



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SPİNAL KORD İSKEMİSİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ARDKOŞULLAMA VE/VEYA SİTİKOLİNİN NÖRONAL APOPTOZİSTEKİ
NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Alper TÜRKKAN

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2009



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL SPİNAL KORD İSKEMİSİ UYGULANAN SIÇANLARDA
ARDKOŞULLAMA VE/VEYA SİTİKOLİNİN NÖRONAL APOPTOZİSTEKİ
NÖRON KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Dr. Alper TÜRKKAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Ender KORFALI

BURSA - 2009

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET.....	iv
GİRİŞ.....	1
Eksitotoksitite.....	1
Reperfüzyon Hasarı.....	2
İskemik Tolerans, Önkoşullama ve Ardkoşullama.....	3
Apopitozis.....	4
GEREÇ VE YÖNTEM.....	8
Spinal Kord İskemisinin Oluşturulması.....	8
Nörolojik Semptomların Değerlendirilmesi.....	10
Histopatolojik Değerlendirme.....	11
Kaspaz 3, Kaspaz 9, Bax ve Bcl-2 İmmünohistokimyası.....	11
İstatistiksel Analiz.....	12
BULGULAR.....	13
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	20
KAYNAKLAR.....	28
TEŞEKKÜR.....	33
ÖZGEÇMİŞ.....	34

ÖZET

Spinal kord iskemik hasarı spinal kordun kan akımında azalma ve/veya tam olarak kesilmesi nedeniyle oluşan, nöronlarda dejenerasyon ve kayıpla sonuçlanan olaylar zinciridir. Çalışmamızda iskemik olaylarda koruyucu etkisi gösterilmiş olan sitikolin ve iskemik ardkoşullamanın, spinal kord iskemisindeki nöronal hasarlanmayı azaltıcı etkilerinin apoptotik süreçle ilişkisini incelemek amaçlanmıştır.

Spinal kord iskemisi için intratorasik girişimle sıçanlarda arkus aorta ve aynı anda subklavian arter kliplmesi yöntemi uygulandı. Çalışmamızda 42 adet erkek Sprague-Dawley sıçan (309 ± 27 gr) kullanıldı. Deney grupları sham, spinal iskemi, sitikolin, ardkoşullama, ve ardkoşullama-sitikolin grupları olacak şekilde planlandı. Ardkoşullama uygulanan gruplarda klipleri çıkardıktan sonra 5 dakika reperfüzyon sonrası 1 dakika aralıklarla 6 siklus olarak ardkoşullama uygulandı. Sitikolin ve ardkoşullama-sitikolin grubuna iskemi öncesi 600 mmol/kg dozunda sitikolin intraperitoneal olarak verildi. Tüm sıçanlar reperfüzyondan 96 saat sonra sakrifiye edildi. İmmünohistokimyasal analiz için bcl-2, kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax immün boyamaları yapıldı.

Tüm gruplarda kan basıncı değerleri iskemi öncesi değerlere göre iskemi sonrasında anlamlı düşüş gösterdi. Gruplar arasında kaspaz 3, kaspaz 9, bax ve bcl-2 için immünohistokimyasal skorlama ortalamaları bakımından farklılık saptandı. İskemi uygulananan gruplar (Grup 2, 3, 4 ve 5) sham grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında kaspaz 3, kaspaz 9, bax ve bcl-2 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış saptandı. Kaspaz 9 ortalama skorları grup içi karşılaştırılmasında iskemi uygulanan grup 2' de diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artış saptandı. Bcl-2 ortalama skorlarının grup içi karşılaştırılmasında ise ardkoşullama ve sitikolin uygulanan grup 5'de istatistiksel olarak anlamlılık saptandı.

Sitikolinin ardkoşullama ile kombine edilmesi apoptotik süreçte kaspaz yolağını inhibe ederek ve antiapoptotik proteinleri artırarak nöronal koruma sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Spinal kord iskemisi, ardkoşullama, apoptozis, sitikolin.

SUMMARY

Citicoline and Postconditioning Provides Neuroprotection in a Rat Model of Ischemic Spinal Cord Injury

Ischemic spinal cord injury is a chain of events caused by reduction and/or cessation of spinal cord blood flow resulting in neuronal degeneration and loss. In our study it was aimed to present the relationship between the process of the neuronal injury-decreasing effects of citicoline and ischemic postconditioning which were proven to be effective on the apoptotic process.

Synchronous arcus aorta and subclavian artery clipping method by intrathoracic approach for spinal cord ischemia in rats were performed. In our study, 42 male Sprague-Dawley rats (309 ± 27 gr) were used. Experimental groups were planned as sham, spinal ischemia, citicoline, postconditioning and postconditioning-citicoline groups. Postconditioning were applied as 6 cycles by 1 minutes of ranges after 5 minutes of reperfusion following the clips were removed in groups that postconditioning were applied. 600 mmol/kg of citicoline was given by intraperitoneal route before ischemia in citicoline and postconditioning-citicoline groups. All rats were sacrificed 96 hours after reperfusion. For immunohistochemical analysis, bcl-2, caspase 3, caspase 9 and bax immune staining were performed.

The blood pressure values obtained at the onset of reperfusion were significantly lower than those of preischemic values. A difference in immunohistochemical scoring was detected between caspase 3, caspase 9, bax and bcl-2 groups. When compared the groups that ischemia were applied (Group 2, 3, 4, 5) with sham group (Group 1), a significant increase in caspase 3, caspase 9, bax and bcl-2 was detected. When compared the subgroups, average score of caspase 9 were found significantly higher in ischemia performed group 2. The average score of bcl-2 were also found significantly higher in postconditioning and citicoline applied group 5.

It was thought that, combining citicoline with postconditioning provides

protection by inhibiting the caspase pathway and by increasing the antiapoptotic proteins.

Keywords: Spinal cord ischemia, postconditioning, apoptosis, citicoline.

GİRİŞ

Spinal kord iskemik hasarı çeşitli etyolojik nedenler sonucu spinal kordun kan akımının azalma ve/veya tam olarak kesilmesi nedeniyle oluşan, nöronlarda dejenerasyonla sonuçlanan bir olaylar zinciridir. Klinik olarak paraplejiye kadar giden ağır nörolojik bozukluklara sebep olması nedeniyle önem taşımaktadır. Spinal kord iskemi etyolojisindeki en sık neden desendan torasik ve torakoabdominal aorta cerrahisi sırasında oluşan iskemidir ve görülme sıklığı literatürde % 4-38 arasında bildirilmiştir (1-5).

Aorta cerrahisi sırasında meydana gelen spinal kord iskemik hasarı başlıca dört nedenle ilişkilendirilmektedir. Bunlar; spinal kord kan akımında azalma, nöronal metabolizmada yavaşlama, operasyon sonrası reperfüzyon hasarı, operasyon sonrası spinal kord perfüzyon basıncında azalma olarak sıralanmıştır (1). Operasyonlar sırasında spinal kordda oluşabilecek iskeminin şiddetini azaltmak amacıyla çok sayıda cerrahi teknik ve deneysel nöron koruma yöntemleri ileri sürülmüştür (4, 6-8). Bu nöron koruyucu yöntemler arasında serebrospinal sıvı drenajı (4, 7), distal aortik retrograd perfüzyon (6, 7), regional spinal kord hipotermisi (8) en çok kullanılanlardır. Ancak bu tekniklerden hiçbiri intraoperatif spinal kord hasarını güvenilir şekilde önleyememektedir. Spinal kord iskemisine yol açan patofizyolojik mekanizmaları anlamak ve nöron koruyucu ilaçları denemek amacıyla yapılan deneysel çalışmalarda, iskemik harabiyetin gelişiminde rol oynayan ve nöronal ölüm ile sonuçlanan patofizyolojik değişikliklerin nedeni olarak değişik teoriler öne sürülmüştür. En önemlileri iskemiye bağlı eksitotoksitite, inflamasyon, reperfüzyon hasarı ve apoptozisdir (1, 9-15).

Eksitotoksitite

İskemik hasarın gelişmesinde rol oynayan en önemli mekanizmalar; hücre dışından Ca^{++} girişi, hücre içi Ca^{++} depolarından Ca^{++} salınımı ve hücre içi Ca^{++} düzeyini kontrol eden mekanizmaların bozulmasıdır (16-22).

Voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları lokal membran potansiyeli ile kontrol edilir. ATP'nin tükenmesi sonucu Na^+/K^+ ATPaz, $3Na^+/K^+$, Na^+/H^+ transport pompaları bozulur. Na^+ konsantrasyonunun hücre içinde artması sonucu depolarizasyon oluşur ve voltaj bağımlı Ca^{++} kanalları açılır. Voltaj bağımlı kanalların açılması sonucu hücre içine giren Ca^{++} etkisiyle presinaptik uçtan başta glutamat olmak üzere eksitator aminoasitler sinaptik aralığa salınır. Eksitator aminoasitlerden glutamatın iskemi sırasında nörotransmitter olarak nörotoksik özellikleri olduğu düşünülmektedir (18). Glutamatın yüksek ekstrasellüler konsantrasyonlarda eksitotoksik olduğu ve global veya fokal iskemi sonrasında artmış ekstrasellüler konsantrasyonun tespit edildiği bilinmektedir (15, 18, 22). Glutamatın nekrozu indükleyebildiği gibi hücrelerde apoptotik hücre ölümünün başlamasında etkili olduğu ve aşırı sinaptik aktivitenin, ekstrasellüler glutamat fazlalığının ve aşırı Ca^{++} yüklenmesinin iskemik nöral harabiyeti başlatan ana neden olduğu ileri sürülmüştür (15-18, 22).

İskemi sırasında serbest yağ asitleri ve Na^+ konsantrasyonları artar. Serbest yağ asitleri Ca^{++} un mitokondriden salınımını arttırarak etkisini arttırır. Yüksek intraselüler Ca^{++} konsantrasyonu Ca^{++} a bağlı fosfolipaz A_2 'yi aktive ederek plazma membranından serbest yağ asitlerinin sitozole salınımını arttırır (23). Salınmış yağ asitleri (özellikle araşidonik asit) siklooksijenaz ve lipooksijenaz tarafından prostaglandinlere çevrilir (23,24). Araşidonik asit metaboliti olan tromboksan A_2 'nin nöronal iskemi gelişiminde rolü vardır ve trombosit agregasyonu, vazokonstrüksiyon, mikrosirkülatur kan akımında azalmaya ve iskemik hücre hasarına yol açmaktadır. Aynı zamanda güçlü bir kemoatraktandır ve nötrofillerin endotele adezyonunu arttırır. Trombositleri aktive ederek vazospazma ve iskeminin artmasına neden olur (23, 24).

Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskemiye maruz kalan dokunun tekrar kanlanması ile enerji desteğinin sağlanması ve sellüler homeostazisinin yeniden düzenlenmesidir. Ancak iskeminin yaptığı hasara ek olarak reperfüzyonun da

zararlı etkileri vardır. Reperfüzyon sırasında serbest oksijen radikallerinin aşırı üretiminin bir sonucu olarak antioksidatif defans mekanizmalarının bozulması ve/veya inaktivasyonuna, antioksidanların tüketimine ve yeterince üretilmemesine neden olur (25).

Serbest radikaller normal olarak oksidatif metabolizma sırasında oluşur ancak enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler tarafından kontrol edilir (22). Süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz bu radikallere karşı en önemli intrasellüler enzimatik savunma sistemidir. Serbest radikaller, proteinler, lipidler, karbonhidratlar gibi organik ya da inorganik kimyasallarla, membran ve nükleik asitlerle reaksiyona girerler (17, 18, 22). Serbest radikaller doymamış serbest yağ asitlerinin peroksidasyonuna neden olabilirler. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller tarafından oluşturulan hücre hasarının patogenezi içindeki en önemli nedendir (24). Lipid peroksidasyonun sonucunda membran akışkanlığı azalır, membranın iki tabakası arasında fosfolipid değişimini kolaylaştırır, normal olarak spesifik kanallardan geçemeyen maddeler için membran geçirgenliği azalır ve membran proteinleri hasara uğrayarak enzimler ve iyon kanalları inaktive olur (22, 24, 25). Lipid peroksidasyonu ile oluşan araşidonik asit siklooksijenaz ile prostaglandinlerden tromboksan ve prostasikline dönüşür. Bu ajanların trombosit fonksiyonu ve vasküler yapı üzerine önemli etkileri vardır. Prostaglandinlerin yapımı vazospazm ve mikrovasküler trombozu tetikleyerek iskemiyi artırır (24, 25).

İskemik Tolerans, Önkoşullama ve Ardkoşullama

Önkoşullama ve ardkoşullama kavramları, nöronal dokunun gerek iskemiyeye toleransının artırılması gerekse reperfüzyon hasarına karşı tanımlanan güncel nöron koruyucu yaklaşımlardır. Ağır iskemik strese saatler veya günler önce öldürücü derecede olmayan iskemik stres uygulanmasının hücre ölümünü azaltabileceği gösterilmiş ve bu olay 'tolerans' olarak tanımlanmıştır (26, 27). Bu yaklaşıma göre nöral hasara neden olan herhangi bir uyarı, harabiyete neden olabilecek doz eşiğine yakın

fakat harabiyete neden olmayacak derecede uygulandığı zaman santral sinir sistemini daha sonraki iskemiye veya travmaya karşı dayanıklılığını arttıran endojen yolların etkinliğini arttırarak korur (27).

İskemik bölgeyi genişleten sekonder mekanizmalar “penumbrayı” en ağır hasarın olduğu iskemi merkezinden perfüzyonun azaldığı periferdeki vasküler bölgelere kadar uzanmasına neden olan dinamik bir oluşum haline getirir. Reperfüzyonun tekrar sağlanmasına kadar geçen sürede nöral doku hücreleri fonksiyonlarını durdurarak yaşamlarını sürdürmeye çalışır. Bu yaşam sürdürebilme çabası “ischemic preconditioning (önkoşullama)” kavramının başlangıç noktası olmuştur (27). İskemik önkoşullama ilk kez Murry ve ark. (28) tarafından tanımlanmış ve miyokard üzerinde koruyucu etkileri gösterilmiştir. Daha sonra beyin, spinal kord, barsak, karaciğer, kas dokusu gibi diğer organlarda etkileri incelenmiştir (29-33).

İskemiye takiben reperfüzyonun erken döneminde kan akımının kısa ve aralıklı olarak kesintiye uğraması ardkoşullama olarak tanımlanmıştır (34). İskemik ardkoşullamanın etkileri ilk olarak Zhao ve ark. (34) tarafından miyokard hasarında incelenmiş ve 60 dakikalık iskemiye takiben reperfüze edilen köpek kalbinde reperfüzyonun 30 saniyelik aralarla 3 kez kesintiye uğratılmasının infarkt boyutunu (%47'den %11'e) azalttığı gösterilmiştir.

Ön ve ardkoşullamanın nöron koruyucu etkilerinde benzer yolak ve moleküller yer alsalar bile rolleri ve zamanlamaları her iki durumda farklı olmaktadır. Taşkapılıoğlu ve ark. (35), sıçanlarda geçici orta serebral arter oklüzyonu (OSAO) yaparak önkoşullama, ardkoşullama ve ön/ardkoşullamaların ayrı ayrı veya birlikte uygulanmalarının infarkt hacmini azalttığını göstermişlerdir. Zhao ve ark. (36) çalışmalarında da ardkoşullamanın infarkt hacmini azalttığı saptanılmış ve nöron koruyucu etki mekanizmasının apoptozis ve serbest oksijen radikallerinin salınımının önlenmesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

Apoptozis

Normal şartlarda hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir, klasik

hücre ölümü nekroz olarak adlandırılır. Hücre ölümünün diğer şekli olan apoptozis ise yoğunlukla tek tek hücreleri etkiler, birçok fizyolojik ve patolojik koşullarda ortaya çıkar ve inflamasyon söz konusu değildir (37, 38). Apoptotik hücre ölümü; ATP varlığında hücre hasarlanma ve inflamasyon olmadan programlı bir şekilde gerçekleştirilir. Apoptozisde ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. Erken dönemde apoptotik hücrelerde özelleşmiş yüzey organellerinde kayıp ve büzülme saptanır. Bunun sebebi olarak, plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında fonksiyon kaybı ile hücrelerin hacimlerini kaybettiği öne sürülmüştür (38, 39). Daha sonra plazma membranında tomurcuklanmalar oluşur ve hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış tabakasına göç eder. Plazma membranında meydana gelen değişikliklerle beraber apoptotik hücreler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (38-40).

Apoptozis primer veya sekonder olarak gelişir. Primer olarak daha önceden bu işleme hazır olan hücrede bazı genlerin aktivasyonu ile meydana gelen değişikliklerle apoptotik süreç başlar. Sekonder olarak da bazı hücre içi ve dışı uyaranlar tarafından başlatılabilir. Hücre dışı uyaranlar arasında; tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler önemli yere sahiptir (37, 39). Apoptozisi etkileyen hücre içi uyaranlar arasında sitokinler, hücre içi Ca^{++} miktarında artış, DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkogenlerin (C-myc) yer aldığı bilinmektedir (39). Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de apoptoz meydana getirirler (39).

Spinal kord iskemik hasarlanmasında apoptozisin rol oynadığı da birçok çalışma ile desteklenmiştir. Hayashi ve ark. (40) spinal kord iskemisi oluşturdukları tavşanlarda spinal motor nöronlardaki hücre ölümünün

apoptotik sürecin aktivasyonu ile yakın ilişkili olduğunu göstermiştir. Kato ve ark. (41), spinal kord iskemisini takiben 48 saat sonra periferik gri cevher dorsal boynuzlarındaki hücre ölümünü apoptotik belirteçlerle göstermişlerdir. Lang-Lazdunski ve ark. (42) aortik kliplleme ile oluşturdukları spinal kord iskemisinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücre ölümünün oluştuğunu saptamışlardır. Macey ve ark. (11) spinal kord iskemisinde iki şekilde nöronal ölüm olabileceğini bildirmişler ve nekroz ve apoptozis olarak tanımlamışlardır.

Sitikolin olarak da adlandırılan CDP-kolin'in (sitidin5-difosfokolin), intrasellüler ve ekstrasellüler membranların devamlılığında gerekli olan fosfatidilkolin formasyonu için beyinde hız kısıtlayıcı olarak görev alan endojen nükleoziddir. Sitikolin ve onun ürünleri olan sitidin ve kolin, fosfolipidlerin oluşumunda önemli rol oynarlar . Ayrıca membran oluşumu ve tamirinde de görev alırlar (43). Sitidin ve kolin membran fonksiyonları için gerekli olan nükleik asitler, proteinler ve asetilkolin oluşumuna da katkıda bulunmaktadır. (43-45). Sitikolin'in apoptoziste görevli pro-kaspaz 1, 2, 3, 6 ve 8 ekspresyonunu ve iskemisi sırasında ortaya çıkan DNA fragmentasyonunu azalttığı kanıtlanmıştır (43-45). Lipid içeriği yüksek santral sinir sisteminde nöronal fonksiyonların devamı için gerekli olan fosfolipidlerin deneysel iskemisi ve travma modellerinde sitikolin tedavisi ile yeterli düzeylere ulaştırılabildiği bildirilmiştir (44-48). Adibhatla ve ark. (46) sitikolinin nöron koruyucu etkilerini yayınlamış ve Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesini düzenlediği, fosfolipaz A₂ inhibisyonu yaparak serbest yağ asitlerinin salınmasını engellediğini öne sürmüşlerdir. Krupinski ve ark. (47) antiapoptotik etkisi ile iskemide koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir. Apoptozom oluşum aşamasında kaspaz 9'un bloke edilmesi ile kaspaz 3'ün aktive olmadığını ve bu mekanizma ile hücreyi apoptotik süreçten koruduğu düşünülmektedir (47).

Gerek sitikolinin gerekse iskemik ardkoşullamanın tek başına uygulandığı çalışmalarda apoptotik süreci engelleyerek ve reperfüzyon hasarını azaltarak nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (12-14, 35, 36, 44, 47, 48). Çalışmamızın amacı membran stabilizatörü olarak iskemik

olaylarda koruyucu etkisi gösterilmiş olan sitikolin ve iskemik ardkoşullamanın iskemik nöronal hasarlanmayı azaltıcı etkisinden birlikte yararlanabilmektedir.

