

Progesteron'un Tavşan Spinal Kord İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nöroprotektif Etkileri

Neuroprotective Effects of Progesterone on Ischemia/Reperfusion Injury of the Rabbit Spinal Cord

Özden Çağlar ÖZTÜRK¹, Bora GÜRER², Hayri KERTMEN¹, Hüseyin BOZKURT³, Emin KASIM¹, Mehmet Ali KANAT⁴, Ata Türker ARIKÖK⁵, Berrin İmge ERGÜDER⁶, Mustafa Fevzi SARGON⁷, Zeki ŞEKERCİ¹

¹Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Ankara, Türkiye

²Fatih Sultan Mehmet Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye

³Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, Sivas, Türkiye

⁴Refik Saydam Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, Türkiye

⁵Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, Ankara, Türkiye

⁶Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

⁷Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Çalışma Türk Nöroşirürji Derneği, 29. Bilimsel Kongresi, Nisan 2015'de bildiri olarak sunulmuştur.

ÖZ

AMAÇ: Daha önceki çalışmalarda progesteronun nöroprotektif etkileri gösterilmiştir. Ancak spinal kord iskemii-reperfüzyon hasarında progesteronun nöroprotektif etkileri ortaya konulmamıştır. Çalışmanın amacı omurilik iskemii-reperfüzyon hasarında progesteronun etkinliğinin değerlendirilmesidir.

YÖNTEM ve GEREÇ: Tavşanlar her gruba 8 denek düşecek şekilde 4 gruba ayrıldı; Grup I (kontrol), Grup II (iskemi), Grup III (metilprednizolon), Grup IV (Progesteron). Kontrol grubuna sadece laparotomi uygulandı. Diğer bütün gruplara renal arterin hemen kaudalından yapılan aort oklüzyonu ile spinal kord iskemii modeli uygulandı. Malondialdehit ve katalaz düzeyleri, kaspaz-3, myeloperoksidaz ve ksantin oksidaz aktiviteleri çalışıldı. Histopatolojik, ultrastrüktürel ve nörolojik değerlendirmeler yapıldı.

BULGULAR: İskemii-reperfüzyon hasarı sonrası kaspaz-3 aktivitesinin, myeloperoksidaz aktivitesinin, malondialdehit düzeyinin ve ksantin oksidaz düzeyinin arttığı görülmüştür. Katalaz düzeylerinde düşüş görülmüştür. Progesteron tedavisini takiben kaspaz-3 aktivitesi, myeloperoksidaz aktivitesi, ksantin oksidaz düzeyleri düşerken; katalaz düzeyi artmıştır. Ayrıca progesteron tedavisi histopatolojik, ultrastrüktürel skorlarda düzelmeye ve nörolojik muayenede düzelmeye neden olmuştur.

SONUÇ: Çalışmanın bulguları progesteronun omurilik iskemii-reperfüzyon hasarı üzerinde anlamlı nöroprotektif etki yaptığını göstermektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: İskemii-reperfüzyon, Metilprednizolon, Nöroproteksiyon, Progesteron, Omurilik

ABSTRACT

AIM: Previous studies demonstrated the neuroprotective effects of progesterone, but no previous study has examined the neuroprotective effects of progesterone on spinal cord ischemia/reperfusion injury. The purpose of this study was to evaluate whether progesterone could protect the spinal cord from ischemia/reperfusion injury.



Yazışma adresi: Özden Çağlar ÖZTÜRK

E-posta: drcaglarozturk@yahoo.com

MATERIAL and METHODS: Rabbits were randomized into four groups of eight animals as follows: group 1 (control), group 2 (ischemia), group 3 (methylprednisolone) and group 4 (progesterone). In the control group only a laparotomy was performed. In all other groups, the spinal cord ischemia model was created by the occlusion of the aorta just caudal to the renal artery. Levels of malondialdehyde and catalase were analyzed, as were the activities of caspase-3, myeloperoxidase, and xanthine oxidase. Histopathological, ultrastructural and neurological evaluations were performed.

RESULTS: After ischemia-reperfusion injury, increases were found in caspase-3 activity, myeloperoxidase activity, malondialdehyde levels, and xanthine oxidase activity. In contrast, decreases in catalase levels were observed. After the administration of progesterone, decreases were observed in caspase-3 activity, myeloperoxidase activity, malondialdehyde levels, and xanthine oxidase activity, whereas catalase levels increased. Furthermore, progesterone treatment showed improved results concerning histopathological scores, ultrastructural score and Tarlov scores.

CONCLUSION: Our results revealed that progesterone exhibits meaningful neuroprotective activity following ischemia-reperfusion injury of the spinal cord.

KEYWORDS: Ischemia/reperfusion, Methylprednisolone, Neuroprotection, Progesterone, Spinal cord

■ GİRİŞ

Torakoabdominal cerrahi sonrası ortaya çıkabilen spinal iskemiyeye bağlı paraparezi veya parapleji gelişimi halen önemli ve korkulan bir durumdur (35). Spinal kord iskemisi/reperfüzyon (İ/R) hasarının altında yatan temel mekanizmalar halen daha bilinmemekle birlikte, inflamasyon, oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve apoptoz suçlanan mekanizmalardan bazılarıdır (13,23). Spinal İ/R hasarında nöroproteksiyon tedavinin temel taşıdır ve yıllardır araştırmacıların ilgisini üzerine toplamış bir konudur (5,13,20,23).

Progesteron (PG) siklik aktivitenin düzenlenmesi, uterusun gebeliğe hazırlanması, implantasyon, gebeliğin sürdürülmesi ve meme bezlerinin gelişiminde önemli roller üstlenen steroid yapı bir hormon olup, korpus luteum ve plasentadan salgılanır. PG'un nöroprotektif etkisi birçok çalışmada gösterilmiştir (3,11,12,18,19,34,37).

PG'un nöroprotektif etkisinin altında yatan mekanizmalar ile ilgili birkaç mekanizma ileri sürülmüştür (12,34). PG'un lipid peroksidasyonunu engelleyici ve serbest radikallere bağlı hücre membran hasarı üzerine olan koruyucu etkileriyle, hücre ölümünden itibaren nöronları koruması ve nörotransmitterlerin aktivasyonunu azaltıcı etkisi gösterilmiştir; ayrıca, nöron ve glial hücrelerdeki gen ekspresyonunun düzenlenmesiyle nöroprotektif etkinliği olduğu önceki çalışmalarda raporlanmıştır (11).

Tüm bu geçmiş çalışmaların ışığında, bu deneysel çalışmada gonadal bir seks steroidi olan PG'un spinal kord İ/R hasarı üzerine nöroprotektif etkileri olup olmadığı ve bu nöroprotektif etkinliğinin olası mekanizmaları çalışılmış ve bu etkinlik metilprednizolon (MP) ile karşılaştırılmıştır.

■ GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışma Grupları

Bu çalışma Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi hayvan laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanların bakımı ve güvenliği European Communities Council Directive'in 24 Kasım 1986 tarihli deneysel çalışmalarda hayvanları koruma yönergesine uygun olarak yapılmıştır.

Bu çalışmada, 2900-3600 gr arası 32 adet erkek Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanıldı. Denekler her gruba 8 denek düşecek şekilde 4 gruba ayrıldı.

Grup I: Kontrol grubu (n=8): Sadece laparotomi yapıldı. Deneklerden laminektomiye takiben iskemik olmayan normal doku örnekleri alındı. Bu gruba herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Grup II: İskemi grubu (n=8): Bu gruptaki denekler geçici global spinal kord iskemisine maruz bırakıldı. Deneklere oklüzyon klembinin kaldırılmasını takiben 2cc serum fizyolojik (%0,9 NaCl) uygulandı. İskemiyi takip eden 24. saatte deneklere laminektomi yapılarak spinal kord örnekleri alındı.

Grup III: Metilprednizolon (MP) grubu (n=8): Grup II'deki aynı cerrahi prosedür uygulandı. Ancak oklüzyon klembinin çıkarılmasını takiben bu gruptaki deneklere 30 mg/kg dozda MP (Prednol-L, Mustafa Nevzat, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Bu uygulanan MP dozu daha önceki çalışmalara dayanarak seçildi (13,23,41).

Grup IV: Progesteron grubu (n=8): Grup II'deki aynı cerrahi prosedür uygulandı. Ancak oklüzyon klembinin kaldırılmasını takiben deneklere 4 mg/kg dozda PG (Progestan, Koçak Farma, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulanan PG dozu daha önceki çalışmalara dayanarak seçildi (10,24,37).

