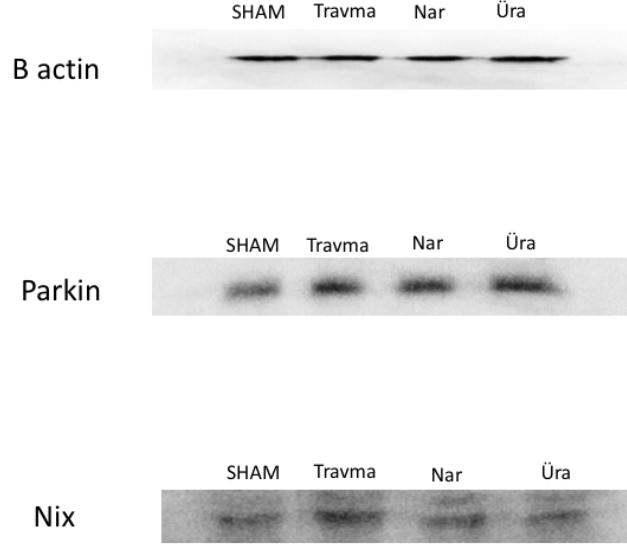


Şekil 42: IL-6 elisa konsantrasyon grafiği

TNF- α düzeyi sham grubunda (151,4199 pg/ul) en yüksek bulunmuş olup onu Nar Ekstresi grubu (148,3625 pg/ul) ve Ürolitin A grubu (136,8973 pg/ul) takip etmektedir. En düşük düzey travma grubunda (104,0302 pg/ul) bulunmuştur. IL-6 için ise en yüksek değer Nar Ekstresi grubunda (152,790973 pg/ul) bulunmuş olup onu sham (140,987544 pg/ul) ve Ürolitin A grubu (121,664015 pg/ul) takip etmektedir. Yine en düşük düzey travma grubunda (108,710126 pg/ul) bulunmuştur. Tüm bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlandırılmamıştır.

4.4. Doku Western blot bulguları

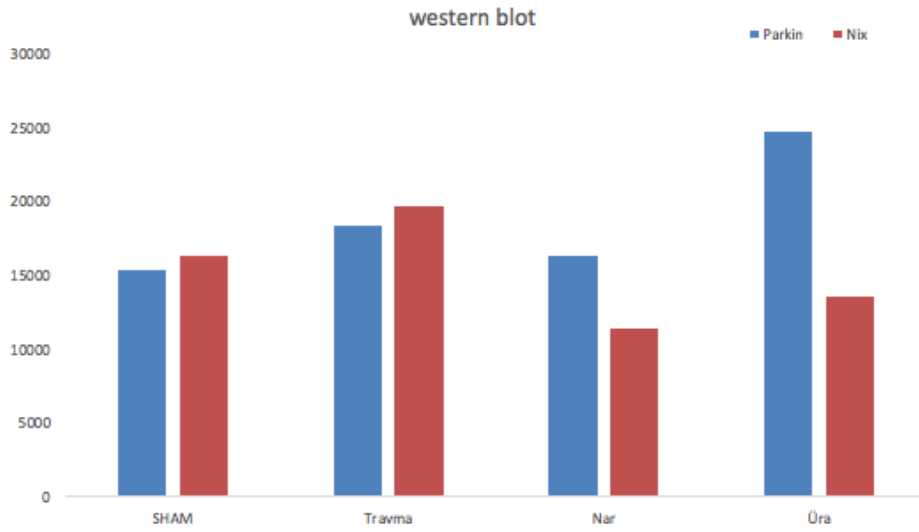
Doku örneklerindeki Nix ve Parkin'in deney gruplarındaki Western blot sonuçlarının konsantrasyonunun B aktin'in konsantrasyonu ile karşılaştırılması sonucu Parkin en yüksek Ürolitin A grubunda (24749,492) ölçülmüş olup sonrasında travma (18383,681) ve sham (15406,217) grubunda ölçülmüştür. En düşük düzey ise Nar Ekstresi grubunda (16398,51) ölçülmüştür. Nix'in ise en yüksek düzeyi travma grubunda (19759,309) olup sonrasında sham (16313,329) ve Ürolitin A (13628,342) grubunda olduğu görülmektedir. En düşük düzey ise Nar Ekstresi grubundadır. (11394,309)



Şekil 43: Parkin ve Nix'in Western blot ile değerlendirilmesi

GRUP	PARKİN	NİX
Sham	15406,217	16313,329
Travma	18383,681	19759,309
Nar Ekstresi	16398,51	11394,309
Ürolitin A	24749,492	13628,342

Tablo 14: Parkin ve Nix'in Western blot sonuçları tablosu



Şekil 44: Parkin ve Nix'in Western blot sonuçları grafiği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada anevrizma kliplleme yöntemiyle sıçanlarda oluşturulan spinal kord hasarı sonrasında uygulanan oral Ürolitin A'nın ve Nar Ekstresi'nin mitofaji üzerine etkileri incelenmiştir.

SKH morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli bir sağlık problemidir. SKH 'na maruz kalan bireyi fiziksel, psikolojik ve ekonomik olarak ciddi bir şekilde etkiler. Tedavi maliyetleri bakımından bireye ve ülkelere ciddi bir maddi yük oluşturmaktadır (1,4). Hala evrensel olarak kabul gören net bir tedavi protokolü olmayışı, dünya genelindeki yaygınlığı ve oluşturduğu hasara bağlı ciddi fiziksel ve psikososyal problemler nedeni ile SKH üzerinde yoğun araştırmaların yapıldığı bir konudur.