Çalışmamızda, sitikolin ve iskemik ardkoşullamanın tek başlarına veya birlikte uygulanmalarında spinal kord iskemisindeki nöronal hasarlanmayı azaltıcı etkilerinin, apoptotik süreçle ilişkisini ortaya koymak amacıyla bcl-2, bax, kaspaz-3, kaspaz-9 immunohistokimyasının araştırılması planlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Tüm deneysel protokoller Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım ve Kullanım komitesinin 2008-8/7 karar no'lu izni ile onaylandı ve Lokal Etik Komitenin bilgisi dahilinde gerçekleştirildi.

Nörovasküler Araştırma Laboratuvarı'nda yapılan çalışmamızda 276-346 g (309 ± 27.4 g) ağırlıktaki erkek Sprague-Dawley (SD) cinsi sıçanlar (n:54) kullanıldı. Sıçanlar deney gününe kadar sıcaklığı $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ olan bir odada ve gün ışığı 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık kontrollü olarak, 2-3 tanesi bir kafeste olacak şekilde, su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular. Operasyondan 12 saat önce aç bırakılıp, sadece su içmelerine izin verildi.

Anestezi indüksiyonu kapalı bir sistem içerisinde %4 izofluran (Isoflurane, Abbott Labs, Queenborough, İngiltere) ve %70 N_2O , %30 O_2 gaz karışımı ile yapıldı. Devam dozlaması ise %70 N_2O ve %30 O_2 gaz karışımı içerisinde %2 izofluran ve spontan solunumda yüz maskesiyle sürdürüldü. Tüm cerrahi uygulamalar mikroskop (Carl Zeiss Opmi 99, Almanya) altında gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sırasında tüm antisepsi kurallarına uyuldu.

Sıçanların deney süresince vücut sıcaklıkları; sıcaklık kontrollü ped üzerinde, rektal prop (Temperature controller probe CMA, İsveç) uygulanarak monitörize edildi ve sıcaklıkları $37\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ düzeyinde tutuldu.

Sol femoral arter PE-50 polietilen kateter ile kateterize edilerek kan basıncı monitörize (Protocol Protopaque 194, ABD) edildi ve 15 dakika ara ile kaydedildi. Arteriyel kateterden aorta kliplemesinden 10 dakika önce ve her iki klibin çıkarılmasından 10 dakika sonra kan gazı örnekleri alınarak; pH, paO_2 , paCO_2 , hematokrit, glukoz değerleri kaydedildi (Chiron Diagnostics, Model 348, İngiltere).

Spinal Kord İskemisinin Oluşturulması

Sıçanlar supin pozisyona alınıp tespit edildikten sonra sol femoral arter

PE-50 polietilen kateter ile kateterize edildi. Ventral 3 cm' lik cilt insizyonunu takiben, göğüs kafesleri manibrium sterniden itibaren kaudal olarak sol parasternal alandan 3. kostaya kadar açıldı. Trakea, vena jugularis interna ve sol nervus larygeus rekürrens ortaya kondu. Plevranın açılmamasına dikkat edilerek sol ortak karotid arter (OKA) bulunarak arkus aorta (AA)' ya ulaşıldı. Sol OKA'in hemen sol tarafında subklavian arter (SA) bulunarak diseke edildi. Kliplemeden 10 dakika önce sol femoral arter kateterinden 100 IU/kg heparin intraarterial olarak verildi.

Spinal kord iskemisi oluşturmak amacıyla aynı anda sol OKA'in hemen proksimaline AA'ya ve SA'ya 17 dakika süreyle iki mikro anevrizma klibi (Aesculap Yaşargil Tuttlingen, Almanya) koyuldu. Süre dolduğunda klipler çıkarılıp 10 dakika sonra kan gazı alınıp göğüs kafesi tabakalar halinde anatomisine uygun kapatıldı. Cerrahi işlemin sonunda 5 ml serum fizyolojik intraperitoneal (ip) olarak tüm sıçanlara verildi.

Sıçanların bir saat boyunca derlenmeleri beklendikten sonra kafeslerine alındılar. Paraplejik hayvanların mesanelerini boşaltmak amacıyla 12 saatte bir Crede manevrası yapıldı. Sıçanlar 5 farklı çalışma grubuna ayrıldı.

Deney Grupları

Grup 1 (Sham grubu; n:10); Arkus aorta (AA) ve subklavian arterler (SA) kliplemesi hariç tüm cerrahi işlemler uygulandı.

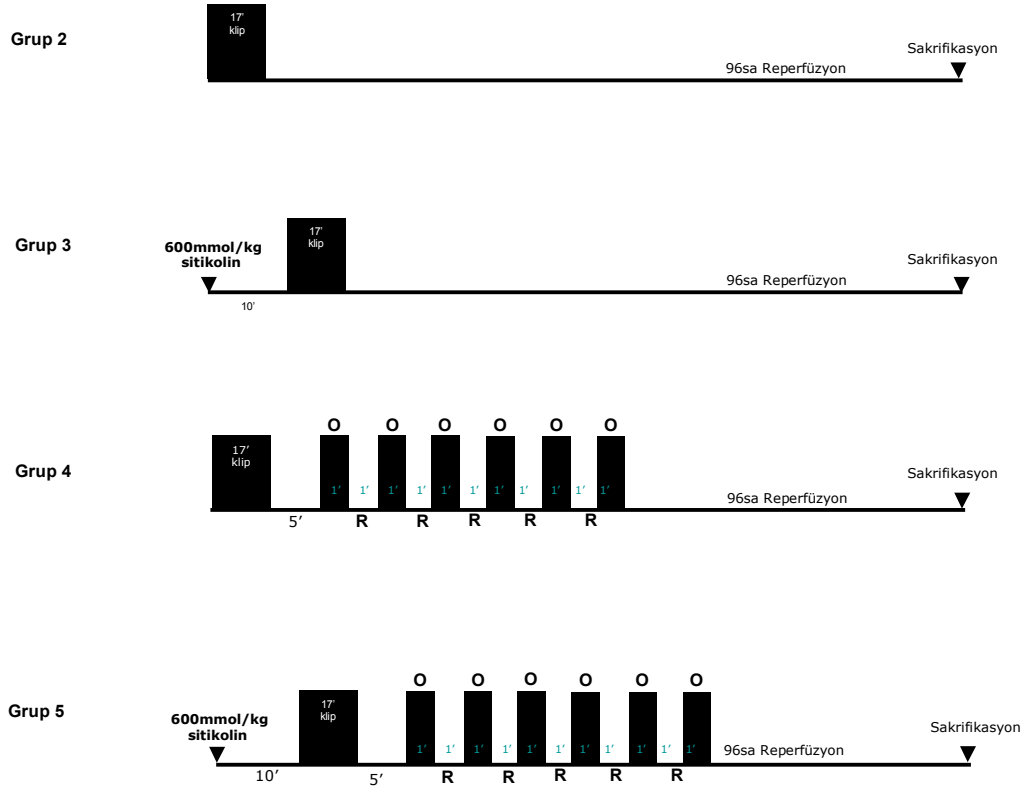
Grup 2 (n:8); 17 dakika AA ve SA kliplemesi uygulandı.

Grup 3 (n:8); 17 dakika AA ve SA kliplemesinden 10 dakika önce 600 mmol/kg dozda sitikolin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) ip olarak verildi.

Grup 4 (n:8); 17 dakika AA ve SA kliplemesi uygulandıktan sonra 5 dakika reperfüzyon sonrası 1 dakika aralıklarla 6 siklus (1-dakika oklüzyon 1-dakika reperfüzyon olacak şekilde) olarak ardkoşullama uygulandı.

Grup 5 (n:8); 17 dakika AA ve SA kliplemesinden 10 dakika önce 600 mmol/kg dozda sitikolin ip (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, ABD) olarak verildi. Klipleme sonunda 5 dakika reperfüzyon sonrası 1 dakika aralıklarla 6 siklus olarak ardkoşullama uygulandı.

Deney akışı Şekil-1' de gösterilmiştir:



Şekil-1: Deney akış şeması

Nörolojik Semptomların Değerlendirilmesi

Sıçanların nörolojik değerlendirilmesi 6., 12., 24. saatlerde ve takiben 24 saatte bir tekrarlanarak 96 saatin sonuna kadar Le May ve ark. (60). tarafından tanımlanan skorlama yöntemine göre yapıldı.

(a) Alt ekstremitelerle yürüyüş; 0: normal, 1: Ayak parmakları yürürken vücudun altında düz ancak ataksi mevcut, 2: Eklemden yürüyüş, 3: Alt ekstremitelerde hareket var ancak eklemden yürüyüş yok, 4: Hareket yok, alt ekstremiteleri sürüklüyor.

(b) Ağrı hissi; 0: Normal, ağrılı uyarana çekme cevabı, 1: Ağrılı uyarana bağırma cevabı ancak çekme yok, 2: Ağrılı uyarana cevap yok.

Her sıçan için herbir zaman noktasında bir motor sensorial bozukluk indeks (MSDI) hesaplaması yapıldı. Sonuç indeks (a) ve (b) skorlarının toplamı olarak belirlendi.

Histopatolojik Değerlendirme

Tüm çalışma grubundaki hayvanlar 96. saatin sonunda derin tiyopental anestezisi (Pentothal sodium, Abbott, İtalya) uygulanarak sakrifiye edildiler. Tüm gruplardan süratle alınan lomber spinal kolon blok örnekleri 48 saat boyunca %10 paraformaldehit solüsyonu ile fikse edildi. Takiben 3 µ kalınlıkta kesitler alınarak, Hematoksilen Eosin (H&E) ile boyanıp, ışık mikroskobu altında x40 büyütme ile incelendi. Gri cevherdeki hasarlanmış nöronların yeri ve dereceleri tespit edildi. Öncelikle genel bakışta beyaz cevher, gri cevher ve beyaz-gri cevher birleşim yeri incelendi. Gross görünümde anterior, posterior ve lateral kord kısımları değerlendirildi. Sağlam ve iskemik hücreler özellikle incelendi. İskemik hasarın yaygınlık derecesine göre 1'den 3'e kadar derecelendirildi. İskemik alan incelenen kesidin %10'undan az ise 1. Derece (+), incelenen kesitte %10-50 arasındaysa 2. Derece (++) ve iskemik alan incelenen kesitte yaygın ise (%50'den fazla) 3. Derece (+++) olarak değerlendirildi (49).

