

Klinik Araştırma

Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması

Ebru Polat*, Necati Gökmen**, Elvan Özmen**, Alper Bağrıyanık***, Mahir Kuyumcu**, Atalay Arkan**

*Giresun Devlet Hastanesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kliniği, **Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, ***Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada spinal kord travması (SKT) oluşturulan ratlarda, farklı zaman dilimlerinde intravenöz olarak uygulanan aktive protein C (APC)'nin koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 32 adet Wistar Albino türü dişi rat alındı. Deneklere cerrahi işlem öncesi eter anestezi uygulandı. Grup L (n:2): Laminektomi uygulandı. Grup APC 30 (n:6): İntravenöz 100 µg kg⁻¹ APC verildi ve 30 dk. sonra SKT oluşturuldu. Grup SF (n:6): SKT oluşturulduktan hemen sonra intravenöz 1 mL SF verildi. Grup APC akut (n:6): SKT oluşturulduktan hemen sonra intravenöz 100 µg kg⁻¹ APC verildi. Grup APC 6 (n:6): SKT oluşturulduktan 6 saat sonra intravenöz 100 µg kg⁻¹ APC verildi. Grup APC 12 (n:6): SKT oluşturulduktan 12 saat sonra intravenöz 100 µg kg⁻¹ APC verildi. Spinal kord travması, Yaşargil anevrizma klibi (Aesculap FE 721 K) dura ve spinal kordu çepçevre saracak şekilde bir dk. süreyle kliplenerek gerçekleştirildi. Tüm deneklerin fonksiyonel iyileşmeleri 1., 3., 5., 7., 14., 21., 28., ve 35. günlerde Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) lokomotor skorlama ile değerlendirildi ve 35. gün sonunda histopatoloji için örnekler alındı.

Bulgular: Nörodavranışsal testlerin sonuçları karşılaştırıldığında APC uygulanan gruplarda SF grubuna göre 28. ve 35. günlerde anlamlı iyileşme olduğu gözlemlendi. Histopatolojik olarak yapılan değerlendirmelerde miyelinli akson ve nöron sayısı açısından APC uygulanan gruplarda SF grubuna göre anlamlı yükseklik gözlenirken glia hücresi sayısı açısından SF grubunda diğer gruplara göre anlamlı yükseklik bulundu.

Sonuç: APC'nin uzun dönemde motor fonksiyonlarda düzelmeye sağladığı, nöron ve miyelinli aksonları koruduğu, glia hücresi oluşumunu azalttığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Spinal kord yaralanması, aktive protein C, nöron koruma, rat

SUMMARY

Neuroprotective Efficacy of Activated Protein C in An Experimental Spinal Cord Injury Model in Rats

Objective: In this study, we aimed to investigate the neuroprotective effect of intravenous (iv) Activated Protein C (APC) in an experimental spinal cord injury (SCI) model in rats.

Material and Methods: Thirty two Wistar Albino female rats were included in the study. Before surgery, anesthesia was applied to the rats. Group L (n:2): Laminectomy was performed. Group APC 30 (n:6): iv 100 µg kg⁻¹ APC was injected 30 minutes before SCI. Group SF (n:6): iv 1 mL % 0.9 NaCl was injected just after SCI. Group APC acute (n:6): iv 100 µg kg⁻¹ APC was injected right after SCI. Group APC 6 (n:6): iv 100 µg kg⁻¹ APC was injected six hours after SCI. Group APC 12 (n:6): iv 100 µg kg⁻¹ APC was injected 12 hours after SCI. Spinal cord injury was induced by applying Yasargil aneurysm clip on dura and spinal cord (Aesculap FE 721 K). Functional recovery was rated by Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) locomotive rating scale scores determined at 3., 5., 7., 14., 21., 28., and 35. days. After locomotor activity tests, samples were evaluated histopathologically.

Results: We have observed significant recovery on APC group as compared to the SF group at 28. and 35. days based on the results of locomotor activity tests. Significant increase in the number of myelinated axons and neurons on APC groups as compared to the SF group was observed, meanwhile in the SF group we found significant increase in glial cells.

Conclusion: APC protects neurons and myelinated axons and decreases the glial cell production.

Key words: Spinal cord injury, activated protein C, neuroprotection, rat

J Turk Anaesth Int Care 2011; 40(4):212-221

Received / Alındığı Tarih: 31.10.2011

Accepted / Kabul Tarihi: 27.12.2011

Yazışma adresi: Uzm. Dr. Elvan Özmen, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İzmir
e-posta: elvan.ocmen@deu.edu.tr

GİRİŞ ve AMAÇ

Spinal kord travması (SKT); bireyin ve ailesinin yaşam kalitesini olumsuz olarak etkileyen bir durumdur.⁽¹⁾ Dünyada çeşitli ülkelerdeki spinal kord yaralanmasının yıllık insidansı milyonda 15-40 arasındadır. Spinal kordun tam hasarlanmasında; zedelene spinal kord seviyesinin altında total motor ve duysal fonksiyon kaybı saptanırken, tam olmayan hasarda lezyon altında motor veya duysal fonksiyonların bir kısmının korunması söz konusudur.⁽²⁾