SKH birçok farklı travma sebebiyle olabilir. Farklı birçok biyomekanik faktör spinal kordu ve etrafındaki dokuları etkileyebilir. Bu biyomekanik faktörler spinal korda travma anında hasar verebileceği gibi mekanik hasar sonrası oluşabilecek kemik ve ligaman basısı veya kanal içine kanama sonrası gelişen kompresyon ile aynı zamanda kalıcı deformiteye ve kronik olarak spinal kord harabiyetine sebep olabilir. Oluşabilecek instabilite ile posttravmatik kifoz gibi daha ileri yapısal deformiteler gelişip nörolojik durumu kötüleştirebilir. (174)

Hasar sonrası gelişen patofizyolojik süreçlerin iyi anlaşılması geliştirilecek farmakolojik tedavi yöntemleri açısından önemlidir. SKH patofizyoloji temel olarak başlangıçtaki mekanik hasara bağlı (primer) ve sonrasında gelişen vasküler, biyokimyasal ve histopatolojik değişikliklerden oluşan (sekonder) hasar meaknizması ile açıklanır. (49) İlk olarak Allen tarafından 1911 yılında köpekler üzerinde oluşturulan omurilik kontüzyonu sonrası yapılan myelotomi ve hematomyelinin kaldırılmasının nörolojik düzelmeye sebep olduğunun gözlenmesi sekonder hasar konseptine öncülük yapmış olup bu konu ile ilgili deneysel çalışmaların belirli kriterlere bağlanmasına önayak olmuştur. (47,48)

Primer spinal kord hasarı traksiyon ve kompresyon gibi kuvvetlerin spinal kordu etkilemesi ile saniyeler içinde nöral elemanların doğrudan kompresyonu sonucunda yaralanması ile oluşur. Sonrasında nöral hücre membran hasarı, aksonal hasar ve zarar görmüş vasküler yapılar spinal korddaki ödemin artmasına ikincil iskeminin ortaya çıkmasına sebep olur. Sekonder hasar oluşumunda ödem, vasküler iskemi, serbest radikal oluşumu, lipid peroksidasyonu, elektrolit bozuklukları, posttravmatik inflamatuvar reaksiyon, apoptozis ve diğer hücresel düzeydeki reaksiyonlar etkilidir (50). Sekonder hasarın anabileşenlerinden olan inflamasyon spinal kord hasarının patogenezinde akut dönemde kronik dönemde de hayati rol oynamaktadır (85). Mitofaji ise hasarlı mitokondriyi ortadan kaldıran mitokondriyel otofaji olup çalışmalarda SKH patogenezinde önemli bir rolü olabileceği gösterilmiştir (6). Biz de çalışmamızda özellikle inflamasyon ve mitofaji üzerine yoğunlaştık.

SKH’da birçok ajan denenmiş olmasına rağmen hala etkinliği kanıtlanmış bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Sadece metilprednizolon (MP) tedavi protokolü mevcut olup bununda tekralanabilir yararlı etkileri kesin olmayıp yan etki profili geniş olduğu için etkinliği tartışılmaktadır (175,176). Son yıllardaki yayınlarda akut SKH tedavisinde MP protokolü tedavide önerilmeyip tedavi algoritmasından çıkarılmıştır (177).

Nar, böğürtlen, çilek gibi bazı meyvelerde bulunan Ellagiteninlerin (ET) bağırsaklarda Ellajik Aside (EA) dönüşmesinden sonra barsak bakterileri tarafından metabolizasyonu sonucunda oluşan Ürolitin A’nın daha önce antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, antimikrobiyal ve mitofajiyi indükleme gibi etkileri bilinmektedir (167,168,7). Biz de çalışmamızda kardiyak, gastrointestinal, endokrin, merkezi sinir sisteminde beyin gibi birçok sistemin patolojilerinde tedavide araştırılmış olan Ürolitin A’nın daha önce çalışılmadığı travmatik SKH’nda kullanmak istedik.

Nar Ekstresinde bulunmayan ancak bağırsak bakterileri tarafından üretilen Ürolitin A, bağırsak florası bozulmuş bazı insanlarda üretilmemektedir. Bu bağlamda son zamanlarda FDA Ürolitin A preparatlarını onaylanmış ve Amerika’da satışa sunulmuştur. Ancak ağızdan alınan Ürolitin A’nın mitofaji üzerine etkisinin az olduğu yönünde bazı çalışmalar mevcuttur (8). Bu

yüzden çalışmamızda hem Nar Ekstresi hem de saf Ürolitin A'yı kullanarak elde edeceğimiz karşılaştırmalı sonuçlar ile tedavi etkinliğini değerlendirmek istedik.

Kemirgen hayvanların barsak mikrobiyasının EA den Ürolitin A üretmek için yeterli olduğu gösterilmiştir. (7) Nar Ekstresi verilen kemirgenlerin sindirim sisteminde EA'in probiyotikler tarafından dönüştürülmesi ile Ürolitin A oluşur. Biz de Nar Ekstresi vermeyi planladığımız hayvan gruplarına Nar Ekstresi içindeki EA miktarını standartize ederek tüm hayvanlara eşit olacak şekilde uyguladık.

SKH sonrasında hastalarda ilk saatlerden itibaren iskemi, doku hasarı ve hemorojiye karşı akut fizyolojik yanıt olarak inflamasyon oluşur. Endojen mediatörlerin, sitokinlerin salgılanması ve karmaşık bir olaylar zinciri spinal kordun doğal iyileşme sürecini sağlamaya çalışır. Fakat inflamasyondaki aşırılık iyileşme için olumsuz olup çoklu organ yetmezliği, sistemik inflamasyon cevabına sebep olabilir. SKH sonrası sekonder yanıtta ortaya çıkan inflamasyonda öncelikli rolü IL-1, IL-6 ve TNF- α üstlenir. Çalışmamızda hasarlı spinal kord doku örneklerinden inflamatuvar sitokinlerden IL-6 ve TNF- α seviyelerine bakılarak hayvan grupları arasında karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmalarda SKH sonrasında 3-24 saat arası bir sürede kontüzyon bölgesinde TNF- α ve IL-6 miktarı hızlıca yükselir (87,88).