Kaspaz 3, Kaspaz 9, Bax ve Bcl-2 İmmünohistokimyası

Fiksasyon işlemi sonrasında spinal kolonlar doku takibi işlemi takiben parafin bloklara gömüldü. İmmünohistokimyasal süreçler için uygulanan yöntem Hayashi ve ark. (40) çalışmasındaki gibi uygulandı.

İmmünohistokimyasal olarak bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), bax (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), kaspaz 3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), kaspaz 9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, ABD), ile apoptotik süreç değerlendirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler: negatif - : boyanma yok, +: hafif boyanma, ++: orta derecede boyanma, +++: şiddetli boyanma

dörtlü skorlamasına göre deney gruplarını bilmeyen bir nöropatolog tarafından yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Çalışmanın analizleri SPSS 13.0 for Windows (Chicago, IL.) programında yapıldı. Sürekli değer alan değişkenler ortalama, standart sapma, minimum-maksimum değerleri ile birlikte verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis ve Mann Whitney-U testi kullanıldı. Bağımlı zaman dilimlerine ait değerlerin grup içi karşılaştırmalarında ise Wilcoxon Signed Rank Test kullanıldı. Çalışmada $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tüm deney gruplarında sıçanların ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Tüm deney gruplarında sıçanların spinal kord iskemisi öncesi ve sonrası vücut sıcaklıkları, kan gazı değerleri ve kan glukoz değerleri karşılaştırıldığında farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$). (Tablo-1)

Tablo-1 : Tüm deney gruplarında iskemi öncesi ve sonrası kan gazı ve kan glukoz değerleri (Ort±SD) (Kruskal Wallis testi kullanılmıştır).

	Grup 1(n: 10)	Grup 2(n: 8)	Grup 3(n: 8)	Grup 4(n: 8)	Grup 5(n: 8)	
İskemi öncesi	pH	7.32±0.01	7.35±0.01	7.38±0.01	7.37±0.00	7.36±0.01
	pCO ₂	48.20±2.78	45.80±1.77	43.30±2.59	42.30±2.03	42.90±1.67
	pO ₂	143.70±9.94	169.00±7.12	159.80±9.32	163.6±10.39	154.7±9.13
	Hematokrit	32.10±1.77	34.50±1.31	34.20±1.57	36.30±1.53	34.60±0.71
	Sat O ₂	95.40±5.30	96.40±3.40	96.20±4.10	96.30±4.00	96.80±1.80
	Glukoz	181.30±45.90	190.90±24.00	197.70±51.00	151.00±20.80	190.70±34.60
İskemi sonrası	pH	7.30±0.02	7.16±0.01	7.17±0.02	7.21±0.02	7.19±0.03
	pCO ₂	49.70±1.52	50.60±3.36	43.60±2.53	47.10±1.38	45.20±1.44
	pO ₂	140.70±10.14	122.00±9.50	151.60±12.08	129.30±14.16	122.90±5.58
	Hematokrit	33.30±1.45	37.00±1.24	35.80±1.67	37.50±2.29	35.20±0.44
	Sat O ₂	95.10±3.60	89.50±3.20	92.70±3.10	90.90±4.40	92.70±1.30
	Glukoz	202.00±50.30	218.10±36.30	182.0±49.60	174.10±25.30	192.20±41.60

Tüm deney gruplarının rektal sıcaklık değerleri ortalama±standart sapma olarak Tablo-2' de verilmiştir.

Tablo-2: Deney gruplarında iskemi öncesi ve reperfüzyon sonrası (0. ve 15. dakika) rektal sıcaklık (°C) değerleri (Ort±SD) (Wilcoxon Signed Rank testi kullanılmıştır).

	Grup 1(n:10)	Grup 2(n:8)	Grup 3(n:8)	Grup 4(n:8)	Grup 5(n:8)
İskemi öncesi	36.90±0.08	36.90±0.03	36.90±0.04	37.00±0.11	36.90±0.08
Reperfüzyon sonrası 0.dk	37.10±0.09	37.00±0.03	37.10±0.04	37.10±0.03	37.10±0.06
Reperfüzyon sonrası 15. dk	37.00±0.08	37.00±0.03	37.00±0.03	37.10±0.04	37.00±0.05

Kan basıncı değerleri, tüm gruplarda iskemi öncesi değerlere göre reperfüzyon başlangıcında anlamlı düşüş gösterdi ($p<0.05$). Kan basıncı değerleri Tablo-3 olarak gösterilmiştir.

Tablo-3: Tüm deney gruplarının iskemi öncesi ve sonrası kan basıncı değerleri. (mmHg) (Ort±SD).

	Grup 1(n: 10)	Grup 2(n: 8)	Grup 3(n: 8)	Grup 4(n: 8)	Grup 5(n: 8)
İskemi öncesi	104.20±1.62	106.00±3.43	107.30±2.58	99.10±4.52	107.20±3.26
Reperfüzyon 0.dk	92.60±0.77	62.20±6.78*	65.30±4.36*	56.10±2.34*	59.30±3.68*
Reperfüzyon15.dk	100.10±1.30	95.30±2.54	94.00±3.90	93.30±3.01	100.80±1.76

*Grup 1 den farklıdır ($p<0.05$) (Wilcoxon Signed Rank testi kullanılmıştır).

Çalışmamızda toplam 54 sıçan kullanıldı. Bu sıçanların 9 (%16.6) tanesi intraoperatif komplikasyonlar nedeniyle eksitus oldu. 3 (%5.5) tanesi postoperatif 24. saatte eksitus oldu. İntraoperatif olarak en sık mortalite sebebi pnömotoraks olarak tespit edildi (%55.6). 4 (%44.4) sıçan cerrahi

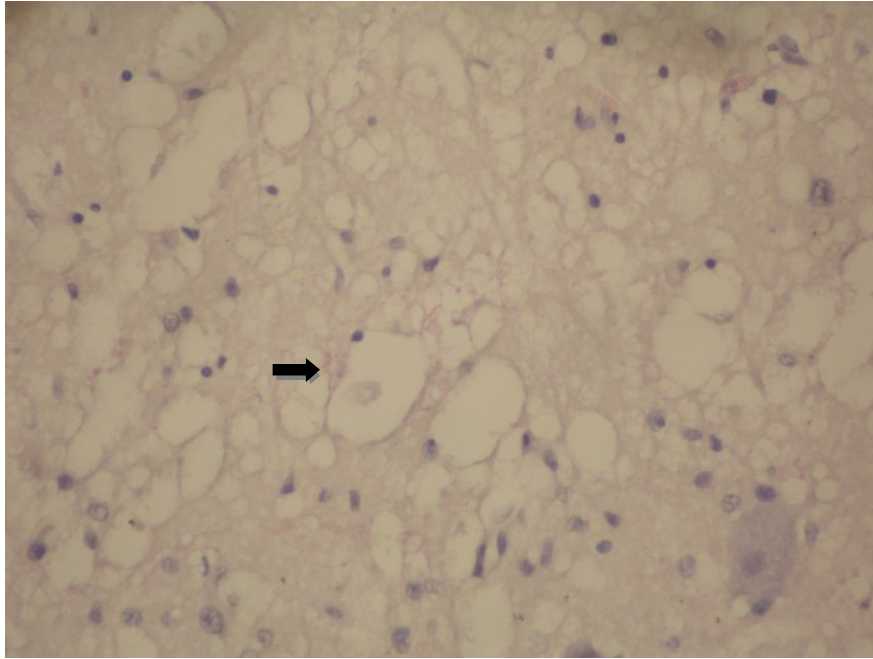
sırasında oluşan vasküler hasar nedeniyle öldü. Postoperatif dönemde iskemi sonrası meydana gelen asidoz ve yaygın barsak iskemisi nedeniyle 3 (%5.5) sıçan eksitus oldu.

Deney gruplarındaki sıçanlar öngörülen postoperatif gözlem periyodu boyunca (96 saat) yaşatıldı. Grup 1 deki tüm sıçanların MSDI skoru 0 olarak saptandı. Grup2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Sadece iskemi uygulanan grupta (Grup 2) tüm sıçanların MSDI skoru 6 olarak tespit edildi ve bu sıçanların duyuşal veya motor fonksiyonlarında herhangi bir düzelme olmaksızın tüm gözlem periyodu boyunca paraplejik olarak kaldılar. Grup 3, 4 ve 5 deki sıçanların anesteziden uyaandıklarında paraplejik oldukları saptandı ve MSDI skorları hepsinde 6 olarak bulundu. Postoperatif 1. saatten itibaren bu sıçanların motor fonksiyonları kısmen düzelmeye başladı. Ancak MSDI skorları karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Bu durum spinal kord iskemisinin tüm gruplar için oluştuğunun kanıtı olarak kabul edildi (Tablo-4).

Tablo-4: Grupların nörolojik muayenelerinin motor sensorial bozukluk indeksi (MSDI) (0-6) olarak işlem sonrası izlem süresi boyunca ortalama skorları (Ort±SD) (Wilcoxon Signed Rank testi kullanılmıştır).

	Grup 1(n: 10)	Grup 2(n: 8)	Grup 3(n: 8)	Grup 4(n: 8)	Grup 5(n: 8)
0. saat	0.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00
6. saat	0.00±0.0	5.90±0.30	4.90±1.10	6.00±0.00	5.00±1.20
12. saat	0.00±0.0	5.60±0.70	4.80±1.20	4.90±0.80	4.90±3.40
24. saat	0.00±0.0	5.60±0.70	4.80±1.20	4.60±3.40	4.90±3.40
48. saat	0.00±0.0	5.60±0.70	4.80±1.20	4.60±3.40	4.90±3.40
72. saat	0.00±0.0	5.60±0.70	4.80±1.20	4.60±3.40	4.90±3.40
96. saat	0.00±0.00	5.60±0.70	4.80±1.20	4.60±3.40	4.90±3.40

Tüm gruplardaki sıçanlardan alınan spinal kord kesitleri H&E ile boyanarak iskemik nöronlar tespit edildi. Histolojik olarak iskemik nöronlarda nöropil, perisellüler ve perivasküler alanlarda vakuolizasyon olduğu ve hücrelerin süngerimsi görünüm aldığı izlendi. Histopatolojik olarak nöronal büzülme, eozinofilik sitoplazma, değişen derecelerde gliozis bulguları gibi dejenerasyona ait değişiklikler saptandı. İskemi uygulanan gruplar (Grup 2, 3, 4, 5) sham grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında iskemi derecelendirmesi açısından anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$). (Şekil-2)



Şekil-2: İskemik nöronlar, perisellüler ve perivasküler alanlarda vakuolizasyon (➡) ve gliozis

Gruplar arasında kaspaz 3, kaspaz 9, bax ve bcl-2 için immünohistokimyasal skorlama ortalamaları bakımından farklılık bulundu ($p<0.05$). İskemi uygulanan gruplar (Grup 2, 3, 4, 5) sham grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında kaspaz 3 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış olduğu görüldü ($p<0.05$). Kaspaz 9 ortalama skorları grup içi karşılaştırılmasında iskemi uygulanan grup 2' de diğer gruplara göre anlamlı düzeyde artış saptandı ($p<0.05$). Bcl-2 ortalama skorlarının grup içi karşılaştırılmasında ise ardkoşullama ve sitikolin uygulanan grupta (Grup 5)

diğer gruplara göre artmış olarak saptandı ($p<0.05$). Grupların immünohistokimyasal skora sonuçları Tablo-5, Şekil 3 ve Şekil 4' de verilmiştir.