Travmatik spinal kord yaralanmasında nörolojik fonksiyonların geri dönüşünü sağlayacak yeni bir tedavi seçeneğinin bulunması mortalite ve morbiditenin azalmasını sağlayabilir. Günümüzde SKT'dan sonraki ilk 8 saat içinde uygulanan metilprednizolonun en yararlı tedavi seçenekleri içinde gösterilmiş olmasına rağmen sonuçları tartışmalıdır.⁽³⁾ SKT'da bugüne kadar pek çok farmakolojik ajan denenmesine rağmen, klinik çalışmalarda yararları gösterilememiştir. Ancak, yeni nöroprotektif ajanlar içinde minosiklin ve eritropoetin ile ilgili çalışmalar ümit vericidir.⁽⁴⁾

Travma sonrası spinal kord yaralanmasının yalnızca primer mekanik hasara değil, sekonder patofizyolojik değişikliklere de bağlı olduğu bilinmektedir.⁽⁵⁾ Primer hasarın tıbbi ya da cerrahi tedavisi bulunmamaktadır, ancak sekonder değişikliklerin oluşum mekanizmalarını anlamak ve engellemek teorik olarak mümkün görülmektedir.⁽⁶⁾ Günümüzde akut SKT'nin tedavisi özellikle hasar sonrası patofizyolojik mekanizmalarla oluşan hasarın azaltılmasına odaklanmıştır.⁽⁷⁾ Temel mekanik hasarı izleyen sekonder hasarda, hasarlı bölgeye lökosit girişinin artması ve oluşan inflamasyonun rolünün büyük olduğu bilinmektedir. Lökosit aktivasyonu sonucu,

oksidatif aktivite artışı, fagositoz ve migrasyon hareketi oluşmaktadır.⁽⁸⁾

Protein C (PC) hepatositlerde K vitamini-ne bağımlı olarak üretilen bir serin proteazı olup, dolaşımında inaktif formda bulunmaktadır. Çeşitli proinflamatuvar olaylar sonucu endotel hücrelerinde oluşan trombin-trombomodülin kompleksi, endotelial protein C reseptörü (EPCR) varlığında PC'yi aktif formuna dönüştürerek, aktive protein C (APC) oluşmasına neden olur.⁽⁹⁾ APC; antitrombotik, profibrinolitik, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklere sahiptir.⁽¹⁰⁾ Murakami ve ark.⁽¹¹⁾ APC'nin; monositlerden tümör nekrozis faktör α (TNF- α) üretimini inhibe ederek nötrofillerin aktivasyonunu engellediğini ve sonuç olarak endotel hücre hasarını önlediğini göstermişlerdir. Taoka ve ark.⁽¹²⁾, çalışmalarında, APC'nin travmaya bağlı oluşan spinal kord hasarının sekonder etkilerini önleyebileceği sonucuna varmıştır.

Çalışmamızda deneysel SKT oluşturulan ratlarda, farklı zaman dilimlerinde intravenöz (iv) olarak uygulanan APC'nin SKT'a karşı koruyucu etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı Araştırmaları Etik Kurulu onayı alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilen, % 87 homojeniteye sahip, ağırlıkları 200-250 g arası değişen ve normal motor aktiviteye sahip 32 adet Wistar Albino türü dişi rat çalışmaya alındı. Denekler standart la-

boratuvar koşullarında (12 saat gündüz -12 saat gece olacak şekilde ışıklandırma, 20-22°C oda ısısı, % 50-60 nem) bulundu. Yiyebilecekleri kadar su ve yiyecek verildi.

Çalışma sürecinde enfeksiyon oluşan ve spinal travma oluşturulamayan denekler çalışmadan çıkarıldı.

Ratlarda Spinal Travma Oluşturulması:

Eter anestezisi uygulanan ratlar yüzüstü pozisyonda tespit edildi. Rektal sıcaklık monitörizasyonu ile, işlem süresince, vücut sıcaklıkları 37°C'de tutuldu. Deneklerin sırt bölgesinde, interskapuler mesafe referans alınarak, 3x2 cm'lik alan traş edildi ve povidon iyot ile lokal antisepsi uygulandı. Yüz üstü pozisyonda T₅-T₁₂ seviyesinde orta hat insizyonu yapıldı. Cilt, ciltaltı dokular ve paravertebral kas fasyası geçilerek kaslar laterale künt disseksiyon ile sıyrıldı ve T₇-T₁₀ laminaları görüldü. T₇ seviyesinde total laminektomi uygulandı ve duramaterin zedelenmemesine dikkat edildi. Bu seviyede spinal kord standart travma amacıyla 63 g kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klibi (Aesculap FE 721 K) ile dura ve spinal kordu çepeçevre sarsacak şekilde bir dk. süreyle sıkıştırıldı. Daha sonra klip kaldırıldı ve hemostazı takiben insizyon sahası anatomik katlarına uygun olarak 3/0 ipek ile kapatıldı. Denekler kafeslerine yerleştirildi. Serbestçe beslenmelerine izin verilerek refleks mesane gelişene kadar günde iki kez el ile kompresyon yapılarak mesaneleri boşaltıldı. Üriner ve cerrahi sahada gelişebilecek bir enfeksiyondan korumak amacıyla tüm ratlara ilk 3 gün 40 mg kg gün⁻¹ sefazolin sodyum (Cefamezin, Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Tic. A.Ş., İstanbul/Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Postoperatif dönemde ağrı tedavisi için Buprenorfin 0.02 mg kg⁻¹ intramüsküler yapıldı.