Anestezi ve Cerrahi Prosedürler

Tüm denekler optimal oda sıcaklığında (18-21°C) standart diyetle beslenip 12 saatlik aydınlık-karanlık sikluslarda yaşatıldı. Suya ve yemeğe serbest ulaşimleri sağlandı. Tüm denekler 70 mg/kg intramüsküler (IM) dozda ketamin (Ketalar, Parke Davis Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg IM dozda xylazine (Rompun, Bayer, Türkiye) ile anestezi altına alınmış olup serbest solunumları sağlandı. Vücut sıcaklıkları anal termometre (Digital Fever thermometer, Becton Dickinson, NJ, ABD) ile ölçülüp ısıtıcı yastıklarla 37°C derecede tutuldu. Denekler supin pozisyonda cerrahi için hazırlandı. Cilt antisepsisini takiben ortalama 10 cm uzunluğunda orta hat insizyonu batına girilerek transperitoneal yaklaşımla abdominal aorta ortaya konuldu.

Klempleme işleminden 5 dk önce antikoagülasyon amacıyla intravenöz (IV) olarak 150 U/kg heparin (Nevparin, Mustafa

Nevzat, Türkiye) uygulanmıştır. Abdominal aorta renal arter çıkımının yaklaşık 1 cm altından cerrahi mikroskop altında 70 gr kapama gücü olan anevrizma klibiyle (Yaşargil, FE721, Aesculap, Almanya) kapatılmıştır. Oklüzyon zamanı 20 dakikadır. Oklüzyon periyodunun sonucunda anevrizma klibi çıkartılmıştır. Kan akımının yeniden sağlandığı görsel olarak teyit edilmiştir. Prosedürün bitişini takiben katlar 2/0 ipek iplik ile primer kapatılmıştır. Çalışma gruplarına ilaçlar klip çıkartılmasına takiben verilmiştir.

Bu çalışmada, kullanılan aortik oklüzyon modeli spinal kord iskemi-reperfüzyon için uygun bir yöntemdir; 20 dakikalık iskemi periyodu spinal kordda yeterli miktarda hasara neden olduğu gösterilmiştir (13,23,44).

Cerrahi takip eden 2. saatten sonra deneklerin suya ve yemeğe serbest erişimi sağlanmıştır. Nörojenik mesane gelişen deneklere günde en az 2 defa Credé manevrası uygulandı. Tüm denekler cerrahi takip eden 24. saatte 200 mg/kg pentobarbital (Nembutal, Oak Pharmaceuticals, Lake Forest, IL, ABD) ile sakrifiye edildi. Dikkatlice yapılan laminektomiye takiben L2 ve L5 arası omurilik segmentleri histopatolojik, ultrastrüktürel ve biyokimyasal analiz için çıkartıldı.

Biyokimyasal analiz için sol ventrikülden 10 cc kan alındı. Alınan kan örnekleri 1000 g'de 5 dk santrifüj edildi. Üstte kalan berrak süpernatant analiz için kullanıldı. Tüm serum ve doku örnekleri analiz için -80°C'de saklandı. Analiz günü doku örnekleri fizyolojik salin solüsyonunda homojenize edildi ve 1780 g'de 20 dk santrifüj edildi.

Doku Kaspaz-3 Aktivitesi

Kaspaz-3 aktivitesi ELISA kit (Cusabio, Hubei, Çin) kullanılarak ölçüldü; tüm ELISA prosedürleri üretici talimatlarına dayanılarak yapıldı. Kaspaz-3 için spesifik antikorlar ile mikrotiter üzerinde kaplama işlemi uygulandı. Standartlar ve örnekler kuyular içine pipetlendi ve ortamda bulunan tüm kaspaz-3 antikorları ile immobilize edildi. Bağlanmayan maddelerin arındırılmasını takiben kuyulara kaspaz-3 için spesifik biotin ile konjuge edilmiş antikorlar eklendi. Yıkama işlemini takiben kuyulara avidin ile konjuge horseradish peroksidaz (HRP) eklendi. Yıkama tampon solüsyonu ile bağlanmayan tüm ürünleri 3 defa yıkayarak ortamdaki uzaklaştırıldı. Yıkama işleminden sonra avidin-enzim reaktifi kuyulara eklendi. Bir sonraki aşamada kaspaz-3 bağlı materyalin miktarına bağlı olarak renklenme gerçekleşti. Renklenme durduktan sonra renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Kaspaz-3 konsantrasyonları standart kaspaz-3 solüsyonlarının örneklerindeki absorbans değerleriyle karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/ml olarak verildi.

Serum ve Doku Myeloperoksidaz (MPO) Aktivitesi

MPO aktivitesi ELISA kiti (Cusabio, Hubei, Çin) kullanılarak ölçüldü; tüm ELISA prosedürleri üretici talimatlarına dayanılarak yapıldı. Bu kit kompetitif inhibisyon enzim immunoassay tekniği kullanılmaktadır. Kiti içinde çıkan mikrotiter plate MPO'ya spesifik antikor ile kaplandı. Standartlar veya örnekler uygun mikrotiter plate kuyularının içine biotin konjuge MPO ile birlikte eklendi. Kompetitif inhibisyon reaksiyonu MPO ve MPO'ya spesifik antikor kaplı biotin konjuge MPO arasında başlatıldı. Örneklerde büyük miktarda bulunan MPO biotin

konjuge MPO'ya düşük miktardaki antikorlarla bağlandı. Sonra substrat solüsyonu eklendi. Örnekteki renklenme MPO miktarını gösterdi. Renk değişimi tamamlanınca renk yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. MPO konsantrasyonları örnekler ve standart MPO solüsyonlarının arasındaki absorbans değerleri karşılaştırılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/ml olarak verildi.

Doku Malondialdehit (MDA) Analizleri

MDA düzeyi tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan bir yöntemle ölçüldü. Özetle örnekler soğuk salin solüsyonu içeren %0,001 butil hidroksi toluen (BHT) ve %0,07 sodyum dodesil sülfat (SDS) içeren solüsyonlarla karıştırıldı. Takiben örneklerin 1ml'sine 500 µl 0,01 µl NH₂SO₄ ve 500 µl TBA reaktifi (%0,67 TBA %50 asetik asidin içinde) solüsyonu ile çöktürüldü. Takiben örnekler kaynar suda 60 dk ısıtıldı. Soğutma işleminden sonra eşit hacimde (2ml) n-butanol test tübüne eklendi ve karıştırıldı. Bu karışım oda sıcaklığında 1780 g'de 10 dk santrifüj edildi. Organik tabakanın absorbansı 535 nm'de 1ml hücrede okundu (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, ABD). MDA konsantrasyonları örnekler ve standart MDA solüsyonlarının absorbans değerleri karşılaştırılarak hesaplandı.

Doku Katalaz (CAT) Analizi

CAT düzeyleri 240 nm'de hidrojen peroksit (H₂O₂)'in absorbans değerlerindeki düşüşe göre hesaplandı (1). Aktivite hesaplanırken H₂O₂'in sönüm katsayısı CAT için kullanıldı. Sonuçlar IU/ml olarak sunuldu.

Serum Ksantin Oksidaz (XO) Aktivitesi

Serum XO aktivitesi Prajda ve Weber'in tanımladığı yöntemle dayanarak ölçüldü; bu yöntemle ksantinden oluşan ürik asit düzeyi hesaplanarak XO aktivitesi ölçülmektedir (28). Serum örnekleri (100 µl) 37 °C'de 30 dk 3 ml fosfat tamponu içeren (pH 7,5, 50 nM) ksantin (4 mM) ile inkübe edildi. Reaksiyon 0,1 ml %100 (w/v) TCA eklenerek durduruldu. Takiben bu karışım 1780 g'de 20 dk santrifüj edildi. Ürik asit süpernatant içinde 292 nm'de absorbans değeri hesaplanarak ölçüldü ve mIU/ml olarak sunuldu. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak 10-50 mIU/ml standart XO solüsyonlarında (Sigma X-1875, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) hesaplamalar yapıldı. Bir aktivite ünitesi 37 °C ve pH 7,5' de dakikada oluşan 1 µmol ürik asit düzeyi olarak tanımlandı.

Histopatolojik Prosedürler

Her omurilik segmenti 0,1 mol/lit fosfat tamponda %4 paraformaldehit içinde çözündürülerek 4 °C' de saklandı. Daha sonra örnekler parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve hemotoksilen eozin (H&E) ile boyandı. Kesitler çalışma prosedürüne kör bir nöropatolog tarafından ışık mikroskopu altında değerlendirildi. 40X objektif altında 5 değişik alanda omuriliğin gri cevheri değerlendirildi.

Tüm omurilik örnekleri histopatolojik değişikliklere göre semikantitatif bir skorlama sistemine göre 0 ila 3 arası skorlandı. Altı farklı parametre (hemoraji, konjesyon, nekroz, ödem, nöron kaybı ve enflamasyon) histopatolojik olarak değerlendirildi ve şu şekilde skorlandı; 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=ağır. Her bir omurilik için patoloji skoru bu altı parametre için alınan skorların ortalaması hesaplanarak ölçüldü (32).