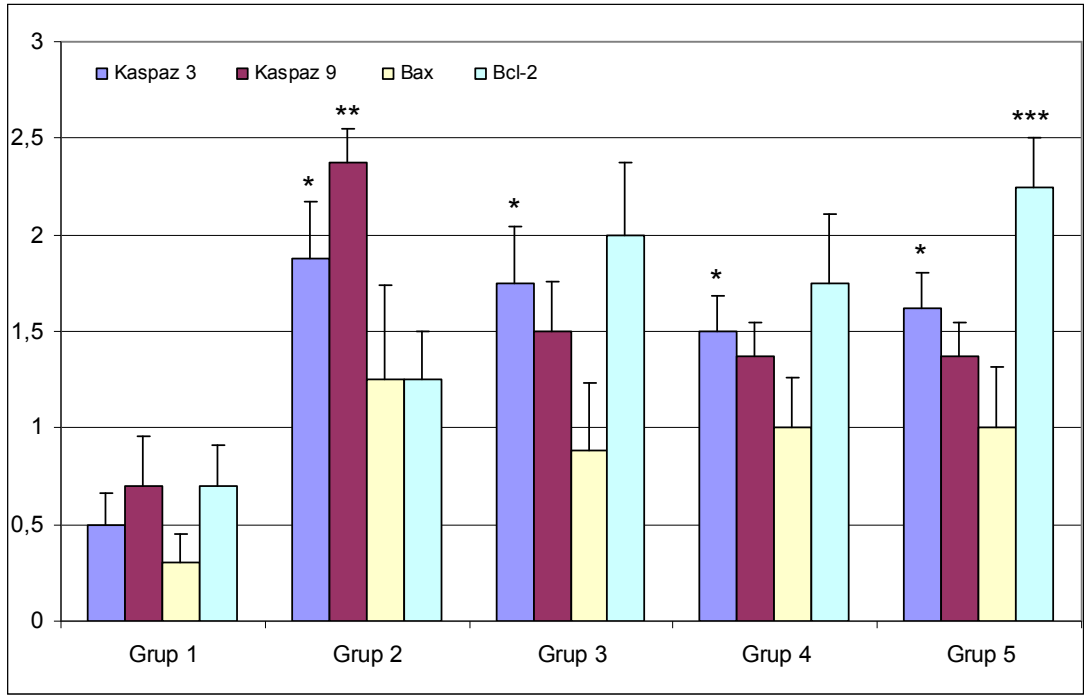
Tablo-5: Grupların immünohistokimyasal skora sonuçları (Ort±SD).

	Grup 1(n: 10)	Grup 2(n: 8)	Grup 3(n: 8)	Grup 4 (n: 8)	Grup 5(n: 8)
Kaspaz 3	0.50±0.16	1.87±0.29*	1.75±0.29*	1.50±0.18*	1.62±0.18*
Kaspaz 9	0.70±0.26	2.37±0.18**	1.50±0.26	1.37±0.18	1.37±0.18
Bax	0.30±0.15	1.25±0.49	0.87±0.35	1.00±0.26	1.00±0.32
Bcl-2	0.70±0.21	1.25±0.25	2.00±0.37	1.75±0.36	2.25±0.25***

* Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık mevcuttu ($p<0.05$) (Kruskal Wallis testi kullanılmıştır).

** Grup 1, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$) (Mann Whitney U testi kullanılmıştır).

*** Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$) (Mann Whitney U testi kullanılmıştır).

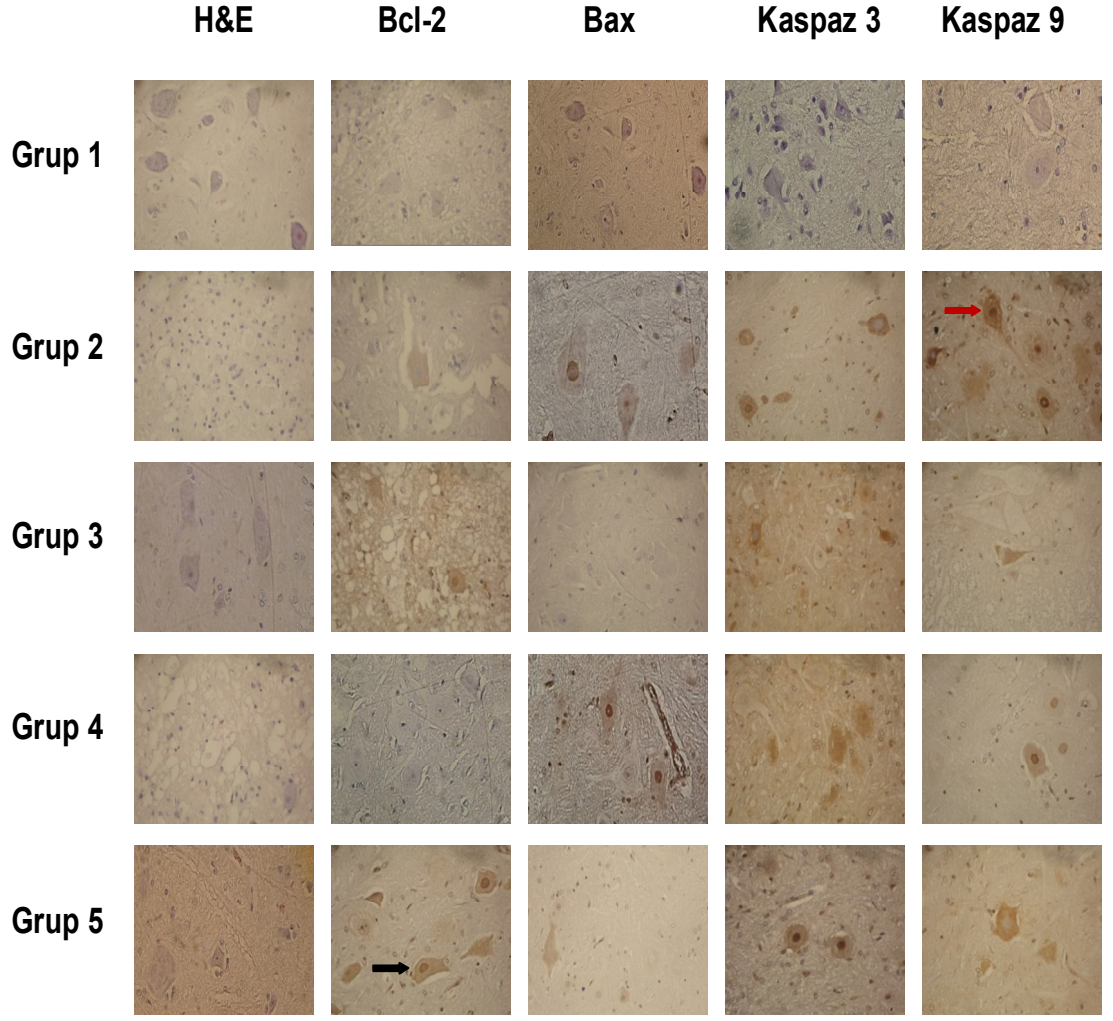


Şekil-3 : Grupların immünohistokimyasal skora sonuçları

* Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık mevcuttu ($p < 0.05$) (Kruskal Wallis testi kullanılmıştır).

** Grup 1, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$) (Mann Whitney U testi kullanılmıştır).

*** Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı farklılık saptandı ($p < 0.05$) (Mann Whitney U testi kullanılmıştır).



Şekil-4: Grupların immünohistokimyasal incelemeleri. Bcl-2 immunoekspresyonu (nüklear ve sitoplazmik boyanma (→)) Grup 5' de diğer gruplara göre artmış olarak görüldü. Grup 2 'de kaspaz 9 ekspresyonu (sitoplazmik boyanma (→)) açısından diğer gruplara göre anlamlı farklılık izlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Geçici iskemik olaylarda iki ayrı patofizyolojik olay infarktın gelişmesine katkıda bulunur: iskemik evrede doku hasarının başlaması, reperfüzyon evresinde ise doku hasarının gerilemesi veya artması (reperfüzyon travması). Reperfüzyon evresinde oluşan serbest radikallerin iskemi sonrası oluşacak hasarda etkin rol oynadığı birçok çalışmada gösterilmiştir (24, 25, 50-55). Zhao ve ark. (34) 2003 yılında, iskemiye takiben reperfüzyonun erken döneminde kan akımının kısa ve aralıklı olarak kesintiye uğramasını ardkoşullama olarak tanımlamışlar ve 60 dakikalık iskemiye takiben reperfüze edilen köpek kalbinde reperfüzyonun 30 saniyelik periyotlarla 3 kez kesintiye uğratılarak ardkoşullama uygulamasının infarkt boyutunu iskemik önkoşullamada olduğu gibi (%47'den %11'e) azalttığını göstermişlerdir.