Çalışma Grupları; Grup L (n:2); Bu gruptaki ratlara yalnızca laminektomi uygulandı. Grup SF (n:6); SKT oluşturulduktan hemen sonra iv 1 mL serum fizyolojik (SF) verildi. Grup APC 30 (n:6); SKT oluşturulmadan 30 dk. (dk) önce, Grup APC akut (n:6); SKT oluşturulduktan hemen sonra, Grup APC 6 (n:6); SKT oluşturulduktan 6 saat sonra ve Grup APC 12 (n:6); SKT oluşturulduktan 12 saat sonra iv tek doz 100 µg kg⁻¹ APC verildi.

Davranış Testleri ve Fonksiyon Kayıplarının İncelenmesi:

Deney sonrasında tüm deneklerde fonksiyon kayıplarının ve fonksiyonel iyileşmenin davranış testleri ile değerlendirilmesi, tedavi grupları hakkında bilgi sahibi olmayan bir çalışmacı tarafından "Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) behavior rating scale" kullanılarak yapıldı.⁽¹³⁾ Denekler fonksiyon kayıpları yönünden spinal yaralanma oluşturulmasından hemen sonraki 24., 48., 72. saatlerde ve 1., 2., 3., 4., 5. haftalarda değerlendirildi ve fonksiyon kayıp skorları belirlendi.

Histopatolojik İnceleme:

Denekler 5. haftanın sonunda davranış testleri ve fonksiyon kayıplarının değerlendirilmesi yapıldıktan sonra açık damla yöntemi ile eter anestezisi altında transkardiyak SF ve bunu izleyen % 10'luk formol ile perfüze edildikten sonra sakrifiye edildi. Spinal yaralanma bölgesi merkezde olacak şekilde 1.5 cm'lik bir medulla spinalis (MS) parçası çıkarılarak % 10'luk tamponlu formalin solüsyonu içerisinde 48 saat süre ile fikse edildi. Yaralanma bölgesi merkezde olacak şekilde 2 mm kaudal, 4 mm rostral alan içeren kesitler uygulanarak doku takip işlemi yapıldı. Rutin histolojik doku takip sonrası parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile 5 µm'lik transvers MS seri kesitler alındı. Deparfinizasyon sonrası doku değerlendirmesi

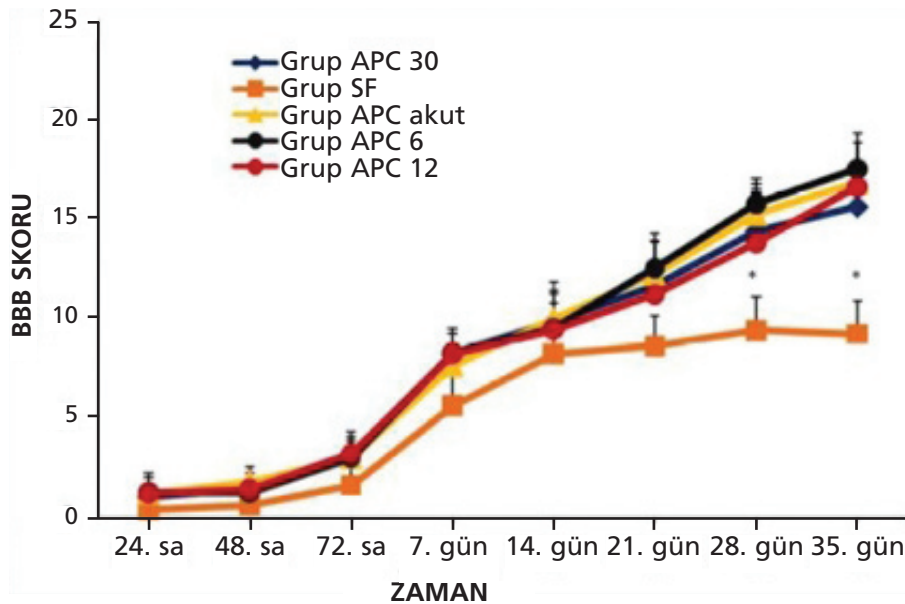
için H-E boyası ile boyandı. H-E ile boyalı kesitlerden Olympus BH2 ve JVC dijital kamera yardımı ile her gruba ait MS transvers kesitleri dijital olarak görüntü- lendi. UTHSCSA Image Tool for Windows version 3.00 dijital görüntü analiz progra- mıyla 100 µm x 100 µm alana sahip sayım çerçevesi kullanılarak glia hücresi sayısı (GHS), gri cevherde nöron sayısı (NS) ve ak cevherde de myelinli akson sayısı (MAS) hesaplandı.

İstatistik: İstatistik analiz SPSS istatistik programının 15.0 versiyonu kullanılarak yapıldı ve sonuçlar ortanca (minimum- maksimum) biçiminde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis, bunu izleyen Mann-Whitney U testle- ri kullanıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tip 1 hatayı kontrol eden tüm karşılaştırmalar için Bonferoni düzeltmesi uygulandı ve ($p = 0,05/4$ anlamlı kabul edildi.) Grafik 1'de BBB skorları $\text{ort} \pm \text{standart sapma}$ olarak verilmiştir.