Ek olarak iskemik nöronal hasarı daha detaylı değerlendirmek için spinal kordun anterior hornunda (santral kanaldan vertebral aksa dik olacak şekilde çizilen çizginin anterior kısmı) normal motor nöron sayısı miktarı sayıldı. Her denek için 40X objektif kullanılarak 3 alan değerlendirildi. Bu 3 alanın ortalama motor nöron sayısı kullanıldı. Sitoplazmasında Nissl hücreleri içeren dağılım kromatinli çıkıntılı çekirdekçikli nöronlar normal sağlıklı nöron olarak değerlendirildi (38).

Ultrastrüktürel Analiz (Elektron Mikroskopi Analizi)

Doku örnekleri bistüri yardımıyla korddan ve meninkslerden temizlendi. Takiben örnekler %2,5 glüteraldehit içinde 24 saat fikse edildi. Akabinde fosfat tampon ile (pH=7,4) yıkandı. %1 osmiyum tetraoksit içeren fosfat tamponda (pH=7,4) 2 saat post-fikse edildi. Artan konsantrasyonlardaki alkol solüsyonlarında dehidrate edildi. Sonra dokular propilen oksit ile yıkandı. Ve epoksi-resin içine gömüldü. Yarı-ince 2 µm'lik kesitler ve ultra-ince 60 nm'lik kesitler LKB-Nova ultramicrotome (LKB-Produkter AB, Bromma, İsveç) ile kesildi. Yarı-ince kesitler metilen mavisi ile boyandı ve Nikon Optiphot (Nikon Corporation, Tokyo, Japonya) ışık mikroskopisi altında değerlendirildi. Bu incelemeyi takiben doku blokları düzeltildi, aynı ultramicrotome kullanılarak ultra-ince kesitler alındı. Bu kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı. Boyanmayı takiben tüm ultra-ince kesitler Jeol JEM 1200 EX (Jeol Ltd., Tokyo, Japonya) transmisyon elektron mikroskopu (EM) kullanılarak değerlendirildi. Aynı transmisyon EM ile 5000X büyütmede elektron mikrograflar çekildi. Her örnek için 100 büyük boyut myelin akson, 100 orta boyut myelin akson ve 100 küçük boyut myelin akson değerlendirildi. 0-3 arası skorlar verildi ve sayıldı. Veriler ortalama değerleri alınarak Kaptanoğlu ve ark. nin tanımladığı şekilde hesaplandı (21). Skorum sistemi şu şekildedir;

- 0 = Ultrastrüktürel olarak normal myelinli alsonlar
- 1 = Ultrastrüktürel konfigürasyonda ayrılma
- 2 = Ultrastrüktürel konfigürasyonda kesilme
- 3 = Ultrastrüktürel konfigürasyonda bal peteği görünümü

Nörolojik Muayene

Deneklerin nörolojik muayeneleri cerrahi prosedürün 24. saatinde arka bacakların motor fonksiyonları modifiye Tarlov Skorum sistemi kullanılarak değerlendirildi (13,23,32). Her denek için 0'dan 5'e kadar bir skor verildi. Bu skorum şu şekildedir;

Modifiye Tarlov Kriterleri:

- 0- Alt ekstremitelerde hareket yok
- 1- Fark edilebilir eklem hareketi var
- 2- Aktif hareket var, fakat desteksiz oturma yok
- 3- Desteksiz oturma var, fakat zıplama yok
- 4- Zayıf zıplama var
- 5- Alt ekstremitelerde fonksiyonları tam

Nörolojik muayenelerin tamamı çalışma gruplarına kör bir tıp doktoru tarafından gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi SPSS for Windows 11.5 paket programında yapıldı. Sürekli sayısal değişkenlerin dağılımının normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testiyle varyansların homojenliği ise Levene testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama ± standart sapma veya medyan (çeyrekler arası genişlik) şeklinde gösterildi. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği Tek Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) ile medyan değerler yönünden farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testiyle incelendi. Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal Wallis test istatistiği sonuçlarının önemli bulunması halinde post hoc Tukey HSD veya Conover'in parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar tespit edildi. p<0,05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

■ BULGULAR

Doku Kaspaz-3 Analizleri

Kontrol ve iskemi grupları arasında kaspaz-3 aktivitesi değerlendirildiğinde istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir (p<0,001). Bu veriler göstermektedir ki İ/R hasarını takiben hasarlanmış dokuda kaspaz-3 aktivitesi artmaktadır. PG grubu iskemi grubu ile karşılaştırıldığında doku kaspaz-3 aktivitesinde istatistiki olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir (p<0,001). PG grubuna benzer şekilde MP grubunda da iskemi grubu ile karşılaştırıldığında doku kaspaz-3 aktivitesinde istatistiki olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir (p=0,001). MP grubu, PG grubu ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 aktivitesi açısından istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (p=0,926). Bu veriler göstermektedir ki; hem PG hem de MP spinal kordda İ/R sonrası ortaya çıkan apoptotik aktiviteyi engellemektedir (Şekil 1A).

Serum ve Doku Myeloperoksidaz (MPO) Analizi

Ortalama serum ve doku MPO düzeyleri karşılaştırıldığında kontrol ve iskemi grupları arasında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,001, her iki karşılaştırma için). Bu veriler göstermektedir ki spinal korddaki İ/R hasarını takiben hem serum hem de doku MPO düzeyleri yükselmektedir. İskemi grubuyla karşılaştırıldığında PG tedavisi hem serumda hem de dokuda MPO düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı düşüşe sebep olmuştur (p=0,002, her iki ölçüm için). PG grubunda olduğu gibi MP grubunda da iskemi grubu ile karşılaştırıldığında hem serum hem de doku MPO düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir (p=0,046). MPO düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Şekil 1B,C).

Bu veriler ışığında İ/R sonrası ortaya çıkan inflamatuvar durumun bir göstergesi olarak artan MPO düzeyleri, PG ve MP tedavilerinin antiinflamatuvar etkisine ikincil düştüğü gösterilmiştir.

Doku Malondialdehit (MDA) Analizi

Kontrol ve iskemi grupları arasında ortalama doku MDA düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (p<0,001). Bu veriler göstermektedir ki; İ/R hasarını

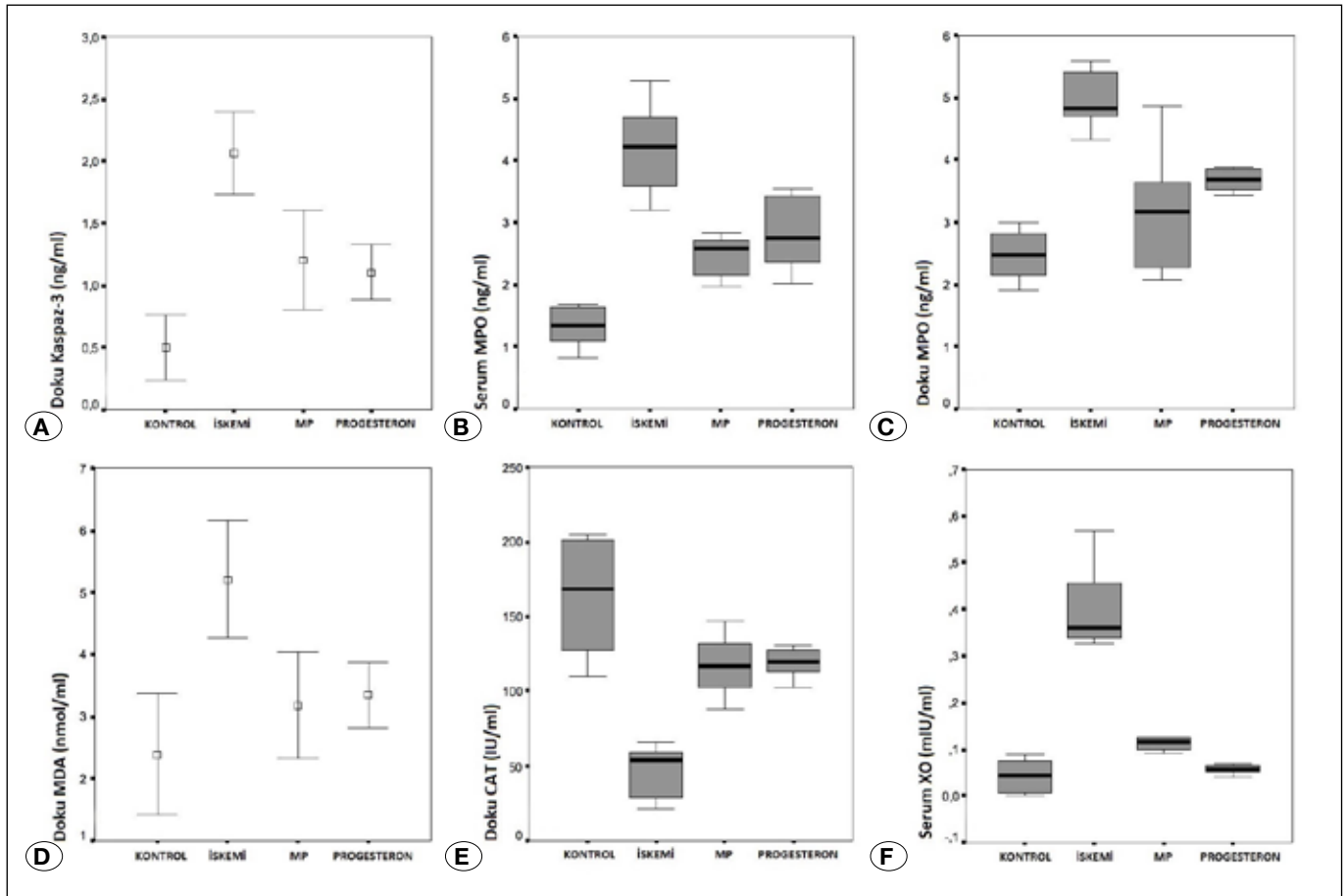
takiben doku MDA düzeyleri artmaktadır. İskemi grubuyla MP grubu karşılaştırıldığında doku MDA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir ($p=0,001$). PG grubunda olduğu gibi MP grubu da iskemi grubuyla karşılaştırıldığında doku MDA düzeylerinde istatistiki olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir ($p<0,001$). PG ve MP grupları karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı tespit edilmemiştir ($p=0,979$) (Şekil 1D).