Deneysel çalışmalar iskemik ardkoşullamanın nöron koruyucu etki gösterdiğini de ortaya çıkarmıştır (35, 36, 56). Burda ve ark. (56) iskemi sonrası artmış endojen antioksidan enzim aktivitesinin hipokampüsün CA1 bölgesindeki nöronları gecikmiş nöronal ölümden korumaya yetmediğini buna karşılık 5 dakikalık iskeminin 48 saat sonra uygulanan 20 dakikalık iske miyle beraber bu nöronların %95'ini koruduğunu göstermişlerdir. Danielisova ve ark. (57) ardkoşullama ile iskemiden 48 saat sonra hipokampal CA1 nöronlarındaki hasarın geri döndürülebilir olduğunu göstermişlerdir. Zhao ve ark. (36), bilateral kommon karotid arter oklüzyonu uygulayarak yaptıkları çalışmalarında, iskemik ardkoşullamanın fokal serebral iskemi sonrası infarkt hacmini azalttığını saptamışlardır. Ardkoşullamanın penumbra da apoptozisi ve serbest radikal üretimi üzerine etki ederek iskemi sonrası infarkt hacmini azaltabileceğini de özellikle belirtmişlerdir. Çalışmalarında apoptozis için marker sayılan ve DNA fragmantasyonunu gösteren TUNEL yöntemiyle süperoksid radikallerini göstererek ardkoşullamanın koruyucu etki gösterdiğini fakat bu koruyucu etkinin mekanizmalarının ortaya konulabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir (36). Taşkapılıoğlu ve ark. (35) önkoşullama, ardkoşullama ve ön/ardkoşullamaların ayrı ayrı

veya birlikte uygulanmalarının infarkt hacmini belirgin azalttığını göstermişlerdir.

İskemik ardkoşullamanın nöron koruyucu etki mekanizması ile kardioprotektif etki mekanizmasının benzer olduğu düşünülmektedir (58). Nötrofil toplanmasını ve endotel disfonksiyonunu azaltarak, oksidatif stresi engelleyerek, mitokondriyal permeabiliteyi azaltarak, apoptotik hücre ölümünü azaltarak ve fosfatidilinositol 3-kinaz aktivasyon yolunu aktive ederek reperfüzyon hasarına karşı nöron koruyucu etkileri olduğu öne sürülmüştür (58).

İskemik ardkoşullamanın nöron koruyucu etkileri serebral iskemi modellerinde gösterilmesine rağmen literatürde spinal kord iskemisinde etkileri ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Jiang ve ark. (12, 14) iskemik ardkoşullamanın spinal kord iskemisinde etkilerini inceledikleri çalışmalarında ardkoşullamanın nörolojik hasarı azalttığını ve iskemi sonrasındaki ilk birkaç dakikalık reperfüzyon hasarında kritik rol oynadığını göstermişlerdir. Huang ve ark. (13) spinal kord iskemisinde uygulanan iskemik ardkoşullamanın reperfüzyon sonrası serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azalttığını göstermişlerdir. İskemik önkoşullama ile karşılaştırıldığında ardkoşullamanın spinal korda alfa motor nöronların proteksiyonunda ve nörolojik muayene bulgularında iyileşme etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu da belirtmişlerdir. Ardkoşullamanın spinal kord iskemisindeki koruyucu etkilerinin patofizyolojisi ise henüz aydınlatılamamıştır.

Çalışmamızda, deneysel spinal kord iskemisi oluşturulan sıçanlarda ardkoşullamanın apoptotik süreç üzerine etkileri incelendi. Sıçanlarda spinal kord iskemisi, Kocaeli ve ark. (15) tarafından Le May ve ark.'nın (60) uygulamış olduğu modelden modifiye edilen iskemi modeli kullanılarak oluşturuldu. Yapılan denemelerde sol OKA proksimaline AA'ya ve aynı anda sol SA'e toplam 17 dakika süreyle klip uygulandığında total parapleji elde edilebildi. Çalışmamızda mortalite oranı %16.6 olarak saptandı. Kullandığımız spinal kord iskemi modeli, insanlarda uygulanan desandan torasik ve torakoabdominal aorta cerrahisi esnasındaki operatif duruma en yakın modeldir.

Kato ve ark. (41), 15 dakika süreyle desendan aortada 2F Fogarty kateteri ile eş zamanlı olarak sol femoral arterden kontrollü kanama ile volüm azaltılması yoluyla spinal kord iskemisi oluşturdukları çalışmalarında iskemiye takiben ilk 6 saat içerisinde gri cevherde nekroz ve 48 saat sonra ise periferik gri cevher dorsal boynuzlarındaki hücre ölümünü apoptotik markerler aracılığıyla göstermişlerdir. Yazarlar bu durumu spinal kordun periferininin daha iyi kolleteral kan akımına sahip olmasına bağlamışlardır. Hayasi ve ark. (40) ise spinal kord iskemisi uyguladıkları tavşanlarda apoptotik sürecin 7. güne kadar devam edebileceğini ancak ilk 2 günde daha şiddetli olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda iskemi uygulanan grupta gri cevherde nöronal büzülme, eozinofilik sitoplazma, vakuolizasyon, gliosis gibi dejenerasyona ait değişiklikler saptandı. Bu gruptaki tüm sıçanlarda %50 den fazla etkilenen iskemik alan mevcuttu (Grade 3). Ardkoşullama ve sitikolin uygulanan gruplarda (Grup 3, 4 ve 5) iskemik değişiklikler ön boynuz hücrelerinde ve gri beyaz cevher bileşkesinde tespit edildi ve skorlanan alanların %10-50 sini etkileyen nöronal hasar gözlemlendi (Grade 2). Sham grubu ile karşılaştırıldığında Grup 2, 3, 4 ve 5 de istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0.05$).

Çalışmamızda kullanılan model ile spinal kord iskemisinin oluşturulduğu histopatolojik olarak da gösterildi. Nöronal hasarlanma derecelendirmesinin ardkoşullama ve sitikolin uygulanan gruplarda iskemi grubuna göre daha düşük olarak saptanması nöron koruyucu etkinin lehine yorumlandı.

Çalışmamızda histopatolojik inceleme bulguları ile nörolojik muayene bulguları arasında da uyumluluk saptandı. Nörolojik skorlamada Grup 1 deki tüm sıçanların MSDI skoru 0 olarak saptanırken Grup 2, 3, 4 ve 5 ile karşılaştırıldığında skorlar arasında anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Grup 3, 4 ve 5 deki sıçanların hepsi postoperatif 0. saatte nörolojik olarak paraplejiçtiler ve MSDI skorları 6 idi. Postoperatif 1. saatten itibaren motor fonksiyonları klinik olarak iskemi grubuna göre (Grup 2) düzelmeye başladı. Ancak MSDI skorları karşılaştırıldığında deney grupları arasında anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$).

Çeşitli deneysel modellerde ardkoşullamanın uygulanma zaman aralıkları farklılıklar göstermektedir (12, 34, 59-61). Xing ve ark. (59) 30 saniyelik zaman aralığı ile 6 siklus boyunca orta serebral arter oklüzyonu ve reperfüzyonu uygulamışlar ve ardkoşullamanın apoptozisi inhibe ederek nöron koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Danielisova ve ark. (57) ise geç ardkoşullama uygulanmasını tarif etmiş ve iskemiden 48 saat sonra uygulanan ardkoşullamanın da nöron koruyucu etkili olduğunu göstermişlerdir. Jiang ve ark. (12) spinal kord iskemi modelinde 1 dakikalık zaman aralıkları ile ardkoşullama uygulamışlar ve iskemi sonrasındaki ilk birkaç dakikalık reperfüzyonun iskemik hasarlanmada kritik rol oynadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada iskemi sonrası 5 dakika reperfüzyonu takiben birer dakikalık 6 siklus boyunca uygulanan ardkoşullamanın spinal kord iskemisinde nöron koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda aynı şekilde ardkoşullama uygulanmıştır.

Gerek sitikolinin gerekse iskemik ardkoşullamanın tek başına uygulandığı çalışmalarda apoptotik süreci engelleyerek ve reperfüzyon hasarını azaltarak nöron koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (12-14, 35, 36, 44, 46-48). Çalışmamızda sitikolin ve iskemik ardkoşullama kombine edilerek uygulanmış ve apoptotik yolaktaki etkileri araştırılmıştır.

Sitikolinin serebral iskemideki nöron koruyucu etkileri birçok çalışma ile bildirilmiştir (44, 46-48, 62, 63). Adibhatla ve ark. (46, 62), sitikolinin, nöron koruyucu etkilerini yayınlamış ve Na^+/K^+ ATP az aktivitesini düzenlediği, fosfolipaz A_2 inhibisyonu yaparak serbest yağ asitlerinin salınmasını engellediğini öne sürmüştür. Kardiolipin ve sfingomyelin seviyelerini koruyarak fosfotidilkolin sentezini arttırdığını, glutatyon sentezini ve glutatyon redüktaz aktivitesini azalttığını bildirmiştir. Krupinski ve ark. (47) sitikolinin apoptozom oluşumu sırasında kaspaz 9' u bloke ederek kaspaz 3' ün aktivasyonunu engellediğini ve böylece antiapoptotik etki ile iskemide koruyucu rol oynadığını göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda farklı sitikolin dozu ve uygulamaları bulunmaktadır. Fiedorowicz ve ark. (63) hipoksik-iskemik ensefalopati uyguladıkları modellerinde sitikolinin (0.3-1.0 g/kg/gün, veya 0.6-2.0