BULGULAR

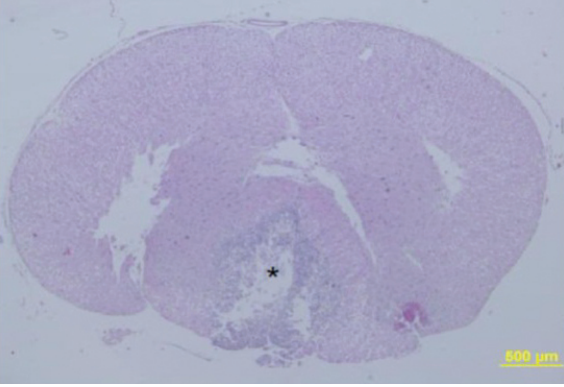
Laminektomi grubunda 2, diğer gruplarda 6 olmak üzere, altı grupta toplam 32 de- nek kullanıldı. Grup APC30'dan 1 rat postoperatif 14. günde yara yeri enfeksiyo- nu, Grup SF'den 1 rat postoperatif 30.gün ve Grup APC akut'tan 1 rat postoperatif 30. gün sağ arka ayaklarında gelişen enfeksiyon Grup APC 6'dan 1 rat postope- ratif 24. gün yara yeri, 1 rat postoperatif 30. gün boğaz altında enfeksiyon, Grup APC 12'den 1 rat postoperatif 28. günde sol glutea bölgesinde enfeksiyon sonucu kaybedildi.

Grupların vücut ağırlıkları; Grup APC 30; 237,50 (230-240), Grup SF; 240,00 (235,00-250,00), Grup APC akut; 235,00 (230,00-245,00), Grup APC 6; 241,00 (237,00-245,00), Grup APC 12; 246,00 (239,00-249,00) olarak bulundu. Gruplar arasında vücut ağırlıklarının ortalamaları- nın karşılaştırılmasında; anlamlı fark bu- lunmadı ($p = 0,05$).

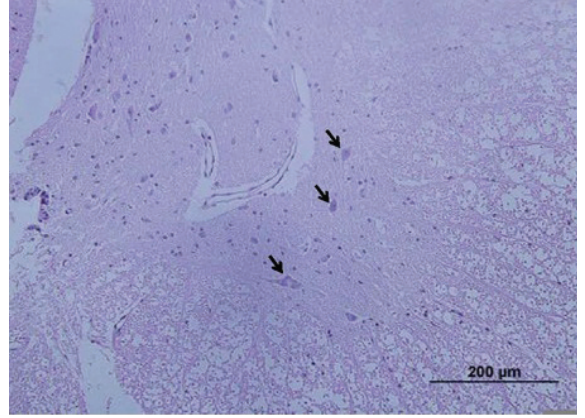


* $p < 0,05$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı düşük

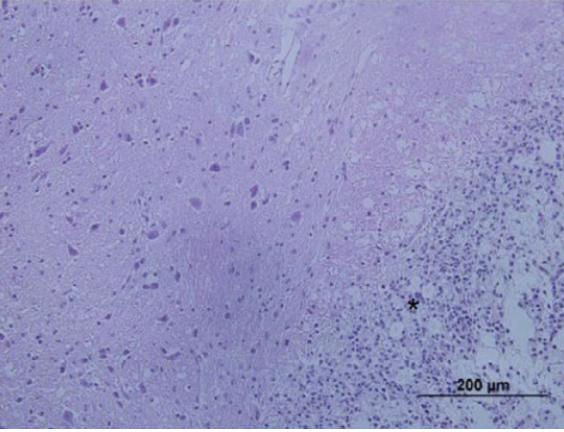
Grafik 1. Grupların Basso, Beattie, Bresnahan skorları ortalama değerleri.



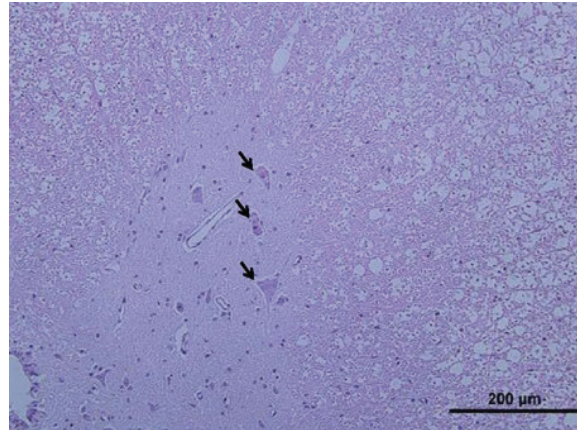
Resim 1. SF grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı (*) görüntüsü (H-Ex40 büyütme).