Bu veriler göstermektedir ki İ/R sonrası spinal kordda ortaya çıkan lipid peroksidasyonu hem PG hem de MP tarafından engellenmiştir.

Doku Katalaz (CAT) Analizi

Ortalama doku CAT değerleri kontrol grubu ile iskemi grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p<0,001$); bu veriler sonucu olarak İ/R'a bağlı CAT düzeyleri düşmektedir. PG ile tedavi doku CAT düzeyinde istatistiki olarak anlamlı yükselmeye sebep olmuştur ($p=0,015$).

PG grubunda olduğu gibi MP grubunda da tedaviyi takiben doku CAT düzeyinde istatistiki olarak anlamlı yükselme tespit edilmiştir ($p=0,007$). Doku CAT düzeyleri PG ve MP grupları arasında karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmemiştir ($p=0,736$) (Şekil 1E).



Şekil 1: A) Doku kaspaz-3 düzeylerini gösteren bar grafik. Dikey çubukların ortasında kalan kutucuk aritmetik ortalamayı gösterirken yukarıya ve aşağıya doğru uzanan çubuklar sırasıyla; +/- standart sapma değerlerini ifade etmektedir. B) Serum MPO düzeylerini gösteren bar grafik. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50.yüzdelik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75. yüzdelik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir. C) Doku MPO düzeylerini gösteren bar grafik. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50.yüzdelik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75. yüzdelik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir. D) Doku MDA düzeylerini gösteren bar grafik. Dikey çubukların ortasında kalan kutucuk aritmetik ortalamayı gösterirken yukarıya ve aşağıya doğru uzanan çubuklar sırasıyla; +/- standart sapma değerlerini ifade etmektedir. E) Doku CAT düzeylerini gösteren bar grafik. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50. yüzdelik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75.yüzdelik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir. F) Serum XO düzeylerini gösteren bar grafik. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50. yüzdelik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75.yüzdelik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir.

Bu veriler göstermektedir ki İ/R hasarını takiben ortaya çıkan oksidatif strese ikincil serum CAT düzeyleri düşmektedir. Hem PG hem de MP yeterli düzeyde antioksidan etki sağlayarak dokudaki oksidatif stresi azaltmaktadır.

Serum Ksantin Oksidaz (XO) Analizi

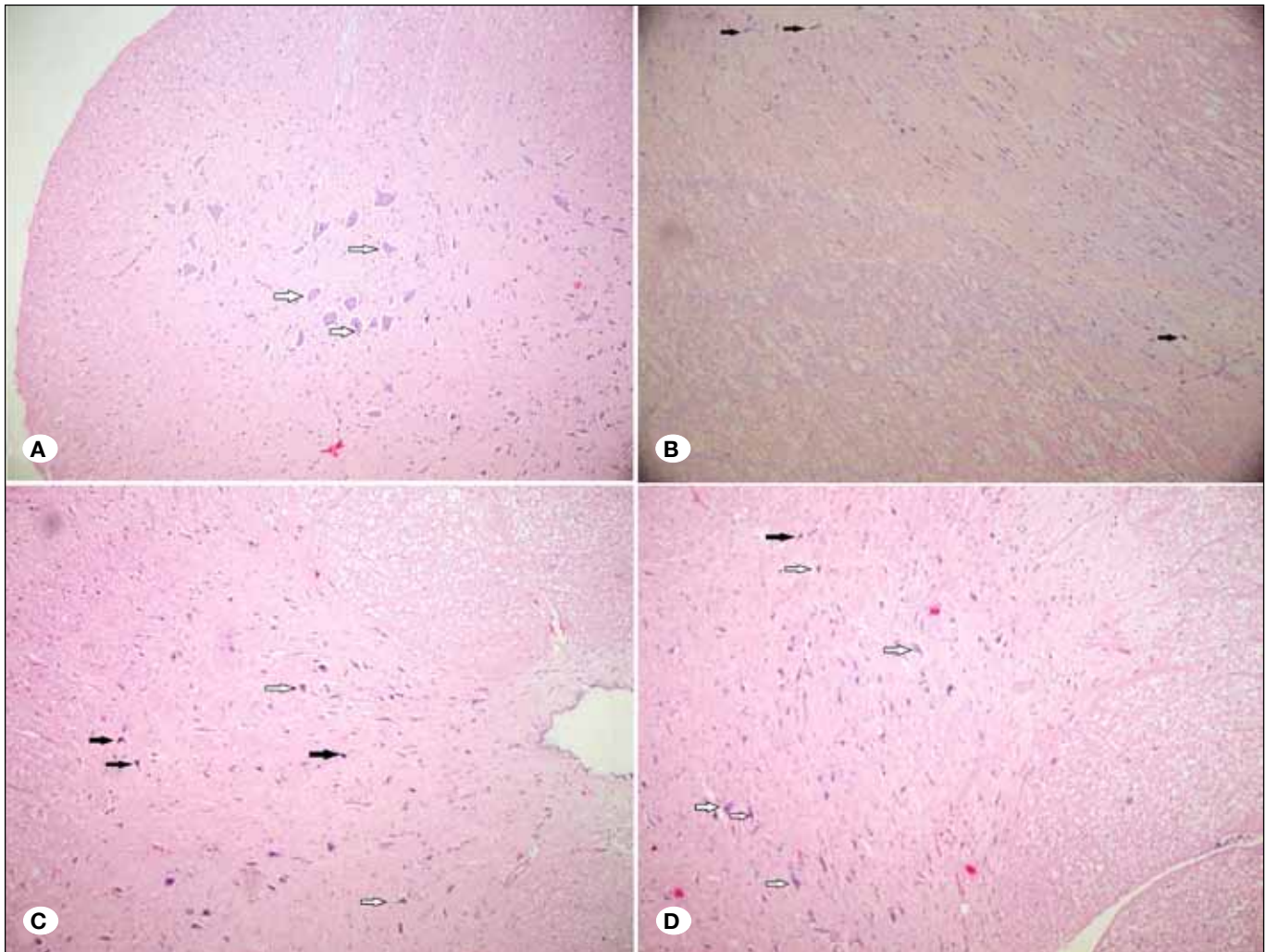
İskemi grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında serum XO düzeyleri arasında istatistiki olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir ($p < 0,001$). İ/R hasarını takiben serum XO düzeyleri artmaktadır. PG grubunda iskemik grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı şekilde serum XO düzeyleri düşmektedir ($p < 0,001$). Benzer şekilde MP da serum XO düzeylerinde, iskemik grubuna oranla istatistiki olarak anlamlı şekilde düşüşe sebep olmuştur ($p = 0,004$). PG grubuyla MP grubu karşılaştırıldığında PG'un MP'a oranla serum XO düzeylerinde daha fazla düşüşe sebep olduğu gösterilmiştir. Bu fark istatistiki olarak anlamlıdır ($p = 0,001$).

Bu veriler göstermiştir ki; İ/R'a ikincil ortaya çıkan hasardan ve oksidatif stresin bir göstergesi olan XO artmaktadır. Hem PG hem de MP dokuda çıkan oksidatif stresi azaltmaktadır. XO düzeyleri açısından PG'un antioksidan özelliği MP'dan fazla bulunmuştur (Şekil 1F).