TNF- α ve IL-6 beklediğimiz sonucun aksine en düşük travma grubunda çıkmış olup bu literatür bilgisine uymamaktadır. Bunun sebebi travmanın şiddeti, dokuda TNF- α ve IL-6 düzeylerine bakılma süresi olabilir. TNF- α düzeyi en yüksek sham grubunda olup Ürolitin A grubunun hem TNF- α hem de IL-6 seviyeleri Nar Ekstresi grubuna göre düşük bulunmuştur. Çalışmamızda hayvan gruplarındaki doku örnekleri havuzlanarak ELİSA yöntemi ile iki tekrarlı çalışılarak sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmış olup sonuçlarda deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Otofaji kusurlu sitozolik bileşenleri lizozomal yolla ortadan kaldıran bir mekanizma iken mitofaji hasarlı mitokondriyi ortadan kaldıran mitokondriyel otofajidir. Yapılan çalışmalarda SKH patogenezinde mitofajinin etkili olduğu gösterilmiştir. Fakat SKH'nda hala mitofaji ile ilgili çok az rapor mevcuttur. Bazı çalışmalar mitofajinin hasarlı mitokondrinin

ortadan kaldırılmasının nöronal hücrelerde koruyucu bir etki yaptığını söylesede enerji arzını azaltmada zararlı bir rol oynayıp oynamadığı belirsizdir (6). 2013 yılında Zhang ve ark. tarafından serebral iskemi ve perfüzyon hasarı üzerine yapılan bir çalışmada mitofajinin nöronal hasara karşı koruyucu bir etkisi olduğu söylenirken, Mart 2021 de Nie ve ark. tarafından yapılan başka bir yayında aşırı mitofajinin SKH'nda nöronal ölüme yol açtığı ve SKH'nda aşırı mitofajiyi aktive etmek için LC3 ile etkileşime giren Nix'in inhibisyonunun muhtemel bir nöroprotektif etki yaptığı bildirilmiştir. (178,179)

BNIP3 ve Nix mitofajiye dahil olan mitokondriyal BH3 proteinleri olup son çalışmalar, mitofajinin BNIP3 ve onun homologu Nix tarafından spesifik olarak aktive edildiğini göstermiştir. Bu anlamda Nix bir mitofaji markerı olarak kabul edilebilir. Bir E3 ubiquitin ligazı olan Parkin de mitofajiyi teşvik etmek için PINK1 ile etkileşim yoluyla depolarize mitokondriye alınır (144,145). Mitokondriyel parkin seviyesindeki artma mitofajiyel aktivitenin önemli bir göstergesidir (146,147). Biz de çalışmamızda hasarlı spinal kord dokusunda hem immünohistokimyasal olarak hem de Western blot ile Nix ve Parkin'e baktık.

Yapılan bir çalışmada SKH sonrasında mitofajinin aktive olduğu, BNIP3, Nix ve p53'ün arttığı gözlemlenmiş, 24 saat sonra elektron mikroskopu ile mitofajinin göstergesi olarak yorumlanan mitofagozomlar gösterilmiş. Western blot'da ise Nix ve BNIP3 ekspresyonu yaralanmadan 6 saat sonra belirgin artmış, 24 saat sonra pik yapmış ve 96 saat sonra da düşmeye başlamış (6). Biz de bu bağlamda mitofaji odaklı çalışmamızın süresini SKH sonrasında 48. saatte hayvanların sakrifikasyonu yapılacak şekilde planladık.

Çalışmamızda immünohistokimyasal inceleme sırasında immünboyama yapılmadan önce direk histolojik bakıda hemotoksilen ve eosin (HE) ile boyanmış kesitlerde travma grubu örneklerinin gri ve beyaz cevherlerinde hücre düzeninin bozulduğu, doku ödeminin arttığı ve kanama alanları görüldü. Sham grubunda ise gri ve beyaz cevherin normal histolojik yapısının korunup beyaz cevher de yer yer az miktarda ödem alanlarının olduğu görüldü. Ürolitin A grubunda normal histolojik yapı korunduğu görülse de yer yer ödem ve kanama alanları vardı. Nar Ekstresi grubu ise sham grubuna en yakın histolojik görünüme sahip olan gruptu. Direkt

histolojik bakıda Nar Ekstresi tedavisinin Ürolitin A tedavisine üstün olarak doku histolojisi rejenerasyonu açısından olumlu etki ettiği sonucu çıkarılabilir.

Nix ve Parkin ile immünreaksiyon derecesinin belirlenmesi amacı ile Tsai HD ve ark. kullandığı derecelenme yöntemi referans alınarak verilen yüzdeler gruplar arasında istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Nix ile immünreaksiyon sonuçlarına bakıldığında travma grubunda beyaz cevher %80 median değer ile boyanırken, gri cevher %50 boyanma gösterip en yüksek immünboyanma gözlenen grup oldu. Sham grubu ise %0 beyaz cevher, %15 gri cevher boyanması ile en az reaksiyon gözlenen grup oldu. Nix'in beyaz cevher immünreaksiyonunun istatistiksel karşılaştırılmasında travma ve sham gruplarının arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p=0,004$). Aynı şekilde gri cevherde de anlamlı bir düşüklük gözlendi ($p=0,011$). Sham grubuna en yakın boyanma %20 beyaz cevher, %34 gri cevher boyanması ile Nar Ekstresi grubu oldu. Nar Ekstresi tedavisinin verildiği grup ile travma grubu arasındaki beyaz cevher reaksiyonu karşılaştırıldığında Nar Ekstresi grubunda anlamlı bir düşüklük saptandı. ($p=0,020$) Nix ile verilen immün reaksiyon gri ve beyaz cevher için birlikte değerlendirildiğinde en fazla boyanma olan travma grubuna göre Nar Ekstresi tedavisinde anlamlı bir düşüklük görülürken Ürolitin A grubunda beyaz cevher reaksiyonu açısından bir azalma olsada istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. ($p=0,769$) Bu bilgiler ışığında çalışmamızda iyi bir mitofaji markeri olan Nix'in Nar Ekstresi tedavisi ile azalması birçok çalışmada bahsedilen mitofajinin artmasının nöroprotektif etki yapacağı sonucuna uymamaktadır. Fakat Nie ve ark. yaptığı çalışmada bahsedilen Nix'in ve dolaylı olarak aşırı mitofajinin azalmasının nöroprotektif etki yaptığı sonucu çalışmamızın sonucuna paralel olup çalışmamızdaki hemotoksilen eosin boyanması yapılan direk bakıda doku bütünlüğünün Nar Ekstresi grubunda travmaya göre daha iyi olması da bu durumu desteklemektedir (179). Ürolitin A tedavisinin Nar Ekstresi kadar etkin olmaması da oral Ürolitin A tedavisinde sistemik dolaşıma yeterli etken madde geçmemesi ile ilgili çalışmayı destekler bir sonuçtur. (8)

Beyaz cevherdeki parkin reaksiyonuna bakıldığında en yüksek boyanma travma grubunda iken en düşük boyanma sham ve Ürolitin A grubunda olup istatistiksel olarak bu düşüklük anlamlıdır. ($p<0,001$) Nar Ekstresi grubu da yine travma grubuna göre düşük bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,871$).