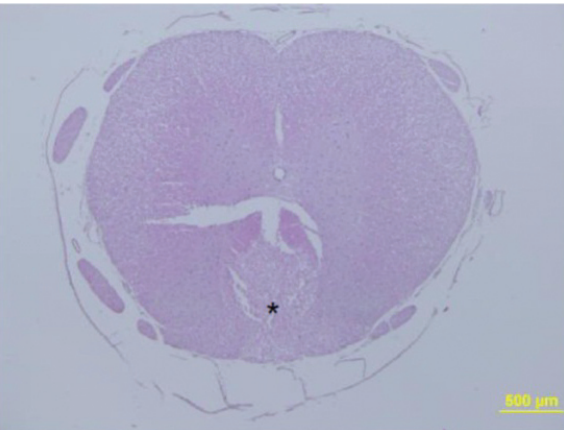
Resim 4. APC akut grubundan bir deneğe ait sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme).



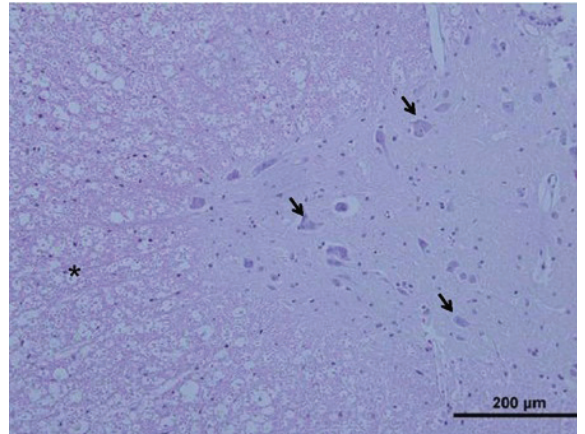
Resim 2. SF grubunda 2. denekten alınan kesitte görülen glial hücre artışı (*) (H-Ex100 büyütme).



Resim 5. APC 6 grubundan bir deneğe ait belirgin ve sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme).



Resim 3. APC 30 grubuna ait bir deneğin medulla spinalisinin transvers kesitinde lezyon alanı görüntüsü (*) (H-Ex40 büyütme).



Resim 6. APC 12 grubundan bir deneğe ait belirgin glial hücelere (*) oranla daha fazla ve sağlam yapıda nöronların (↘) görüntüsü (H-Ex100 büyütme).

Tablo I. Grupların nöron, glial hücre ve myelinli akson sayıları ortalama değerleri ortanca± Minimum-maksimum).

Grup	Nöron sayısı	Glia hücresi sayısı	Miyelinli akson sayısı
Grup APC 30	1,60 (1,60-1,70)	8,30 (7,90-9,90)	19,30 (17,90-19,80)
Grup SF	1,20 (1,10-1,30)*	12,50 (11,90-13,90)#	16,30 (15,90-16,50)*
Grup APC akut	1,60(1,50-1,60)	8,89 (8,20-10,10)	19,10 (17,90-19,90)
Grup APC 6	1,50 (1,50-1,60)	9,10 (8,70-10,10)	19,00 (17,90-19,90)
Grup APC 12	1,50 (1,50-1,60)	8,40 (7,90-9,90)	18,80 (18,10-19,00)

* $p<0,01$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı düşük

$p<0,01$ Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında anlamlı yüksek

Tüm grupların BBB skorları ortalama değerleri karşılaştırıldığında; 1., 2., 3., 7. 14., ve 21 günlerde istatistiksel anlamlı fark bulunmadı (Grafik 1).

Gruplar arasında 28. gün BBB skorları ortalama değerleri; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 karşılaştırıldığında; Grup SF BBB skorları ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu (sırasıyla $p=0,004$; $p=0,002$; $p=0,010$; $p=0,010$) (Grafik 1). APC verilen grupların kendi aralarında yapılan karşılaşımlarda anlamlı fark saptanmadı.

Gruplar arasında 35. gün BBB skorları ortalama değerleri Grup SF ile APC verilen gruplar karşılaştırıldığında; Grup SF BBB skorları ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu ($p<0,01$) (Grafik 1). APC verilen grupların karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmadı.

Grup SF deneklerine ait spinal kord kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının bozulduğu, nöron sayısının azaldığı ve hücre yapısının net izlenemediği, glia hücresi reaksiyonu ve yaygın demiyelinizasyon bulguları olduğu gözlemlendi (Resim 1 ve 2).

Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 deneklerine ait spinal

kord kesitlerinin incelenmesi sonucunda; gri cevher yapısının daha net izlendiği, GHS'nın daha az ve NS'nın daha fazla olduğu, myelin ve akson yapısının daha iyi korunduğu görüldü (Resim 3-6).

Grupların sağlam NS ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile APC verilen gruplar arasında; Grup SF ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu. APC gruplarının kendi aralarındaki karşılaşımlarda anlamlı fark saptanmadı (Tablo I).

Gruplar arasında GHS ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 arasında Grup SF ortalama değerleri anlamlı yüksek bulundu. APC verilen gruplar GHS açısından kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (Tablo I).

Gruplar arasında MAS ortalama değerleri karşılaştırıldığında; Grup SF ile Grup APC 30, Grup APC akut, Grup APC 6, Grup APC 12 arasında Grup SF ortalama değerleri anlamlı düşük bulundu. Diğer gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı (Tablo I).

TARTIŞMA

Bu çalışmada, spinal travma modeli oluşturulan ratlarda farklı zamanlarda iv uy-

gülenen APC'nin 5. hafta sonunda motor fonksiyonları düzelttiği, nöron ve miyelinli aksonları koruduğu, glia hücresi oluşumunu da azalttığını saptadık.