Tüm bu biyokimyasal veriler Tablo 1'de özetlenmiştir.

Histopatolojik Prosedürler

Kontrol grubundan alınan spinal kord örneklerinin ışık mikroskopisi incelemesi normaldir (Şekil 2A). İskemi grubunda (Şekil 2B) diffüz hemoraji ve gri cevherde yaygın konjesyon izlendi. Bu preparatlarda belirgin nekroz ile hem beyaz hem gri cevherde yaygın ödem görüldü. Hasarlanmış bölgelerde infiltrat olmuş polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve plazma hücreleri görüldü. İskemi grubunda sitoplazmik yapıların bozulması ve sitoplazmik eozinofili ile karakterize nöronal piknoz izlendi.



Şekil 2: Çalışma gruplarına ait ışık mikroskopisi görüntüleri. Kontrol grubunda (A) normal spinal kord parankiminin korunduğu izlenmekte. Normal nöronlar oklarla gösterilmiştir. İskemi grubunda (B) İ/R hasarı sonrası morfolojinin ileri derecede bozulduğu, ödemli arka planda bol miktarda dejeneren nöron izlenmekte (içi dolu oklar). Progesteron grubunda (C) verilmesi sonrası spinal kordun iskemik hasardan korunmasına bağlı daha fazla normal nöron (içi boş ok) ve daha az dejeneren nöron (içi dolu ok) izlenmekte. (H&E, 10X obj.). Metilprednizolon grubunda (D), progesteron grubundaki görüntüye benzer şekilde, spinal kordun iskemik hasardan korunmasına bağlı daha fazla normal nöron (içi boş ok) ve daha az dejeneren nöron (içi dolu ok) izlenmekte.

PG ve MP gruplarında spinal kord dokularının İ/R hasarından belirgin olarak korunduğu izlendi (Şekil 2C,D).

Patolojik skorlar karşılaştırıldığında iskemi grubunun istatistiki olarak anlamlı şekilde daha yüksek patoloji skorlarına sahip olduğu görüldü ($p<0,001$). PG grubunda patolojik skorlar iskemi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p=0,003$). MP grubunda patolojik skorlar istatistiki olarak anlamlı şekilde iskemi grubundan daha düşük bulundu ($p=0,001$). PG ve MP gruplarında patolojik skorlar açısından istatistiki olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0,686$) (Şekil 3A).

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iskemi grubunda anterior spinal kordda normal motor nöron sayısı istatistiki olarak anlamlı şekilde daha azdı ($p<0,001$). PG grubunda anterior spinal korddaki normal motor nöron sayısı iskemi grubundan istatistiki olarak anlamlı olarak daha fazlaydı ($p<0,001$). PG grubundaki gibi MP grubunda da iskemi grubuna kıyasla

daha fazla sayıda normal motor nöron görüldü ($p=0,001$). PG ve MP arasında normal motor nöron sayıları kıyaslandığında istatistiki olarak anlamlı fark tespit edilmedi (Şekil 3B).

Histopatolojik olarak hem PG hem de MP spinal kordu İ/R hasarından belirgin şekilde korumuştur.

Ultrastrüktürel Analizler

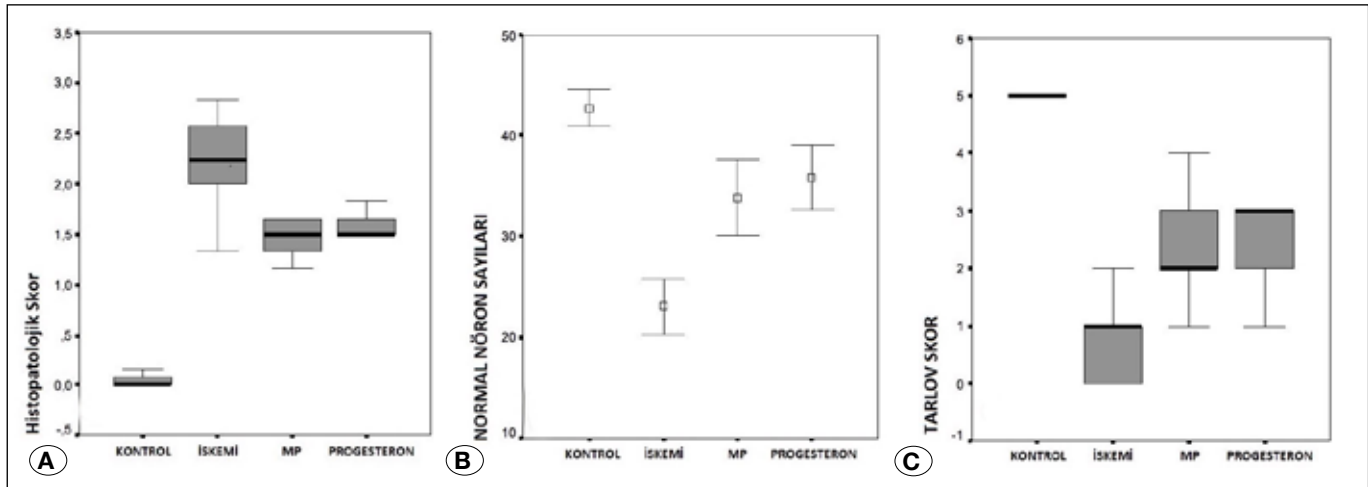
Kontrol grubunun doku örneklerinin transmisyon EM incelemesinde ultrastrüktürel olarak ne gri cevherde ne de beyaz cevherde patolojik değişiklik izlenmemiştir. Tüm nöronlar ultrastrüktürel olarak normal görünümde olup intraselüler organellerde, çekirdekte, membranda ve perinöral dokuda herhangi bir patolojik değişiklik yoktur.

Bunun yanında birkaç büyük boyutlu myelinize aksonda çok hafif ayrılmalar gözlenmiş olup bunun dokuların gecikmiş fiksasyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür. Bunların dışında kalan tüm büyük boyutlu myelinize aksonlarla tüm orta ve

Tablo I: Çalışma Gruplarına Ait Biyokimyasal Veriler

Değişkenler	Kontrol	İskemi	MP	PG	p
Doku Kaspaz-3 (ng/ml)	0,50±0,26 ^{a,b}	2,07±0,33 ^{a,c,d}	1,20±0,4 ^{b,c,e}	1,11±0,22 ^{d,e}	<0,001
Serum MPO (ng/ml)	1,34 (0,61) ^{a,b,f}	4,22 (1,28) ^{a,c,d}	2,59 (0,67) ^{b,c}	2,75 (1,09) ^{d,f}	<0,001
Doku MPO (ng/ml)	2,47 (0,81) ^a	4,83 (0,77) ^{a,c,d}	3,17 (1,50) ^c	3,69 (0,35) ^d	<0,001
Doku MDA (nmol/g doku)	2,39±0,98 ^a	5,21±0,94 ^{a,c,d}	3,18±0,86 ^c	3,35±0,53 ^d	<0,001
Doku CAT (IU/ml)	168,36 (77,99) ^{a,b,f}	53,55 (34,00) ^{a,c,d}	117,12 (29,28) ^{b,c}	118,82 (17,14) ^{d,f}	<0,001
Serum XO (mIU/ml)	0,05 (0,07) ^{a,b}	0,36 (0,15) ^{a,c,d}	0,12 (0,03) ^{b,c,e}	0,06 (0,02) ^{d,e}	<0,001

a: Kontrol vs İskemi ($p<0,001$), **b:** Kontrol vs MP ($p<0,001$), **c:** İskemi vs MP ($p<0,05$), **d:** İskemi vs PG ($p<0,05$), **e:** MP vs PG ($p<0,01$), **f:** Kontrol vs PG ($p<0,05$), **MP=** metilprednizolon, **PG=** progesteron, **MPO=** miyeloperoksidaz, **MDA=** malondialdehit, **CAT=** katalaz, **XO=** Ksantin oksidaz.



Şekil 3: A) Histopatolojik Skor Grafiği. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50. yüzdilik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75. yüzdilik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir. **B)** Normal Nöron Sayıları Grafiği. Dikey çubukların ortasında kalan kutucuk aritmetik ortalamayı gösterirken yukarıya ve aşağıya doğru uzanan çubuklar sırasıyla; +/- standart sapma değerlerini ifade etmektedir. **C)** Tarlov Skor Grafiği. Her bir kutunun ortasındaki yatay çizgi medyan değeri (50. yüzdilik) gösterirken kutuların alt ve üst kenarları sırasıyla; 25. ve 75.yüzdilik değerleri ifade etmektedir. Kutuların alt ve üst kenarlarından uzayarak giden çubuklarla sırasıyla; minimum ve maksimum değerler gösterilmiştir.

küçük boyutlu myelinize aksonlar ultrastrüktürel olarak normal görüldü (Şekil 4A).