Parkin için gri cevher reaksiyonu bakımından bazı hücrelerde hiç reaksiyon gözlenmezken bazı hücrelerde orta şiddette (travma grubu) bazılarında ise hafif şiddette boyanma görülmüştür. Gri cevherdeki reaksiyon veren hücreler bakımından en yüksek boyanan grup yine travma grubu iken sham grubu 2.sırada olup beyaz cevher parkin boyanmasına paralel değildir.

Western blot sonuçlarının konsantrasyonu B aktin ile karşılaştırıldı. Nix'in en yüksek düzeyi immünohistokimya sonuçlarına benzer şekilde travma grubunda çıktı. Yine immünohistokimya sonuçlarına paralel şekilde Nar Ekstresi tedavisi Ürolitin A'ya göre Nix'de daha fazla azalmaya neden oldu. Parkin konsantrasyonu değerlendirildiğinde ise travma grubunda Nix'e benzer şekilde sham grubuna kıyasla artmış konsantrasyon verdiği görüldü. Nar ekstresi tedavisi Parkin seviyesinde de azalmaya neden oldu. Ürolitin A grubunda ise Parkin seviyesinin düşmediği ve seviyesinde artış saptandığı gözlemlendi. Sonuç olarak mitofaji markeri olan Nix'in gerek immünohistokimyasal gerekse Western blot çalışmalarındaki sonuçları anlamlandırılabilen, tutarlı ve Nie ve ark. tarafından yapılan çalışmayı destekler şekilde olduğu görüldü. Parkin ise her ne kadar mitofajide önemli bir molekül olsa da çalışmamızda Parkin için net anlamlandırılabilir sonuçlar elde edilemedi. (179)

6. SONUÇ

Bu çalışmadaki veriler ışığında SKH'nda Ürolitin A ve Nar Ekstresi tedavisinin mitofajiyi baskıladığı gösterildi. Böylece aşırı mitofaji baskılanarak nöroprotektif etki hedeflendi. Nar Ekstresi tedavisinin mitofaji üzerine Ürolitin A'dan daha etkili olduğu saptandı. SHK gibi karmaşık ve zor bir patoloji için mitofaji araştırmaların derinleştirilebileceği bir konudur. Bununla beraber gerek Ürolitin A'nın gerek de Nar Ekstresi tedavisinin daha fazla denek üzerinde, uzun süreli takipler yapılarak ve daha geniş kapsamlı verilerden de yararlanılarak çalışılması SKH başta olmak üzere birçok patolojide olumlu çıkarımlar doğurabilir. Bu bağlamda çalışmamızın daha ileri çalışmalara yol gösterici olacağını umut ediyoruz.

KAYNAKLAR

- 1.Fehlings MG, Tator CH. An evidence-based review of decompressive surgery in acute spinal cord injury: rationale, indications, and timing based on experimental and clinical studies. *J Neurosurg*. 1999 Jul;91(1 Suppl):1-11. doi: 10.3171/spi.1999.91.1.0001. PMID: 10419353.
- 2.Center NSCIS (2018) Facts and figures at a glance. The University of Alabama at Birmingham, Birmingham
3. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*. 2019 Mar 22;10:282. doi: 10.3389/fneur.2019.00282. PMID: 30967837; PMCID: PMC6439316.
- 4.McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet*. 2002 Feb 2;359(9304):417-25. doi: 10.1016/S0140-6736(02)07603-1. PMID: 11844532.
5. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol*. 2019 Mar 22;10:282. doi: 10.3389/fneur.2019.00282. PMID: 30967837; PMCID: PMC6439316.
6. Yu, D., Li, M., Ni, B. et al. Induction of Neuronal Mitophagy in Acute Spinal Cord Injury in Rats. *Neurotox Res* 24, 512–522 (2013).
- 7.Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. *et al.* Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat Med***22**, 879–888 (2016).
- 8.Mena, P., Dall’Asta, M., Calani, L., Brighenti, F., & Del Rio, D. (2017). Gastrointestinal stability of urolithins: an in vitro approach. *European journal of nutrition*, 56(1),99-106.

9.Sadler TW. 2004. *Langman's medical embryology*. Philadelphia: Lippincott, Williams, and Wilkins. pp 65–115.

10.Çav ar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi Ed. M. Zileli ve A.Fahir Özer, 2.baskı, cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002,s: 15-17.

11.Catala M, Teillet MA, De Robertis EM, LeDouarin ML. A spinal cord fate map in the avian embryo: while regressing, Hensen's node lays down the notochord and floor plate thus joining the spinal cord lateral walls. *Development* 1996; 122: 2599– 610.

12. Kuwar Chhetri P, M Das J. *Neuroanatomy, Neural Tube Development and Stages*. 2021 Jul 29. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32491346.

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

14.Standring S.,Editor-in-Chief, Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the antomy and physiology of the human body. 20. Baskı, Phedelphia-Lea &Febiger 2000.

15.Netter FH. The Ciba Collection of Medical Illustrations, Cilt 1, 1. Baskı,New Jersey:CIBA Pharma, 1983:11-20.

16.CarpenterM.B.,andSutin,J.HumanNeuroanatomy8.Baskı,Battlimore:Williams&Wilkins,1983.

17.A oğan S. A. Fahir Özer : Omuriliğin vasköler anatomisi ve kan akımı, Omurilik ve Omurga Cerrahisi , Ed. M.Zileli, A. Fahir Özer, 2. baskı, Meta Basım, Bornova, İzmir, 2002, s: 87-90

18.Xarchas K, Bourandas J. Injuries and disease of the Spine in ancient times. Spine 2003; 28(13): 1481-4.

19.Wilkins RH: Neurosurgical classics1. American association of neurosurgical surgeons. Park ridge, II. 1992; sf: 1-5.