Çalışmada, özellikle manuel masaj yapılarak mesane boşaltılmasına olanak verdiği için dişi rat kullanımı tercih edildi.

Spinal travma oluşturulmasında standardizasyonu sağlayabilmek için Rivlin ve Tator tarafından tarif edilen klip kompresyon modeli uygulandı.⁽¹⁴⁾ Bu modelde 63 g kapanma basıncı uygulayan anevrizma klipi (Aesculap FE 721K) kullanıldı ve sıkıştırma süresi 1 dk. olarak belirlendi. Poon ve ark.⁽¹⁵⁾ yaptıkları çalışmalarında, klip kapanma basıncı ve klip bası süresinin artırılmasının spinal hasarın şiddetini artırdığı, kapanma basıncı 50 g olan klipin şiddetli hasar oluşturduğu ve BBB skorları ile korelasyon gösterdiğini saptanmıştır. Pearse ve ark.⁽¹⁶⁾ farklı şiddette SKT uyguladıkları ratlarda travma şiddeti ile BBB skorlaması ve nöron kaybı arasında anlamlı bir ilişki bulmuştur. Gensel ve ark.⁽¹⁷⁾ ise ağırlık düşürme yöntemiyle servikal spinal travma uyguladıkları ratlardan 6. hafta sonunda hafif şiddette hasarlanma olanlarda lokomotor aktivitede tamamen iyileşme saptarlarken, orta derecede hasarlanma olanlarda ancak % 30 bir iyileşme saptayabilmiştir. Lezyon alanları karşılaştırıldığında travma şiddetiyle lezyon alanları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur.

Spinal kord travmasını takiben oluşan nörolojik hasar, yaralanma sonrası birinci saatten birinci haftaya kadar artma gösterilebilir. Travma modeline uygun güvenilir bir test protokolü kullanılması, SKT sonrası fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek açısından önemlidir.⁽¹⁸⁾ Davranışsal testler, deneysel spinal kord yaralanmalarının, spontan fonksiyonel iyileşmeyi de içeren

sonuçlarını ve farklı tedavilerin etkilerini saptamada önemli araçlardır.⁽¹⁹⁾ Bu çalışmada, oluşturulan spinal kord hasarının şiddetini ve APC'nin lokomotor aktiviteye nöroprotektif etkisini BBB davranış testi ile değerlendirdik. Çalışmamızda tüm gruplarda, BBB skorları 1. gün ölçümlerinin karşılaştırılmasında denekler arası anlamlı fark bulunmaması, uygulanan travmanın şiddetinin eşit olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda APC'nin erken dönemde motor fonksiyonlarda değişiklik yapmadığı ancak 28. günden sonra belirgin düzelme oluşturduğu saptandı. Bu bulgumuz Taoka ve ark.⁽¹²⁾ ve Güler ve ark.⁽²⁰⁾ ağırlık düşürme tekniğiyle spinal kord hasarı oluşturdukları çalışmalarındaki sonuçlar ile uyumsuz olmuştur. Bu uyumsuzluğun nedeninin çalışmacıların oluşturdukları spinal travma modelinin ve şiddetinin farklı olması ve bunun sonucunda fonksiyonel gelişmenin daha hızlı ve erken dönemde başlamış olmasına bağlıyoruz.

Aktive Protein C'nin antiinflamatuvar, antitrombotik ve profibrinolitik özellikleri olduğu gösterilmiştir. Antitrombotik etkisi özellikle mikrosirkülasyon açısından önem taşır.⁽²¹⁾ PC ve trombomodulin seviyelerindeki azalma inflamasyon ve koagülasyon siklusunu başlatır. Murakami ve ark.⁽²²⁾ inflamasyon ve koagülasyon yanıtlarını çeşitli mekanizmalarla baskıladığı ve IL-1 ve TNF- α gibi sitokinleri azaltarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda monositlerin APC ile inkübasyonunun TNF- α üretiminde azalma, translokasyon blokajı ve lipopolisakkaritlere yanıt olarak ortaya çıkan inflamasyon öncesi nükleer transkripsiyon faktör aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir.⁽²³⁾ Deneysel çalışmalarda APC, PAI-I'yi inhibe ederek ve TAFI sınırla-

arak endojen fibrinolitik yolu hızlandırır.⁽²⁴⁾ Uchiba ve ark.⁽²⁵⁾ yaptıkları çalışmada; doğal bir antikoagülan olan APC'nin endotel hücrelerindeki mitojenle aktiflenen protein kinaz (MAPK) yolunu aktive ettiğini göstermiştir. MAPK yolu endotel hücrelerde etkili olduğundan APC'nin de endotel hücre proliferasyonunu uyararak anjiogenezise yol açması mümkün olabilir. APC'nin bu anjiogenetik (damarlanmayı arttırıcı) aktivitesi antitrombotik aktivitesine ek olarak mikrosirkülasyonun düzenlenmesine de katkı sağlayabilir. APC; endotel, monosit, nötrofil, eosinofil ve solunum epitel hücrelerindeki reseptörüne bağlanarak direkt antiinflamatuvar ve antiapoptotik etki gösterebilir.⁽²⁶⁾

Daha önceki çalışmalarda APC iv olarak 100 µg kg⁻¹ ve 25 IU kg⁻¹ dozlarında uygulanmıştır.^(12,27) Bu çalışmada uyguladığımız APC dozları pubmed'de ulaşabildiğimiz literatürle uyumlu olarak 100 µg kg⁻¹ aktive Drotrekogin alfa (XIGRIS®) iv şeklinde olmuştur.