İskemi grubunun transmisyon EM incelemesinde küçük boyutlu, orta boyutlu ve büyük boyutlu myeline aksonların myelin konfigürasyonlarında ayrışmalar izlendi. Tüm gruplarla karşılaştırıldığında iskemi grubu myelinli aksonlarda en fazla ultrastrüktürel hasar tespit edilen gruptu (Şekil 4B).

MP grubunda orta boyutlu ve büyük boyutlu myelinize aksonların myelin konfigürasyonlarında ayrışmalar izlendi. Ayrıca küçük boyutlu myelinize aksonların çok az bir kısmında myelin konfigürasyonlarda ayrışmalar izlendi (Şekil 4C).

PG grubunda büyük boyutlu myelinize aksonların myelin konfigürasyonlarında ayrışmalar izlendi. Diğer tüm küçük boyutlu aksonlarda ve orta boyutlu aksonların çok büyük bir kısmında ultrastrüktürel veriler normaldi (Şekil 4D). PG grubundaki mye-

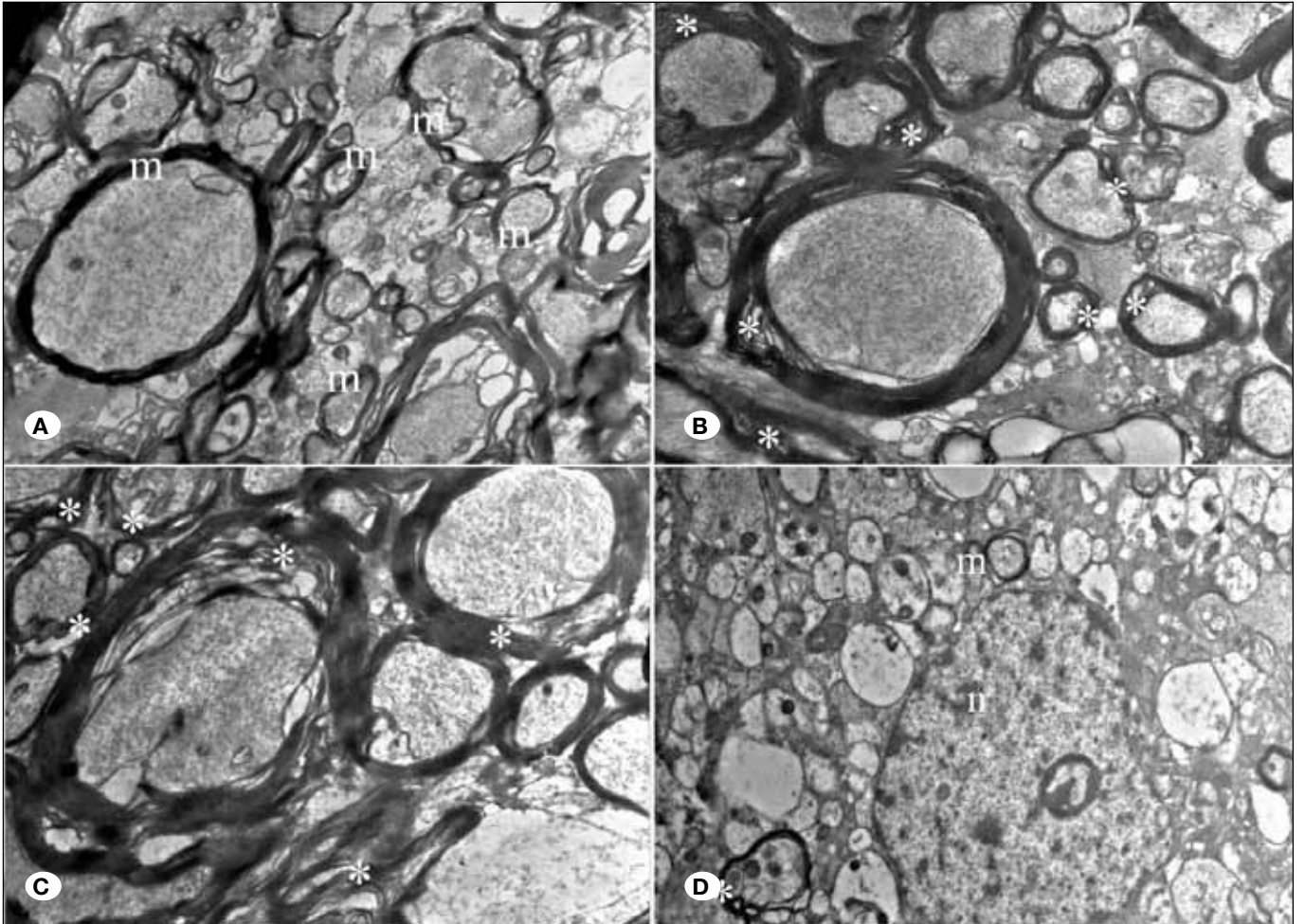
linli aksonların ultrastrüktürel görünümü MP grubundakinde kısmen daha iyiydi.

Kontrol grubuna kıyasla iskemi grubunda küçük boyutlu myelinli aksonlarda bozulma istatistiki olarak anlamlı olacak şekilde daha fazlaydı ($p=0,008$).

İskemi grubuyla karşılaştırıldığında hem PG hem de MP küçük boyutlu myelinli aksonları hasarlanmadan istatistiki olarak anlamlı ölçüde daha fazla korunmuştur ($p=0,008$, her iki karşılaştırma için).

PG ve MP birbiriyle karşılaştırıldığında küçük boyutlu myelinli aksonların iskemik hasardan korunması yönünde istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p=0,624$).

İskemi grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı şekilde orta boyutlu myelinli aksonlar daha fazla



Şekil 4: Çalışma gruplarına ait elektron mikroskopisi görüntüleri. Kontrol grubundan (A) alınmış bir elektron mikrofotografında (orijinal büyütme X5000) hasarlanmamış normal görünümde myelin konfigürasyonlar (m) izlenmekte. İskemi grubundan (B) alınmış bir elektron mikrofotografında (orijinal büyütme X5000) küçük, orta ve büyük boyutlu myelinli aksonlarda ayrışmalar gösteren (*) myelin konfigürasyonlar izlenmekte. Metilprednizolon grubundan (C) alınmış bir elektron mikrofotografında (orijinal büyütme X5000) sadece orta ve büyük boyutlu myelinli aksonlarda ayrışmalar gösteren (*) myelin konfigürasyonlar izlenmekteyken, küçük boyutlu myelinli aksonların korunduğu dikkat çekmektedir. Progesteron grubundan (D) alınmış bir elektron mikrofotografında (orijinal büyütme X5000) orta ve büyük boyutlu myelinli aksonlarda ayrışmalar gösteren (*) myelin konfigürasyonlar izlenmekte. Normal yapısı korunmuş hücre çekirdeği (n) ve küçük boyutlu myelinli aksonlar korunduğu izlenmekte.

Tablo II: Elektron Mikroskopi Sonuçları

Miyelinli Akson	Kontrol	İskemi	MP	PG	p
Küçük boyutlu	0,0 (0,0) ^{a,b,c}	19,0 (6,5) ^{a,d,e}	8,0 (1,5) ^{b,d}	5,0 (1,5) ^{c,e}	<0,001
Orta boyutlu	0,0 (0,0) ^{a,b,c}	100,0 (0,0) ^{a,d,e}	97,0 (3,5) ^{b,d}	92,0 (5,0) ^{c,e}	<0,001
Büyük boyutlu	6,0 (2,5) ^{a,b,c}	100,0 (0,0) ^a	100,0 (0,0) ^b	100,0 (0,0) ^c	<0,001

a: Kontrol vs İskemi ($p=0,008$), **b:** Kontrol vs MP ($p=0,008$), **c:** Kontrol vs PG ($p=0,008$), **d:** İskemi vs MP ($p=0,008$), **e:** İskemi vs PG ($p=0,008$), **MP:** Metilprednizolon, **PG:** Progesteron.

hasarlanmıştır ($p=0,008$). PG ve MP grupları iskemi grubuyla kıyaslandığında orta boyutlu myelinli aksonları istatistiki olarak anlamlı bir şekilde daha fazla korunmuşlardır ($p=0,008$, her iki karşılaştırma için). Orta boyutlu myelinli aksonların korunması açısından istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p=0,714$). Ayrıca kontrol grubuyla karşılaştırıldığında büyük boyutlu myelinli aksonlar da İ/R hasarından daha fazla etkilenmişlerdir ($p=0,008$). Ancak ne PG ne de MP büyük boyutlu myelinli aksonları İ/R hasarından koruyamamıştır (Tablo II).

Nörolojik Değerlendirme

Ortalama Tarlov skorları iskemi grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı şekilde daha düşüktü ($p<0,001$). PG grubunun ortalama Tarlov skorları iskemi grubuyla karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p<0,001$). MP grubunun ortalama Tarlov skorları iskemi grubundan istatistiki olarak anlamlı şekilde daha yüksekti ($p=0,002$). PG ve MP gruplarının ortalama Tarlov skorları arasında istatistiki olarak anlamlı fark yoktu ($p=0,654$) (Şekil 3C).

■ TARTIŞMA

İnen ve torakoabdominal aortaya yönelik yapılan cerrahi girişimler sonrasında spinal kord hasarına ikincil parapleji gelişmesi ön görülemeyen ve katastrofik bir komplikasyondur. Aortik çapraz klemplenme sırasında meydana gelen hipoperfüzyon primer hasarlanmaya neden olurken klempe kaldırıldıktan sonra kan akımının yeniden sağlanmasıyla ikincil hasarlanma spinal kord disfonksiyonunun temel nedenleridir (9,14).

Nekroz ve apoptoz İ/R hasarında nöron kaybına yol açan en önemli iki mekanizmadır (31). Akut iskemi sonrası spinal kan akımındaki azalma adenozin trifosfatın tükenmesine ve ödem sonrası nekroza neden olur (15,31). Kaspaz-3 interlökin dönüştürücü enzim ailesinin bir üyesi olup memeli hücrelerine apoptozun ve inflamasyon yollarının primer başlatıcısıdır (22). Sakurai ve ark. spinal kordun 15 dakikalık iskemisini takiben motor nöronlarda kaspaz-3 immünoreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir (31). İskemik olayların bir sonucu olarak kaspaz-3'teki artış deoksiribonükleik asit (DNA) fragmentasyonunu başlatmaktadır (25). Birçok çalışmada kaspaz-3 aktivitesinin spinal İ/R sonrası apoptozun güvenilir bir göstergesi olduğu raporlanmıştır (13,23,41). Birçok çalışmada iskemi sonrası PG kullanımının nöronal sağkalımı artırdığı gösterilmiştir (4,26,43). Bu çalışmada, spinal kord İ/R hasarını takip eden 24. saatte dokuda kaspaz-3 aktivitesinin arttığı gösterilmiştir. Hem PG hem de MP spinal kordda kaspaz-3 aktivitesini azaltmış ve

kordu apoptotik hasardan korumuştur. Bu bulgular PG'un anti-apoptotik etkinliği olduğuna işaret etmektedir.

MPO aktivitesi hasarlanmış dokuya nötrofil infiltrasyonunun güvenilir bir göstergesidir ve spinal korda infiltre olmuş nötrofillerin aktivitesi ve sayısı doğru orantılı olarak artar (36). MPO nötrofillerin azurofilik granüllerinde yüksek miktarlarda bulunur ve nötrofillerin oksijen bağlı bakterisidal etkisinden sorumludur. Daha önceki çalışmalarda da PG'un nöronal dokuda hem iskemi hem de travma sonrasında anti-inflamatuvar etkinliği olduğu gösterilmiştir (40,42). PG'un bu anti-inflamatuvar etkinliğinin IL-1 β , TNF- α , IL-6, COX-2 ve ICAM-1 gibi sitokinlerin etkinliğinin azalmasıyla olduğu raporlanmıştır (40). Bizim çalışmamızda hem PG hem de MP dokuda ve serumda MPO aktivitesini azaltmıştır. Bu gözlemlenen MPO aktivitesi azalması, spinal korda infiltre olmuş nötrofil sayısındaki azalmayı göstermektedir ve PG'un spinal kord İ/R hasarında anti-inflamatuvar etkinlik gösterdiğinin bir kanıtıdır.

Santral sinir sistemi büyük miktarda lipid kökenli maddelerden oluşmaktadır; bu nedenle serbest oksijen radikalleri kökenli oksidatif strese lipid peroksidasyonu sonrasında kolaylıkla hasarlanırlar (33). Spinal kord İ/R sonrasında lipid peroksidasyonu hücre membranında başlar (41). Aynı zamanda lipid peroksidasyonu ortaya çıkan ikincil hasarın en temel patofizyolojik mekanizmalarından bir tanesidir (8). MDA poliansatüre yağ asitlerinin bir yıkım ürünüdür ve peroksidasyon reaksiyonlarının güvenilir bir göstergesidir (41). Spinal kord iskemisi sonrası MDA yükselmekte, bu yükseliş lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olup reperfüzyon hasarının ortaya çıktığının kanıtıdır (29,30). Bizim çalışmamızda da iskemi reperfüzyon hasarına ikincil olarak iskemi grubunda kontrol grubuna oranla dramatik bir MDA yükselmesi görülmüştür; PG ve MP tedavileri MDA yükselmesini belirgin şekilde azaltmıştır. Bu veriler, hem PG'un hem de MP'un lipid peroksidasyonunu engellediğini göstermektedir.

Reaktif oksijen ürünleri reperfüzyon sonrası ortaya çıkan sekonder hasarda kilit rol oynarlar (6). Daha önceki çalışmalarda PG'un iskemi sonrası nöroprotektif etkinliğinin antioksidatif özelliğine bağlı olabileceği düşünülmektedir (2,7,27,40). Farelerde MCA oklüzyonunu takiben PG uygulaması indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve iNOS kökenli nitrik oksit (NO) oluşumunu azaltmıştır (27). Aggarwal ve ark. iskemi sonrası PG uygulamasının antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz, CAT ve glutatyon peroksidaz düzeylerinde artışa sebep olduğunu göstermiştir (2). CAT antioksidan bir enzim olup ortaya çıkan reaktif oksijen ürünlerini ortadan kaldırır (17). Antioksidan enzim aktiviteleri ileri derecede artmış oksidatif stres

durumlarında moleküler hasara bağlı azalır (39). Bu çalışmada İ/R hasarı sonrası oluşan yüksek oksidatif strese bağlı olarak iskemik grubunda CAT düzeylerinin düştüğü izlenmiştir. PG ve MP uygulanmasını takiben her iki maddenin de anti oksidan etkisine bağlı olarak CAT düzeyleri yükselmiştir. Bunun yanında XO da reaktif oksijen maddeleri için önemli bir kaynaktır (16). İ/R hasarı sonrası artmış XO düzeyleri oksidatif stresin bir başka önemli göstergesidir (13,23). Bizim çalışmamızda da İ/R hasarına maruz kalan spinal kordlarda XO aktivitesinin arttığı görülmüştür. Hem PG hem de MP, XO düzeylerini düşürmüştür. PG'un CAT ve XO üzerinden gösterdiği antioksidan aktivite spinal kord hasarının önlenmesinde, nöroproteksiyonda önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada ışık mikroskopik incelemelerde iskemik grubunda İ/R hasarının belirgin olarak hemoraji, ödem ve nekroza sebep olduğu görülmüştür. Hasarlı spinal kord bölgelerinde polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve plazma hücreleriyle infiltrasyon gözlemlenmiştir; bu da iskeminin inflamatuvar cevaba sebep olduğunun bir göstergesidir. Ayrıca iskemik grubunda normal motor nöron sayısı belirgin olarak azalmıştı. PG ve MP gruplarının histopatolojik değerlendirilmesinde iskemik gruba oranla spinal kordun İ/R hasarından morfolojik olarak daha fazla korunduğu ve bu piyeslerde daha yüksek sayıda normal motor nöronun hasarlanmadan korunduğu görülmüştür.

Dokuların daha ayrıntılı incelenmesi için transmisyon EM ile myelinli aksonlar incelenmiştir. İskemik grubundaki dokuların ultrastrüktürel değerlendirilmesinde İ/R hasarının küçük, orta ve büyük boyutlu myelinli aksonlarda çok belirgin ayrışmalara neden olduğu gözlemlenmiştir. Hem PG hem de MP tedavileri küçük ve orta boyutlu myelinli aksonları İ/R hasarından korumuştur. Ne yazık ki bu çalışılan ilaçlar büyük boyutlu myelinli aksonlarda herhangi bir korumaya sebep olmamıştır.

Bu çalışmanın nörolojik fonksiyonel değerlendirmesinde Tarlov skorları kullanılmıştır. 20 dk iskemik periyodu sonrası iskemik grubundaki tüm denekler paraparezi hale gelmiştir. Hem PG hem de MP tedavileri spinal kord İ/R hasarından korumuş ve deneklerin nörolojik fonksiyonlarında belirgin iyileşmeye neden olmuştur.