20.Naderi S, Zileli M, Özer AF. Omurga Cerrahisinin Tarihçesi, Omurilik ve Omurga Cerrahisi Ed. M. Zileli, Fahir Özer, 2. baskı, cilt 1, Meta Basım, Bornova, İzmir 2002; 1-13

21.Knoeller SM, Seifried C. Historical perspective: history of spinal surgery. Spine 2000; 25: 2838-43

22.Sonntag VKH. History of degenerative and traumatic disease of the spine.In a history of neurosurgery. Greenblat SH. American Association of Neurological Surgeons 1997; 355-7.

23.Markham JW. Surgery of the spinal cord and vertebral column, in Walker AE (ed): A History of Neurological Surgery. New York: Hafner 1967; 3

24.İplikçioğlu C. Omurilik yaralanmasının fizyopatolojisi. Omurilik Omurga Cerrahisi,Ed. M. Zileli, Fahir Özer, 1. Baskı, İzmir, Saray Medikal Yayıncılık 2002; 459-65.

25.Kwon BK, Oxland TR, Tetzlaff W. Animal models used in spinal cord regeneration research. Spine 2002; 27(14): 1504-10.

26.Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery* 1999; 44(5): 1027-40

27.Gündüz B, Erhan B. Updates in ASIA Evaluation: Lower Extremity Motor Evaluation [Omurilik Yaralanması Nörolojik Sınıflaması için Uluslararası Standartlar Değerlendirme Formunun Güncellenmesi]. *Turk J Phys Med Rehab* 2015;61(1):19–24

28.Gunduz B. ASIA Update - ASIA Impairment Scale: Level Determination, Classification, and Case Examples. *Turk J Phys Med Rehab* 2015;61(Supp 1):25–31.

29. Roberts TT, Leonard GR, Cepela DJ. Classifications In Brief: American Spinal Injury Association (ASIA) Impairment Scale. *Clin Orthop Relat Res.* 2017 May;475(5):1499-1504. doi: 10.1007/s11999-016-5133-4. Epub 2016 Nov 4. PMID: 27815685; PMCID: PMC5384910.

30.Kirshblum SC, Biering-Sorensen F, Betz R, Burns S, Donovan W, Graves DE, Johansen M, Jones L, Mulcahey MJ, Rodriguez GM, Read MS, Steeves JD, Tansey K, Waring W. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury: Cases with classification challenges. *J Spinal Cord Med* 2014;37(2):120–127.

31.NowakDD, LeeJK, GelbDE, PoelstraKA, LudwigSC. Central cord syndrome. *J Am Acad Orthop Surg* 2009;17(12):756– 65

32.Ranga U, Aiyappan SK. Brown-Séguard syndrome. *Indian J Med Res* 2014;140(4):572–3.

33.McKinley W, Santos K, Meade M, Brooke K. Incidence and Outcomes of Spinal Cord Injury Clinical Syndromes. *J Spinal Cord Med* 2007;30(3):215–24.

34. Brouwers E, van de Meent H, Curt A, Starremans B, Hosman A, Bartels R. Definitions of traumatic conus medullaris and cauda equina syndrome: a systematic literature review. *Spinal Cord* 2017;55(10):886–90.

35. Catz A, Itzkovich M, Agranov E, Ring H, Tamir A. SCIM - spinal cord independence measure: a new disability scale for patients with spinal cord lesions. *Spinal Cord* 1997;35(12):850–6.

36. Gresham GE, Labi MLC, Dittmar SS, Hicks JT, Joyce SZ, Stehlik MAP. The quadriplegia index of function (QIF): Sensitivity and reliability demonstrated in a study of thirty quadriplegic patients. *Spinal Cord* 1986;24(1):38–44.

37. Hadley MN, Walters BC, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, Hurlbert RJ, Rozzelle CJ, Ryken TC, Theodore N. Clinical assessment following acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery* 2013;72:40–53.

38. Bluvshstein V, Front L, Itzkovich M, Aidinoff E, Gelernter I, Hart J, Soerensen FB, Weeks C, Laramee MT, Craven C, Hitzig SL, Glaser E, Zeilig G, Aito S, Scivoletto G, Mecci M, Chadwick RJ, El Masry WS, Osman A, Glass CA, Silva P, Soni BM, Garner BP, Savi G, Bergström EM, Catz A. SCIM III is reliable and valid in a separate analysis for traumatic spinal cord lesions. *Spinal Cord* 2010;49(2):292–6.

39. İlhan A, Gurel A, Armutcu F, İraz M, Öztas 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.

40. Hoçnuter M, Ba u u O, Armut u F, Kargi E, İçik emir 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.

41. Ilhan A, K.U., Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 16(1): 458-63.

42. Tator, C.H., Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie*, 1991. 37(5): p. 291-302.

43. Hall, E.D., Pathophysiology of spinal cord injury. Current and future therapies. *Minerva Anesthesiol*, 1989. 55(3): p. 63-6.

44. 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.

45. Onifer SM, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.* 2007; 48(4): 385-95.

46. 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.

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

48. Gerçek A, Adil M, Konya D, Özgen S. Propofol Reduces Reactive Oxygen Radical Dependent Lipid Peroxidation after Experimental Spinal Cord Injury in Rats *J.Neurol.Sci.[Turk]* 2007;24:129-34

49. Dimitrijevic, M.R.; Danner, S.M.; Mayr, W. Neurocontrol of movement in humans with spinal cord injury. *Artif. Organs* 2017, *39*, 823–833.
50. Alizadeh, A.; Dyck, S.M.; Karimi-Abdolrezaee, S. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Front. Neurol.* 2019, *10*, 282.
51. Hall ED. The neuroprotective pharmacology of methylprednisolone. *J Neurosurg.* 1992; *76*: 13-22.
52. Hall ED, Braugher JM. Effects of intravenous methylprednisolone on spinal cord lipid peroxidation and Na⁺-K⁺-ATPase activity. *J Neurosurg.* 1982; *57*: 247-253.
53. Tator CH. Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie.* 1991; *37*: 291-302.
54. Guha A, Tator CH, Rochon J. Spinal cord blood flow and systemic blood pressure after experimental spinal cord injury in rats. *Stroke.* 1989; *20*: 3: 372-377.
56. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* 1999; *144*: 857-868.
57. Tator, C.H. and M.G. Fehlings, Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*, 1991. *75*(1): p. 15-26.