Bu çalışmada APC'nin nöron kaybını azalttığını histopatolojik olarak ışık mikroskopisi incelemeleriyle saptadık. APC'nin antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisinden⁽²⁶⁾ dolayı nöron kaybını azalttığını düşünüyoruz. Benzer şekilde Taoka ve ark.⁽¹²⁾ travma öncesi ve sonrası APC verilen grupta kontrol grubuna göre nörolojik skorlarda anlamlı yükseklik bulmuştur. Hasarlı spinal kord dokusunda travma öncesi APC verilen grupta nötrofil toplanmasını myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi artışıyla değerlendirilmiştir. Travma öncesi APC uygulanan grupta MPO aktivitesi düşük, diğer gruplarda yüksek saptanmıştır. Sonuçta nöron kaybının azalmasını APC'nin antiinflamatuvar etkisine bağlamışlardır.

Taoka ve ark.'nın⁽²⁷⁾ yaptığı diğer bir çalış-

mada; 8 hafta boyunca yapılan değerlendirilmede motor disfonksiyonda ve 7 hafta süresince elektrofizyolojik testlerde APC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı iyileşme saptanmıştır. Bu yararlı etkinin APC'nin antikoagülan özelliğinden daha çok antiinflamatuvar özelliğine bağlı olabileceği belirtilmektedir. APC'nin antiinflamatuvar etkisi için iki mekanizma öne sürülmektedir; nötrofillerin toplanmasını ve monositlerin sitokin üretimini azaltarak nötrofillerin aktivasyonunu inhibe ettiği ve endotel hücrelerinde reseptörlerine bağlanarak inflamatuvar mediyatör yanıtını azalttığı düşünülmektedir. Bu etkilerle APC'nin travmaya bağlı spinal kord hasarının sekonder etkilerini önleyebileceği sonucuna varılmıştır.⁽²⁷⁾ Yeşilirmak ve ark.⁽²⁸⁾ deneysel olarak hipoksik iskemik beyin hasarı oluşturulan neonatal ratlarda APC'nin antiapoptotik etkiyle nöron kaybını azalttığını bildirmiştir.

Ayrıca bu çalışmada APC'nin hasar alanında myelin kaybını da azalttığı saptandı. Geç dönem lezyonun önemli bir komponentinin myelin kaybı olduğu bilinmektedir. Orta şiddette oluşturulan travmalarda akson devamlılığının korunduğu, bununla birlikte selektif demiyelinizasyon olduğu gösterilmiştir.⁽²⁹⁾ Burada şiddetli bir travma oluşturulmasına karşın APC myelin kaybını azaltmıştır. Bu bulgu, Güler ve ark.⁽²⁰⁾ ağırlık düşürme ile oluşturdukları spinal travma modelinde APC'nin myelin kaybını azalttığını bildirdikleri çalışma sonuçları ile benzer bulunmuştur.

Kronik fazda lezyon bölgesinin rostral ve kaudalinde dejeneratif ve rejeneratif olaylar gelişir. PNL azalırken, makrofajların sayısı giderek artar. Makrofajlar yaralanma bölgesindeki hücre artıklarını, miyelin ve eritrositleri fagosite eder. Astrositik ve fibrotik bir skar dokusu oluşur.