■ SONUÇ

Bu çalışmanın biyokimyasal, histopatolojik, ultrastrüktürel ve nörolojik muayene bulguları sonucunda PG'un spinal kord İ/R hasarında belirgin nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. PG'un bu nöroprotektif etkisi en az MP kadar etkindir. Bu çalışmanın verileri ışığında spinal kord İ/R hasarından korumakta etkin olduğu gösterilen PG'un daha ileri çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

■ KAYNAKLAR

1. Aebi H: Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121-126, 1984
2. Aggarwal R, Medhi B, Pathak A, Dhawan V, Chakrabarti A: Neuroprotective effect of progesterone on acute phase changes induced by partial global cerebral ischaemia in mice. *J Pharm Pharmacol* 60: 731-737, 2008
3. Attella MJ, Nattinville A, Stein DG: Hormonal state affects recovery from frontal cortex lesions in adult female rats. *Behav Neurol Biol* 48: 352-367, 1987
4. Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L: Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 55: 127-138, 2008
5. Cassada DC, Gangemi JJ, Rieger JM, Linden J, Kaza AK, Long SM, Kron IL, Tribble CG, Kern JA: Systemic adenosine A2A agonist ameliorates ischemic reperfusion injury in the rabbit spinal cord. *Ann Thorac Surg* 72:1245-1250, 2001
6. Chan PH: Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27: 1124-1129, 1996
7. Coughlan T, Gibson C, Murphy S: Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and invitro. *J Neurochem* 93: 932-942, 2005
8. Diaz-Ruiz A, Rios C, Duarte I, Correa D, Guizar-Sahagun G, Grijalva I, Madrazo I, Ibarra A: Lipid peroxidation inhibition in spinal cord injury: Cyclosporin-A vs methylprednisolone. *Neuroreport* 11: 1765-1767, 2000
9. Fan L, Wang K, Shi Z, Die J, Wang C, Dang X: Tetramethylpyrazine protects spinal cord and reduces inflammation in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg* 54: 192-200, 2011
10. Fee DB, Swartz KR, Joy KM, Roberts KN, Scheff NN, Scheff SW: Effects of progesterone on experimental spinal cord injury. *Brain Res* 1137:146-152, 2007
11. Gonzalez Deniselle MC, López-Costa JJ, Saavedra JP, Pietranera L, Gonzalez SL, Garay L, Guennoun R, Schumacher M, De Nicola AF: Progesterone neuroprotection in the wobbler mouse, a genetic model of spinal cord motor neuron disease. *Neurobiol Dis* 11:457-468, 2002
12. Guth L, Zhang Z, Roberts E: Key role for progesterone in combination therapy promotes recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12308-12312, 1994
13. Güner B, Kertmen H, Kasim E, Yilmaz ER, Kanat BH, Sargon MF, Arikok AT, Ergüder BI, Sekerci Z: Neuroprotective effects of testosterone on ischemia/reperfusion injury of the rabbit spinal cord. *Injury* 46: 240-248, 2015
14. Hasturk A, Atalay B, 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* 19: 353-359, 2009
15. Hayashi T, Sakuria M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y: Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke* 29: 1007-1013, 1998
16. Hille R, Nishino T: Flavoprotein structure and mechanism. 4. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB J* 9: 995-1003, 1995
17. İlhan A, Yılmaz HR, Armutcu F, Gürel A, Akyol O: The protective effect of nebulolol on ischemia/reperfusion injury in rabbit spinal cord. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 1153-1160, 2004
18. Jiang N, Chopp M, Feit H: Progesterone is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in male rats. *Brain Res* 735: 101-107, 1996

19. Ju WH: Survival of motoneurons following axotomy is enhanced by lactation or by progesterone treatment. *Brain Res* 491: 379-382, 1989
20. Kanellopoulos GK, Kato H, Wu Y, Dougenis D, Mackey M, Hsu CY, Kouchoukos NT: Neuronal cell death in the ischemic spinal cord: The effect of methylprednisolone. *Ann Thorac Surg* 64:1279-1285, 1997
21. Kaptanoğlu E, Palaoğlu S, Surucu HS, Hayran M, Beşkonaklı E: Ultrastructural scoring of graded acute spinal cord injury in the rat. *J Neurosurg* 97(1 Suppl): 49-56, 2002
22. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD: Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429, 2001
23. Kertmen H, Güler B, Yılmaz ER, Sanlı AM, Sorar M, Arıkök AT, Sargon MF, Kanat MA, Ergüder BI, Sekerci Z: The protective effect of low-dose methotrexate on ischemia-reperfusion injury of the rabbit spinal cord. *Eur J Pharmacol* 714: 148-156, 2013
24. Labombarda F, Gonzalez SL, Gonzalez DM, Guennoun R, Schumacher M, de Nicola AF: Cellular basis for progesterone neuroprotection in the injured spinal cord. *J Neurotrauma* 19: 343-355, 2002
25. Li M, Ona VO, Chen M, Tenneti L, Zhang X, Stieg PE, Lipton SA, Friedlander RM: Functional role and therapeutic implications of neuronal caspase-1 and -3 in a mouse model of traumatic spinal cord injury. *Neuroscience* 99: 333-342, 2000
26. Morali G, Letechipía-Vallejo G, López-Loeza E, Montes P, Hernández-Morales L, Cervantes M: Post-ischemic administration of progesterone in rats exerts neuroprotective effects on the hippocampus. *Neurosci Lett* 382:286-290, 2005
27. Ozacmak VH, Sayan H: The effects of 17 beta estradiol, 17 alpha estradiol and progesterone on oxidative stress biomarkers in ovariectomized female rat brain subjected to global cerebral ischemia. *Physiol Res* 58: 909-912, 2009
28. Prajda N, Weber G: Malignant transformation-linked imbalance: Decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 59: 245-249, 1975
29. Qian H, Liu D: The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochem Res* 22: 1231-1236, 1997
30. Roof RL, Hoffman SW, Stein DG: Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol* 31:1-11, 1997
31. Sakurai M, Nagata T, Abe K, Horinouchi T, Itoyama Y, Tabayashi K: Survival and death-promoting events after transient spinal cord ischemia in rabbits: Induction of Akt and caspase3 in motor neurons. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125: 370-377, 2003
32. Sanli AM, Serbes G, Sargon MF, Çalışkan M, Kiliç K, Bulut H, Sekerci Z: Methotrexate attenuates early neutrophil infiltration and the associated lipid peroxidation in the injured spinal cord but does not induce neurotoxicity in the uninjured spinal cord in rats. *Acta Neurochir* 154: 1045-1054, 2012
33. Schmidley JW: Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 21: 1086-1090, 1990
34. Stein DG: Brain damage, sex hormones and recovery: A new role for progesterone and estrogen? *Trends Neurosci* 24: 386-391, 2001
35. Svensson LG, Crawford ES, Hess KR, Coselli JS, Safi HJ: Experience with 1509 patients undergoing thoracoabdominal aortic operations. *J Vasc Surg* 17: 357-368, 1993
36. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K: Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 79: 1177-1182, 1997
37. Thomas AJ, Nockels RP, Pan HQ, Shaffrey CI, Chopp M: Progesterone is neuroprotective after acute experimental spinal cord trauma in rats. *Spine* 24: 2134-2138, 1999
38. Umehara S, Goyagi T, Nishikawa T, Tobe Y, Masaki Y: Esmolol and landiolol, selective beta1-adrenoreceptor antagonists, provide neuroprotection against spinal cord ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 110: 1133-1137, 2010
39. Ustün ME, Duman A, Oğun CO, Vatanssev H, Ak A: Effects of nimodipine and magnesium sulfate on endogenous antioxidant levels in brain tissue after experimental head trauma. *J Neurosurg Anesthesiol* 13: 227-232, 2001
40. Wang J, Zhao Y, Liu C, Jiang C, Zhao C, Zhu Z: Progesterone inhibits inflammatory response pathways after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Mol Med Rep* 4: 319-324, 2011
41. Yılmaz ER, Kertmen H, Dolgun H, Güler B, Sanli AM, Kanat MA, Arıkök AT, Bahsi SY, Ergüder BI, Sekerci Z: Effects of darbepoetin- α in spinal cord ischemia-reperfusion injury in the rabbit. *Acta Neurochir* 154: 1037-1043, 2012
42. Yousuf S, Atif F, Sayeed I, Wang J, Stein DG: Post-stroke infections exacerbate ischemic brain injury in middle-aged rats: Immunomodulation and neuroprotection by progesterone. *Neuroscience* 239: 92-102, 2013
43. Zhang Z, Yang R, Cai W, Bai Y, Sokabe M, Chen L: Treatment with progesterone after focal cerebral ischemia suppresses proliferation of progenitor cells but enhances survival of newborn neurons in adult male mice. *Neuropharmacology* 58: 930-939, 2010
44. Zivin JA, De Girolami U: Spinal cord infarction: A highly reproducible stroke model. *Stroke* 11: 200-202, 1980