mmol/kg/gün) doz aralığında ip olarak kullanılabileceğini bildirmişler ve 0.3 g/kg tek doz uygulanan sitikolinin kaspaz 3 aktivitesini ve Hsp70 ekspresyonunu azaltarak nöron koruyucu etki gösterdiğini göstermişlerdir. Adibhatla ve ark. (48) CDP-kolinin düşük ve yüksek dozda kullanımının serebral iskemideki koruyucu etkisini incelemiş ve CDP-kolin lipozomunun etkileriyle karşılaştırmıştır. Bu çalışmada CDP-kolin 0.18 g/kg, 0.1 g/kg ve 0.25 g/kg dozlarında intravenöz (iv) olarak kullanılmış ve serebral infarkt volümünde sırasıyla %26, %32 ve % 41 lik bir azalma saptanmıştır. CDP-kolinin 0.1-0.25 g/kg kullanılmasının orta derecede koruyucu olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada CDP-kolinin 0.5 g/kg dozunda ip ve iv kullanımının etkileri karşılaştırılmıştır. Kontrol grubuna göre infarkt alanında sırasıyla %50 ve %55 azalma saptanmıştır. 0.5 g/kg dozda uygulanan CDP-kolinin kuvvetli nöron koruyucu etkisi olduğu ve kullanım şekline göre (iv veya ip) protektif etkisinde farklılık olmadığı belirtilmiştir. CDP-kolin lipozomu kullanılan grupta infarkt alanında %62 lik bir azalma tespit edilmiş ve diğer gruplara göre daha fazla protektif etkisi olduğu belirtilmiştir. Hurtado ve ark. (44) serebral iskemi oluşturdukları sıçanlarda 0.5, 1.0 ve 2.0 g/kg dozunda sitikolin kullanmışlar ve serebral striatumda infarkt boyutunda istatistiksel olarak anlamlı küçülme tespit etmişlerdir. Serebral kortekste ise sadece 1.0 ve 2.0 g/kg dozunda sitikolin uygulanan grupta infarkt boyutunda istatistiksel olarak anlamlı küçülme elde etmişlerdir. Adibhatla ve Krupinski (46-48) çalışmalarında 0.5 g/kg dozunda ip olarak uygulamışlardır. Spinal kord travması oluşturulan modellerde 0.3-0.4 g/kg dozunda sitikolin uygulanan çalışmalar bildirilmiştir (45, 64). Çakır ve ark. (64) spinal kord travması uyguladıkları sıçanlarda 0.3 g/kg dozunda sitikolin kullanmışlar ve nörolojik muayene sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı düzelme saptadıklarını bildirmişlerdir. Spinal kord travmasında Yücel ve ark. (45) sıçanlarda spinal kord travması oluşturmuş ve metilprednisolon ile sitikolinin protektif etkilerini incelemişlerdir. 0.4 g/kg dozda uyguladıkları sitikolinin protektif etkili olduğunu ancak metilprednisolon kullanılan grupta ve kombine ilaç uygulanan grupta karşılaştırıldığında anlamlı fark göstermediğini bildirmişlerdir.

Literatürde sitikolinin spinal kord iskemisinde nöron koruyucu etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmadı. Çalışmamızda sitikolinin tek başına ve/veya ardkoşullama ile birlikte apoptozisi engelleyerek spinal kord iskemisinde koruyucu etki gösterdiği görüldü. Bu özelliği ile çalışmamız bu konuda literatürde yapılan ilk çalışmadır. Çalışmamızda spinal kord iskemisi uygulanan sıçanlara nöron koruyucu etkin doz olduğu literatürde belirtilen 600 mmol/kg sitikolin i.p. olarak tek doz şeklinde uygulandı.

Apoptozis sürecinde üç önemli faktör ana rol oynamaktadır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) proteindir (65). Bcl-2 / Bax ailesi proapoptotik ve antiapoptotik proteinler içeren apoptoziste düzenleyici rol oynayan bir protein ailesidir (47). Bcl-2 ailesi üyelerinin bir kısmı apoptozisi indüklerken Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s bir kısmı ise apoptozisi baskılar (37, 38, 65, 66). Bcl-2 mitokondri dış membranında bulunan integral bir membran proteindir ve iyon transportunu düzenler. Santral sinir sisteminde apoptotik hasarlanmaya karşı koruyucu rol oynadığı da bilinmektedir. Bax ise sitozolde bulunur. Hücrenin apoptotik bir uyarı alması durumunda mitokondri membranına bağlanarak sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktörün mitokondriden sitozole salınmasında rol oynar. Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri zarının iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve Apoptozis Inducing Factor (AIF) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçerler (37, 38). AIF doğrudan yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması apoptozise girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girdiğinin bir göstergesidir. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır (38, 66). Bcl-2 nin aşırı ekspresyonu sitokrom c salınması ve kaspaz 3 ün aktivasyonunu baskılar (66). Böylece antiapoptotik protein olarak görev yapar. Hücrenin programlı bir şekilde ölümü bu apoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır.

Mackey ve ark. (11) spinal kord iskemisinde iki şekilde nöronal ölüm olabileceğini bildirmiş ve bunları nekroz ve apoptozis olarak sıralamışlardır. İskemi sonrası 24. saatte gri cevher ön boynuzdaki lamina III ve IX da TUNEL yöntemi ve elektron mikroskopuyla %30-40 hücrede apoptozis bulguları olan nükleer kondansasyon, DNA fragmentasyonu ve DNA kümelenmesi saptamışlardır. Hayashi ve ark. (40) spinal kord iskemisi oluşturdukları tavşanlarda kaspaz 1, kaspaz 2 ve kaspaz 3 ekspresyonunda artma saptamışlar ve spinal motor nöronlardaki hücre ölümünün apoptotik sürecin aktivasyonu ile yakın ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Takagi ve ark. (67) spinal kord iskemisi oluşturulan sıçanlarda kaspaz 3 ve kaspaz 8 ekspresyonunun arttığını görmüşler ve apoptotik mekanizmaların spinal kord iskemisinde nöronal hasarlanmada önemli bir rolü olduğunu belirtmişlerdir. İskemik spinal kord hasarının tedavisinde spesifik kaspaz inhibitörlerinin kullanılmasının denenebileceği vurgulanmaktadır. Spinal iskeminin uygulandığı deneysel çalışmalarda ardkoşullamanın, nötrofil toplanmasının inhibe ederek ve endotel disfonksiyonunu azaltarak, oksidatif stresi engelleyerek, fosfatidilinositol 3-kinaz aktivasyon yolunu aktive ederek ve apoptotik hücre ölümünü azaltarak reperfüzyon hasarına karşı nöron koruyucu etkileri olduğu öne sürülmüştür (12-14).

Çalışmamızda iske mi uygulanan gruplar (Grup 2, Grup 3, Grup 4, Grup 5) sham grubu (Grup 1) ile karşılaştırıldığında kaspaz 3, kaspaz 9 ve bax seviyelerinde anlamlı düzeyde artış saptandı ($p<0.05$). Bu durum literatürdeki bilgilerle uyumlu olarak bulundu ve spinal kord iskemisindeki hücre ölümünde apoptozisin etkili olduğunu gösterdi (11, 40, 67). Çalışmamızda, proapoptotik protein olan kaspaz 3 ve kaspaz 9 un ekspresyonunda, ardkoşullama ve sitikolin gruplarında iske mi grubuna göre anlamlı düzeyde azalma saptandı. Ayrıca antiapoptotik protein olan bcl-2 nin ekspresyonunda, ardkoşullama ve sitikolinin beraber uygulandığı grup 5 de diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Spinal kord iskemisinde sitikolinin ardkoşullama ile kombine edilmesi apoptotik süreçte kaspaz yolağını inhibe ederek ve antiapoptotik proteinleri artırarak nöronal koruma sağladığı sonucuna varıldı.

İskemik ardkoşullama; strok, karotid endarterektomi, torakoabdominal cerrahi, serebral anevrizma cerrahisi, embolizasyon gibi iskeminin gelişebileceği öngörülen tüm klinik durumlarda emniyetle kullanılabilir. Ma ve ark. (68) primer koroner anjioplasti uyguladıkları akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarında 3 siklus boyunca 30 saniyelik ardkoşullama uygulamış ve CK (kreatin kinaz) ve CK-MB (kreatin kinaz miyokardiyal band) seviyelerinde anlamlı düşme olduğunu saptamışlardır. Luo ve ark. (69) fallot tetralojisi tanısıyla opere ettikleri 24 hastada ardkoşullama uygulamış, ilk 24 saatte inotropik destek tedavisi ihtiyacının anlamlı derecede azaldığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada troponin-I seviyelerinde %50 ve CK-MB seviyelerinde %34 azalma saptanmıştır.

Çalışmamızda, spinal kord iskemisinde oluşacak hasarın hem ardkoşullamanın hem de sitikolinin nöron koruyucu etkilerinden yararlanılarak azaltılabileceği gösterildi. Sonuçlarımıza göre spinal kordun iskemik hasarına neden olabilecek klinik durumlarda ardkoşullama ve/veya sitikolin uygulanmasının tedavi etkilerini güçlendirerek nöronal ölümü engelleyebileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Mauney MC, Blackbourne LH, Langenburg SE, Buchanan SA, Kron IL, Tribble CG. Prevention of spinal cord injury after repair of the thoracic or thoracoabdominal aorta. *Ann Thorac Surg* 1995; 59: 245-52.
2. Coselli JS, Le Maire SA, Miller CC, et al. Mortality and paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a risk factor analysis. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:409-14.
3. Kuniyoshi Y, Koja K, Miyagi K, et al. Prevention of postoperative paraplegia during thoracoabdominal aortic surgery. *Ann Thorac Surg* 2003; 76:1477-84.
4. Safi HJ, Miller CC, Huynh TT, et al. Distal aortic perfusion and cerebrospinal fluid drainage for thoracoabdominal and descending thoracic aortic repair: ten years of organ protection. *Ann Surg* 2003; 238:372-80.
5. Yamauchi T, Takano H, Nishimura M, Matsumiya G, Sawa Y. Paraplegia and paraparesis after descending thoracic aortic aneurysm repair: a risk factor analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 12:179-83.
6. Bonser RS, Wong CH, Harrington D, et al. Failure of retrograde cerebral perfusion to attenuate metabolic changes associated with hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123:943-50.
7. Crawford ES, Svensson LG, Hess KR. A prospective randomized study of cerebrospinal fluid drainage to prevent paraplegia after high-risk surgery on the thoracoabdominal aorta. *J Vasc Surg* 1990; 13:36-46.
8. Cambria RP, Davison JK, Zannetti S, et al. Clinical experience with epidural cooling for spinal cord protection during thoracic and thoracoabdominal aneurysm repair. *J Vasc Surg* 1997; 25:234– 41.
9. Lang-Lazdunski L, Matsushita K, Hirt L, Waeber C, Vonsattel JPG, Moskowitz MA: Spinal cord ischemia. Development of a model in the mouse. *Stroke* 2000; 31:208-13.
10. Kanellopoulos GK, Kato H, Hsu CY, Kouchoukos NT. Spinal cord ischemic injury. Development of a new model in the rat. *Stroke* 1997; 28:2532-8.
11. Mackey ME, Wu Y, Hu R, et al. Cell death suggestive of apoptosis after spinal cord ischemia in rabbits. *Stroke* 1997; 28:2012-7.
12. Jiang X, Shi E, Nakajima Y, Sato S. Postconditioning, a series of brief interruptions of early reperfusion, prevents neurologic injury after spinal cord ischemia. *Ann Surg* 2006; 244:148-53.
13. Huang H, Zhang L, Wang Y. Effect of ischemic post-conditioning on spinal cord ischemic-reperfusion injury in rabbits. *Can J Anesth* 2007; 54:42-8.