Arka köklerde amputasyon nöromaları oluşur. Nekrotik bölge, kist formasyonu veya posttravmatik siringomiyeliye dönüşebilir. Kronik dönemde görülen diğer patolojik olaylar kistik miyelomalazi, Wallerian dejenerasyon skar, gliosis, araknoidit ve atrofi şeklinde sıralanabilir.⁽³⁰⁾ Biz de bu çalışmada APC'nin GHS artışını engellediğini saptadık.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen veriler bize; klip kompresyon yöntemiyle deneysel spinal kord hasarı oluşturulan ratlarda erken dönemde APC'nin belirgin nörodavranışsal iyileşme sağlamadığını ancak uzun dönemde motor fonksiyonları düzelttiğini ve bununla beraber nöron ve miyelinli aksonları koruduğunu, glia hücreleri oluşumunu azalttığını göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Simon CM, Sharif S, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma* 2009;26:563-74. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2008.0523> PMID:19260780
2. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004;4(4):451-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2003.07.007> PMID:15246307
3. Bracken MB. Methylprednisolone and acute spinal cord injury: an update of the randomized evidence. *Spine* 2001;26(24 Suppl):47-54. <http://dx.doi.org/10.1097/00007632-200112151-00010> PMID:11805609
4. Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, Tetzlaff W. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury. *Spine* 2005;30(17 Suppl):3-13. <http://dx.doi.org/10.1097/01.brs.0000175186.17923.87>
5. Tator CH, Fehlings MG: Review of secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991;75:15-26. <http://dx.doi.org/10.3171/jns.1991.75.1.0015> PMID:2045903
6. Barut Ş, Canbolat A, Bilge T et al. Lipid peroxidation in experimental spinal cord injury: time-level relationship. *Neurosurg Rev* 1993;16:53-9. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00308614> PMID:8483520
7. Dumont RJ, Verma S, Okonkwo DO, Hurlbert RJ. Acute spinal cord injury Part II: Contemporary Pharmacotherapy. *Clin Neuropharmacol* 2001;24:265-79. <http://dx.doi.org/10.1097/00002826-200109000-00003> PMID:11586111
8. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;56:341-58. [http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00049-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00049-5)
9. Yamaguchi Y, Hisama N, Okajima K et al. Pretreatment with activated protein C or active human urinary thrombomodulin attenuates the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion in rat liver. *Hepatology* 1997;25:1136-40. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.510250515> PMID:9141430
10. Esmon CT. The protein C pathway. *Chest* 2003;124(3 Suppl):26-32. http://dx.doi.org/10.1378/chest.124.3_suppl.265 PMID:12970121
11. Murakami K, Okajima K, Uchiba M et al. Activated protein C attenuates endotoxin-induced pulmonary vascular injury by inhibiting activated leukocytes in rats. *Blood* 1996;87:642-7. PMID:8555486
12. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M et al. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci* 1998;18:1393-8. PMID:9454848
13. Basso DM. Behavioral testing after spinal cord injury: congruities, complexities, and controversies. *J Neurotrauma* 2004;21:395-404. <http://dx.doi.org/10.1089/089771504323004548> PMID:15115589
14. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol* 1978;10:38-43. PMID:684604
15. Poon PC, Gupta D, Shoichet MS, Tator CH. Clip compression model is useful for thoracic spinal cord injuries: histologic and functional correlates. *Spine* 2007;32(25):2853-9. <http://dx.doi.org/10.1097/BRS.0b013e31815b7e6b> PMID:18246008
16. Pearse DD, Lo TP Jr, Cho KS et al. Histopathological and behavioral characterization of a novel cervical spinal cord displacement contusion injury in the rat. *J Neurotrauma* 2005;22:680-702. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2005.22.680> PMID:15941377
17. Gensel JC, Tovar CA, Hamers FP et al. Behavioral and histological characterization of unilateral cervical spinal cord contusion injury in rats. *J Neurotrauma* 2006;23:336-54. <http://dx.doi.org/10.1089/neu.2006.23.36> PMID:16430371
18. Scheff SW, Saucier DA, Cain ME. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score. *J Neurotrauma* 2002;19:1251-60. <http://dx.doi.org/10.1089/08977150260338038> PMID:12427332

19. Cayli SR, Ates O, Karadag N et al. Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci* 2006;24:233-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2006.04.003> PMID:16701976
20. Güler D. Omurilik Yaralanma Modelinde Drotrekogin Alfa (Aktive Protein C)' nin Etkisinin Morfometrik Ve Ultrastrüktürel Analizi. (Uzmanlık tezi). İstanbul, Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006.
21. Esmen CT. The normal role of Activated Protein C in maintaining homeostasis and its relevance to critical illness. *Crit Care* 2001;5:7-12. <http://dx.doi.org/10.1186/cc1333> PMID:11379986
22. Murakami K, Okajima K, Uchiba M et al. Activated protein C prevents LPS-induced pulmonary vascular injury by inhibiting cytokine production. *Am J Physiol* 1997;272:197-202.
23. White B, Schmidt M, Murphy C et al. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced nuclear translocation, of nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) production in the THP-1 monocytic cell line. *Br J Haematol* 2000;110:130-4. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.02128.x> PMID:10930989
24. Bajzar L, Nesheim ME, Tracy PB. The profibrinolytic effect of activated protein C in clots formed from plasma is TAFI-dependent. *Blood* 1996;88:2093-100. PMID:8822928
25. Uchiba M, Okajima K, Suda T et al. Activated Protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res* 2004;95:34-41. <http://dx.doi.org/10.1161/01.RES.0000133680.87668.FA> PMID:15166095
26. Shimizu S, Gabazza EC, Taguchi O et al. Activated protein C inhibits the expression of platelet-derived growth factor in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1416-26. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200206-515OC> PMID:12738599
27. Taoka Y, Schlag MG, Hopf R, Redl H. The long-term effects of pre-treatment with activated protein C in a rat model of compression-induced spinal cord injury. *Spinal Cord* 2000;38:754-61. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.sc.3101096> PMID:11175376
28. Yesilirmak DC, Kumral A, Tugyan K et al. Effects of activated protein C on neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Res* 2008;1210:56-62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2008.02.088> PMID:18420181
29. Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I et al. Development of posttraumatic cysts in the spinal cord of rats subjected to severe spinal cord contusion. *Surg Neurol* 1994;41:241-9. [http://dx.doi.org/10.1016/0090-3019\(94\)90131-7](http://dx.doi.org/10.1016/0090-3019(94)90131-7)
30. Güzel A, Tatlı M, Ökten Aİ, Çaylı S. Omurilik Yaralanmasının Patoloji ve Fizyopatolojisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2006;28:73-8.