58. Wallace, M.C., C.H. Tator, and P. Frazee, Relationship between posttraumatic ischemia and hemorrhage in the injured rat spinal cord as shown by colloidal carbon angiography. *Neurosurgery*, 1986. 18(4): p. 433-9.

59. Dumont, R.J., et al., Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol*, 2001. 24(5): p. 254-64.

60. Choi, D.W., Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci*, 1988. 11(10): p. 465-9.

61. Faden, A.I. and R.P. Simon, A potential role for excitotoxins in the pathophysiology of spinal cord injury. *Ann Neurol*, 1988. 23(6): p. 623-6.

62. Meldrum, B., Possible therapeutic applications of antagonists of excitatory amino acid neurotransmitters. *Clin Sci (Lond)*, 1985. 68(2): p. 113-22.

63. Amar, A.P. and M.L. Levy, Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, 1999. 44(5): p. 1027-39; discussion 1039-40.

64. Braugher, J.M., L.A. Duncan, and R.L. Chase, Interaction of lipid peroxidation and calcium in the pathogenesis of neuronal injury. *Cent Nerv Syst Trauma*, 1985. 2(4): p. 269-83.

65. Dumont, R.J., et al., Acute spinal cord injury, part II: contemporary pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol*, 2001. 24(5): p. 265-79.

66.Vehbi Gülmen, M.Z., Omurilik yaralanmalarında farmakolojik tedavi, in Omurilik ve omurga cerrahisi, M. Zileli, Editor. 2002. p. 833.

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

68.Zileli M: Omurilik yaralanmasının farmakolojik tedavisi. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. Ed. Zileli M, Özer AF, 2. Baskı, Saray Medikal yayıncılık, İzmir, 2002, s: 833- 840.

69.Barut, S., et al., Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. Neurosurg Rev, 1993. 16(1): p. 53-9.

70.Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 1993. 49(3): p. 481-93.

71.Sakamoto, A., et al., Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. Brain Res, 1991. 554(1-2): p. 186-92.

72.Uzan, M., Medulla spinalis yaralanmalarında fizyopatoloji, in Medulla spinalis yaralanmaları, M. Hancı, Editor. 2000. p. 152-161.

73.Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. Nature medicine. 1997;3(1):73-6.

74.Wang Z, Zhang C, Hong Z, Chen H, Chen W, Chen G. C/EBP homologous protein (CHOP) mediates neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury. Experimental and therapeutic medicine. 2013;5(1):107-11.

75. Galluzzi L, Vitale I, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*. 2012;19(1):107-20.
76. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):3.
77. Nicotera P, Ankarcrona M, Bonfoco E, Orrenius S, Lipton S. Neuronal necrosis and apoptosis: two distinct events induced by exposure to glutamate or oxidative stress. *Advances in neurology*. 1997;72:95-101.
78. Hockenbery D. Defining apoptosis. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):16.
79. Kane AB. Redefining cell death. *The American journal of pathology*. 1995;146(1):1.
80. Beattie MS, Farooqui AA, BRESNAHAN JC. Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2000;17(10):915-25.
81. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Wu Y-P, Chen W-S. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(3):287.
82. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96(2):245-54.
83. Nagata S. Apoptosis by death factor. *cell*. 1997;88(3):355-65.

84. Yu WR, Fehlings MG. Fas/FasL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application. *Acta neuropathologica*. 2011;122(6):747-61.
85. Genovese T, Esposito E, Mazzon E, Di Paola R, Caminiti R, Bramanti P, et al. Absence of endogenous interleukin-10 enhances secondary inflammatory process after spinal cord compression injury in mice. *J Neurochem*. 2009;108:1360–72.
86. Shen LF, Cheng H, Tsai MC, Kuo HS, Chak KF. PAL31 may play an important role as inflammatory modulator in the repair process of the spinal cord injury rat. *J Neurochem*. 2009;108:1187–97.
87. Habgood MD, Bye N, Dziegielewska KM, Ek CJ, Lane MA, Potter A, et al. Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci*. 2007;25:231–8.
88. Pineau I, Lacroix S. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved. *J Comp Neurol*. 2007;500:267–85.
89. Pan JZ, Ni L, Sodhi A, Aguanno A, Young W, Hart RP. Cytokine activity contributes to induction of inflammatory cytokine mRNAs in spinal cord following contusion. *J Neurosci Res*. 2002;68:315–22.
90. Lammertse DP. Update on pharmaceutical trials in acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2004;27:319–25.

- 91.Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC, Beattie MS. Tumor necrosis factor-alpha induces cFOS and strongly potentiates glutamate-mediated cell death in the rat spinal cord. *Neurobiol Dis.* 2001;8:590–9.
- 92.Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. National Acute Spinal Cord Injury Study. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *JAMA.* 1997;277:1597–604.
- 93.Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muia C, Bramanti P, et al. Immunomodulatory effects of etanercept in an experimental model of spinal cord injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;316:1006–16.
- 94.Xu J, Fan G, Chen S, Wu Y, Xu XM, Hsu CY. Methylprednisolone inhibition of TNF-alpha expression and NF-kB activation after spinal cord injury in rats. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998;59:135–42.
- 95.Okada S, Nakamura M, Mikami Y, Shimazaki T, Mihara M, Ohsugi Y, et al. Blockade of interleukin-6 receptor suppresses reactive astrogliosis and ameliorates functional recovery in experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res.* 2004;76:265–76.
- 96.Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Johno M. Methylprednisolone reduces spinal cord injury in rats without affecting tumor necrosis factor-alpha production. *J Neurotrauma.* 2001;18:533–43.
- 97.Lacroix S, Chang L, Rose-John S, Tuszynski MH. Delivery of hyper-interleukin-6 to the injured spinal cord increases neutrophil and macrophage infiltration and inhibits axonal growth. *J Comp Neurol.* 2002;454:213–28.

98. Fu ES, Saporta S. Methylprednisolone inhibits production of interleukin-1 β and interleukin-6 in the spinal cord following compression injury in rats. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2005;17:82–5.
99. Tian DS, Xie MJ, Yu ZY, Zhang Q, Wang YH, Chen B, et al. Cyclosporin A attenuates microglia induced inflammatory response and alleviates neuronal cell death after spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2007;1135:177–85.
100. Thuret S, Moon LD, Gage FH. Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:628–43.
101. Zhou Z, Peng X, Insolera R, Fink DJ, Mata M. IL-10 promotes neuronal survival following spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2009;220:183–90.
102. Saito T, Sadoshima J. Molecular mechanisms of mitochondrial autophagy/mitophagy in the heart. *Circ Res.* 2015;116:1477-1490.
103. Tang YC, Tian HX, Yi T, Chen HB. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell.* 2016;7:699-713.
104. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 2014;24:92-104.
105. Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM. The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol.* 2008;28:5747-5763.

- 106.Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res.* 2005;8:3-5.
- 107.Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73:775-795
- 108.Tan S, Wong E. Mitophagy transcriptome: mechanistic insights into polyphenol-mediated mitophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:9028435.
- 109.Dunn WA Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol.* 1990;110:1923-1933.
- 110.Gustafsson AB, Gottlieb RA. Recycle or die: the role of autophagy in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:654-661.
- 111.Lemasters JJ. Variants of mitochondrial autophagy: types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (type 3). *Redox Biol.* 2014;2:749-754.
- 112.Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000;19:5720-5728.
- 113.Yoo SM, Jung YK. A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol Cells.* 2018;41:18-26.

- 114.Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. 2015;524:309-314.
- 115.Park S, Choi SG, Yoo SM, Son JH, Jung YK. Choline dehydrogenase interacts with SQSTM1/p62 to recruit LC3 and stimulate mitophagy. *Autophagy*. 2014;10:1906-1920.
- 116.Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*. 2012;13:378-385.
- 117.Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*. 2010;8:e1000298.
- 118.Chaugule VK, Burchell L, Barber KR, et al. Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain. *EMBO J*. 2011;30:2853-2867.
- 119.Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, et al. Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J*. 2014;460:127-139.
- 120 Fیزیopat 65 Dorn GW. Parkin-dependent mitophagy in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;95:42-49.
- 121.Ham SJ, Lee SY, Song S, Chung JR, Choi S, Chung J. Interaction between RING1 (R1) and the ubiquitin-like (UBL) domains is critical for the regulation of Parkin activity. *J Biol Chem*. 2016;291:1803-1816.
- 122.Kim Y, Park J, Kim S, et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;377:975-980.

123.Chen Y, Dorn GW. PINK1-phosphorylated mitofusin 2 is a Parkin receptor for culling damaged mitochondria. *Science*. 2013;340:471-475.

124.Tong M, Sadoshima J. Mitochondrial autophagy in cardiomyopathy. *Curr Opin Genet Dev*. 2016;38:8-15.

125 .Koyano F, Okatsu K, Kosako H, et al. Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature*. 2014;510:162-166.

126.Strappazon F, Nazio F, Corrado M, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ*. 2015;22:419-432.

127.Hwang S, Disatnik MH, Mochly-Rosen D. Impaired GAPDH-induced mitophagy contributes to the pathology of Huntington's disease. *EMBO Mol Med*. 2015;7:1307-1326.

128.Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy. Lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:1125-1136.

129.Mijaljica D, Prescott M, DevenishRJ. Microautophagy in mammalian cells. Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. 2011;7:673-682.

130.Yogalingam G, Hwang S, Ferreira JC, Mochly-Rosen D. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) phosphorylation by protein kinase Cdelta (PKCdelta) inhibits mitochondria elimination by lysosomal-like structures following ischemia and reoxygenation-induced injury. *J Biol Chem*. 2013;288:18947-18960.

- 131.Kunz JB, Schwarz H, Mayer A. Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem*. 2004;279:9987-9996.
- 132.Campbell CL, Thorsness PE. Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in yme1 yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J Cell Sci*. 1998;111:2455-2464.
- 133.Nowikovsky K, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ*. 2007;14:1647-1656.
- 134.Farré JC, Krick R, Subramani S, Thumm M. Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol*. 2009;21:522-530.
- 135.Kissová I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem*. 2004;279:39068-39074.
- 136.Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S, Camougrand N. Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*. 2007;3:329-336.
- 137.Kanki T, Klionsky DJ. Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem*. 2008;283:32386-32393.
- 138.Tal R, Winter G, Ecker N, Klionsky DJ, Abeliovich H. Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Biol Chem*. 2007;282:5617-5624.

- 139.Sugiura A, McLelland GL, Fon EA, McBride HM. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J*. 2014;33:2142-2156.
- 140.McLelland GL, Soubannier V, Chen CX, McBride HM, Fon EA. Parkin and PINK1 function in a vesicular trafficking pathway regulating mitochondrial quality control. *EMBO J*. 2014;33:282-295.
- 141.Soubannier V, McLelland GL, Zunino R, et al. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol*. 2012;22:135-141.
- 142.Soubannier V, Rippstein P, Kaufman BA, Shoubridge EA, McBride HM. Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS ONE*. 2012;7:e52830.
- 143.Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW 2nd, Yin XM. Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem*. 2010 Sep 3;285(36):27879-90. doi: 10.1074/jbc.M110.119537. Epub 2010 Jun 23. PMID: 20573959; PMCID: PMC2934655.
- 144.Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol*. 2010 Jan 26;8(1):e1000298. doi: 10.1371/journal.pbio.1000298. PMID: 20126261; PMCID: PMC2811155.
- 145.Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrané J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu K, Przedborski S. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jan 5;107(1):378-83. doi: 10.1073/pnas.0911187107. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19966284; PMCID: PMC2806779.

146.Li Q, Gao S, Kang Z, Zhang M, Zhao X, Zhai Y, Huang J, Yang G-Y, Sun W and Wang J (2018) Rapamycin Enhances Mitophagy and Attenuates Apoptosis After Spinal Ischemia-Reperfusion Injury. *Front. Neurosci.* 12:865. doi: 10.3389/fnins.2018.00865

147.Ashrafi, G., Schwarz, T. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* **20**, 31–42 (2013). <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.81>

148.Neirinx 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.

149.Braugher JM, Hall ED. Involvement of lipid peroxidation in CNS injury. *J Neurotrauma* 1992; 9:1-7.

150.TumaR.F.,VasthareU.S.,ArforsK.E,YoungW.F.Hypertonic saline administration attenuates spinal cord injury. *J Trauma* 1997 May;42(5 Suppl):S54-60.

151.KhanT,HaveyRM,SayersST,PatwardhanA,KingWW.Animal models of spinal cord contusion injuries. *Lab Anim Sci.* 1999;49(2):161-72.

152.Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ. Three-Dimensional Analysis of the Vascular System in the Rat Spinal Cord with Scanning Electron Microscopy of Vascular Corrosion Casts. Part 2: Acute Spinal Cord Injury. *Neurosurgery.* 1993;33(2):285-92.

153.Hurlbert RJ, Hadley MN, Walters BC, et al. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery.* 2013;72(suppl 2):93-105.

154. Walters BC, Hadley MN, Hurlbert RJ, et al. Guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries: 2013 update. *Neurosurgery*. 2013;60(suppl 1):82-91.

155. Teles AR, Cabrera J, Riew KD, Falavigna A. Steroid use for acute spinal cord injury in Latin America: a potentially dangerous practice guided by fear of lawsuit. *World Neurosurg*. 2016;88:342-349.

156. Druschel C, Schaser KD, Schwab JM. Current practice of methylprednisolone administration for acute spinal cord injury in Germany: a national survey. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38: E669-E677.

157. Fu ES, Tummala RP: Neuroprotection in brain and spinal cord trauma. *Current opinion in anaesthesiology*, 18: 181-187, 2005

158. Gülmen V, Zileli M. Omurilik yaralanmasında farmakolojik tedavi. In: Zileli M, Özer F (eds): Omurilik ve omurga cerrahisi, 2. baskı. İzmir: META Basım ve Matbaacılık Hizmetleri; 2002: 833-839.

159. 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.

160. Hall ED, Braughler JM, McCall JM. Antioxidant effect in brain and spinal cord injury. *J Neurotrauma* 1992; 9:165- 172.

161. Tator CH. Experimental and clinical studies of the pathophysiology and management of acute spinal cord injury. *J Spinal Cord Med* 1996; 19:206-214.

162. Huang Lixin, Mehta MP, Nanda A, et al. The role of multiple hyperbaric oxygenation in expanding therapeutic windows after acute spinal cord injury in rats. *J Neurosurg (Spine 2)* 2003; 99:198-205

163. Yu Y, Matsuyama Y, Yanase M, et al. Effects of hyperbaric oxygen on GDNF expression and apoptosis in spinal cord injury. *Neuroreport*. 2004; 15(15):2369-2373.

164. Bakkalbaşı E, Menteş O, Artik N. Food ellagitannins-occurrence, effects of processing and storage. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Mar;49(3):283-98. doi: 10.1080/10408390802064404. PMID: 19093271.

165. Larrosa M, González-Sarrías A, García-Conesa MT, Tomás-Barberán FA, Espín JC. Urolithins, ellagic acid-derived metabolites produced by human colonic microflora, exhibit estrogenic and antiestrogenic activities. *J Agric Food Chem*. 2006 Mar 8;54(5):1611-20. doi: 10.1021/jf0527403. PMID: 16506809.

166. Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarrías A, Selma MV, Espín JC. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J Agric Food Chem*. 2014 Jul 16;62(28):6535-8. doi: 10.1021/jf5024615. Epub 2014 Jul 1. PMID: 24976365.

167. Espin JC, Larrosa M, Garcia-Conesa MT, Tomas-Barberan F. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid- derived metabolites: the evidence so far. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:270418.

168. Bialonska D, Kasimsetty SG, Khan SI, Ferreira D. Urolithins, intestinal microbial metabolites of pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem.* 2009;57(21):10181-10186.

169. Vural A, Nergis Y, Arslan A, Uzunlar K. Deneysel spinal kord travmalarında dopamin ile kombine nimodipin ve nalorfinin etkileri

170. 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

171. D Ğoğlu M Ğzgi N Ünal ÖF. Omurilik Travmalarında İkincil Hasar Mekanizmaları. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 1998; 4(3): 147-57.

172. Guada M, Ganugula R, Vadhanam M, Ravi Kumar MNV. Urolithin A Mitigates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Inhibiting Renal Inflammation and Apoptosis in an Experimental Rat Model. *J Pharmacol Exp Ther.* 2017 Oct;363(1):58-65. doi: 10.1124/jpet.117.242420. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28784820.

173. Tsai JC, Penella MA, Yoshizumi M, Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine. *Proc Natl Acad Sci,* 1994, 91: 6369-73.

174. Huges T. *Neuropathology of the spinal cord.* Young RR, Woolsey RM, ed. *Diagnosis and Management of Disorders of the Spinal Cord.* Philadelphia: W B Saunders. 1995; 49-67.

175. H. Chikuda, H. Yasunaga, K. Takeshita et al., “Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical spinal cord injury: a

propensitymatched analysis using a nationwide administrative database,” *Emergency Medicine Journal*, vol. 31, no. 3, pp. 201–206, 2014.

176. R.J. Hurlbert, M.N. Hadley, B.C. Walters et al., “Pharmacological therapy for acute spinal cord injury,” *Neurosurgery*, vol. 72, Supplement 2, pp. 93–105, 2013.

177. H. Chikuda, H. Yasunaga, K. Takeshita et al., “Mortality and morbidity after high-dose methylprednisolone treatment in patients with acute cervical spinal cord injury: a propensitymatched analysis using a nationwide administrative database,” *Emergency Medicine Journal*, vol. 31, no. 3, pp. 201–206, 2014.

178. Zhang X, Yan H, Yuan Y, Gao J, Shen Z, Cheng Y, Shen Y, Wang RR, Wang X, Hu WW, Wang G, Chen Z. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. *Autophagy*. 2013 Sep;9(9):1321-33. doi: 10.4161/auto.25132. Epub 2013 Jun 12. Erratum in: *Autophagy*. 2019 Jun;15(6):1124. PMID: 23800795.

179. Nie, P., Wang, H., Yu, D. *et al.* NIX Mediates Mitophagy in Spinal Cord Injury in Rats by Interacting with LC3. *Cell Mol Neurobiol* (2021). <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01082-7>