14. Jiang X, Shi E, Li L. Co-application of ischemic preconditioning and postconditioning provides additive neuroprotection against spinal cord ischemia in rabbits. *Life Sciences* 2008; 82:608-14.
15. Kocaeli H, Korfali E, Öztürk H, Kahveci N, Yilmazlar S. MK-801 improves neurological and histological outcomes after spinal cord ischemia induced by transient aortic cross-clipping in rats. *Surg Neurol* 2005; 64:22-7.
16. Murdoch J, Hall R. Brain protection: Physiological and pharmacological considerations. Part I: The physiology of brain injury. *Can J Anaesth* 1990; 37:663-71.
17. Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrova J: Glutamate, Calcium, and Free Radicals as Mediators of Ischemic Brain Damage. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:1316-20.
18. Pottorf JW, Johanns MT, Derrington MS, Strehler EE, Enyedi A, Thayer SA. Glutamate-induced protease-mediated loss of plasma membrane Ca^{++} pump activity in rat hippocampal neurons. *J Neurochem* 2006; 98:1646-56.
19. Nicotera P. Molecular switches deciding the death of injured neurons. *Toxo Scien* 2003; 74: 4-9.
20. Augustine GJ, Santamaria F, Tanaka K. Local Calcium Signaling in Neurons. *Neuron* 2003; 40:331-46.
21. Bano D, Nicotera P. Ca^{++} signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 2007; 38:674-6.
22. Robbins SL. Cellular injury and celular death. In: Robbins SL, ed. *Pathologic Basis of Disease*. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1994; 1-34.
23. Xiong ZG, Zhu MX, Chu XP, Minami M, Hey J, Wei WL. Neuroprotection in Ischemia: Blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels. *Cell* 2004; 118:687-98.
24. Adibhatla RM, Hatcher JF. Phospholipase A_2 , reactive oxygen species and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006; 40:376-87.
25. Saito A, Maier CM, Narasimhan P, Nishi T, Song YS, Yu F Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Molec Neurobiol* 2005; 31:105-16.
26. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:1283-96.
27. Gidday JM. Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7:437-48.
28. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124.
29. Miao B, Yin XH, Pei DS, Zhang QG, Zhang Y. Neuroprotective effects of preconditioning ischemia on ischemic brain injury through down-regulating activation of JNK1/2 via N-Methyl-D-aspartate receptor-mediated Akt1 activation. *J Biol Chem* 2005; 280:21693-9.
30. Peralta C, Perales JC, Bartrons R, et al. The combination of ischemic preconditioning and liver Bcl-2 overexpression is a suitable strategy to

- prevent liver and lung damage after hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 2002; 160:2111-22.
31. Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A1 and A3 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278:380-7.
 32. Koti RS, Seifalian AM, Davidson BR. Protection of the liver by ischemic preconditioning: A review of mechanisms and clinical applications. *Dig Surg* 2003; 20:383-96.
 33. Pasupathy S, Homer-Vanniasinkam S. Surgical implications of ischemic preconditioning. *Arch Surg* 2005; 140:405-40.
 34. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: 579-88.
 35. Taskapılıoğlu MÖ, Alkan T, Goren B, et al. Neuronal protective effects of focal ischemic pre- and/or postconditioning on the model of transient focal cerebral ischemia in rats. *J Clin Neurosci* 2008; 1010-6.
 36. Zhao H, Sapolsky RM, Steinberg GK. Interrupting reperfusion as a stroke therapy: ischemic postconditioning reduces infarct size after focal ischemia in rat. *J Cerebral Blood Flow Metab* 2006; 26:1114-22.
 37. Guimaraes CA, Linden R. Programmed cell death; apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004; 271:1638-50.
 38. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88:355-65.
 39. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi* 2001; 2:91-9.
 40. Hayashi T, Sakurai M, Abe K, Sadahiro M, Tabayashi K, Itoyama Y. Apoptosis of motor neurons with induction of caspases in the spinal cord after ischemia. *Stroke* 1998; 29:1007-13.
 41. Kato H, Kanellopoulos GK, Matsuo S, et al. Neuronal apoptosis and necrosis following spinal cord ischemia in the rat. *Exp Neurol* 1997; 148:464-74.
 42. Lang-Lazdunski L, Heurteaux C, Mignon A, et al. Ischemic spinal cord injury induced by aortic cross-clamping: prevention by riluzole. *EJCTS* 2000; 18:174-81.
 43. Ulus İH, Watkins CJ, Cansev M. Cytidine and uridine increase striatal CDP-Choline levels without decreasing acetylcholine synthesis or release. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26:563-77.
 44. Hurtado O, Moro MA, Cardenas A. Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 2005; 18:336-45.
 45. Yücel N, Caylı SR, Ateş O. Evaluation of the neuroprotective effects of citicoline after experimental spinal cord injury: Improved behavioral and neuroanatomical recovery. *Neurochem Res* 2006; 31:767-75.
 46. Adibhatla RM, Hatcher JF, Larsen EC, Chen X, Sun D, Tsao FHC. CDP-choline significantly restores phosphatidylcholine levels by differentially affecting phospholipase A₂ and CTP: Phosphocholine cytidyltransferase after stroke. *J Biol Chem* 2006; 281:6718-25.

47. Krupinski J, Ferrer I, Barrachina M, Secades JJ, Mercadal J, Lozano R. CDP-choline reduces pro-caspase and cleaved caspase-3 expression, nuclear DNA fragmentation, and specific PARP-cleaved products of caspase activation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurophar* 2002; 42:846-54.
48. Adibhatla RM, Hatcher JF, Tureyen K. CDP-choline liposomes provide significant reduction in infarction over free CDP-choline in stroke. *Brain Res* 2005; 5:193-7.
49. Taira Y, Marsala M. Effect of proximal arterial perfusion pressure on function, spinal cord blood flow, and histopathological changes after increasing intervals of aortic occlusion in the rat. *Stroke* 1996; 27:1850-8.
50. Aronowski J, Strong R, Grotta JC. Reperfusion injury: Demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:1048-56.
51. Watson DB, Prado R, Veloso A, Brunschwig J-P, Dietrich WD. Cerebral blood flow restoration and reperfusion injury after ultraviolet laser-facilitated middle cerebral artery recanalization in rat Thrombotic Stroke. *Stroke* 2002; 33:428-34.
52. Hermann DM, Matter CM. Tissue plasminogen activator-induced reperfusion injury after stroke revisited. *Circulation* 2007; 116:363-5.
53. Aronowski J, Labiche LA. Perspectives on reperfusion-induced damage in rodent models of experimental focal ischemia and role of protein kinase C. *ILAR* 2003; 44:105-9.
54. Takamatsu H, Tsukada H, Kakiuchi T, Nishiyama S, Noda A, Umemura K. Detection of reperfusion injury using PET in a monkey model of cerebral ischemia. *J Nuc Med* 2000; 41:1409-16.
55. Chamoun F, Burne M, O'Donnell M, Rabb H. Pathophysiologic role of selectins and their ligands in ischemia reperfusion injury. *Front Biosci* 2000; 5:103-9.
56. Burda J, Matiasova M, Gottlieb M. Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region. *Neurochem Res* 2005; 30:1397-405.
57. Danielisova V, Nemethova M, Gottlieb M, Burda J. Changes of endogenous antioxidant enzymes during ischemic tolerance acquisition. *Neurochem Res* 2005; 30:559-65.
58. Zhao H. The protective effect of ischemic postconditioning against ischemic injury: from the heart to the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2008; 2:313-8.
59. Xing B, Chen H, Zhang M, Zhao D, Jiang R, Lui X, Zhang S. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after focal cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Stroke* 2008; 39:2362-9.
60. Le May DR, Neal S, Neal S, Zelenock GD, D'Alecy LG. Paraplegia in the rat induced by aortic cross-clamping: model characterization and glucose exacerbation of neurologic deficit. *J Vasc Surg* 1987; 6:383-90.
61. Tsang A, Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Postconditioning: a form of "modified reperfusion" protects the myocardium by activating

the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Circulation Research* 2004; 95: 230-2.

62. Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Citicoline : neuroprotective mechanism in cerebral ischemia. *J Neurochem* 2002; 80:12-23.
63. Fiedorowicz M, Makarewicz D, Mrozek KI, Grieb P. CDP-choline (citicoline) attenuates brain damage in a rat model of birth asphyxia. *Acta Neurobiol Exp* 2008; 68:389-97.
64. Cakir E, Usul H, Peksoylu P, et al. Effects of citicoline on experimental spinal cord injury. *J Clin Neurosci* 2005; 12(8): 923-26
65. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27:267-82.
66. Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *J Neurochem* 2003; 85:1026-36.
67. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir* 2003; 43:20-30.
68. Ma X, Zhang X, Li C, Wang T, Ge Y. Effect of postconditioning of coronal blood flow velocity and endothelial function in patients with acute myocardial infarction. *Scand Cardiovasc J* 2006; 40:327-33.
69. Luo W, Li B, Lin G, Huang R. Postconditioning in cardiac surgery for tetralogy of fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133:1373-4.

TEŞEKKÜR

Tez çalıŐmalarım sırasında bana her tŸrlŸ desteği veren Prof. Dr. E.Korfalı'ya, nŸropatolojik değerlendirmeler sırasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Ő. Tolunay ve Uzm. Dr. Eylem Akar'a, deneylerin yapım ve yazım aşamasında beni sŸrekli cesaretlendiren ve tecrŸbelerini paylaŐan Doç. Dr. T. Alkan ve Uzm. Dr. B. GŸren'e, deneysel aŐamalarımın gerçekleŐmesinde zamanımın bŸyŸk kısmını geçirdiğim Fizyoloji bŸlŸmŸnŸ evim gibi hissetmeme olanak sağlayan tŸm Fizyoloji Anabilim Dalı çalıŐanlarına, her zaman desteğini hissettiğim Yrd. Doç. Dr. H.Kocaeli'ne teŐekkŸr ederim.

ÖZGEÇMİŞ

9 Eylül 1978 Bursa doğumluyum. İlk ve ortaöğretimimi Atatürk İlköğretim Okulu'nda ve lise tahsilimi Kocaeli Körfez Fen Lisesi'nde tamamladıktan sonra 1995 yılında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne girdim. 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım.