

# DeneySEL Omurilik Yaralanmasında Gabapentinin Nöroprotektif Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Gündüz Kadir İSTAN<sup>1</sup>, Zübeyde ERBAYRAKTAR<sup>2</sup>, Necati GÖKMEN<sup>3</sup>,  
Alper BAĞRIYANIK<sup>4</sup>, Müge KIRAY<sup>5</sup>, Serhat Reşat ERBAYRAKTAR<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Balikesir Devlet Hastanesi Nöroşirürji Kliniği, Balikesir

<sup>2</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

<sup>3</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, İzmir

<sup>4</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>5</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İzmir

<sup>6</sup>Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı, İzmir

**Amaç:** DeneySEL omurilik yaralanması modelinde gabapentinin nöroprotektif etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Normal motor aktiviteye sahip 24 adet Wistar albino dişi rat, dört gruba ayrıldı. Otuz beş mg/kg ketamin 5 mg/kg ksilazin verilerek anestezi sağlandı. Birinci gruba (sham, n=3) yalnızca laminektomi, ikinci grup (kontrol, n=7)'a laminektomi ve travma, üçüncü gruba (ilaç, n=7) laminektomi ve travmadan 2 saat sonra gabapentin (150 mg/kg, IV), dördüncü gruba (ilaç, n=7) laminektomi ve gabapentini (150 mg/kg, IV) izleyen 5 dk. sonra travma uygulandı. Standart travma için, Yaşargil anevrizma klipi kullanıldı. Cerrahi sonrasında tüm gruplara 1., 10., 20. ve 30. günlerde nörodavranışsal testler uygulandı. Gruplardaki tüm ratlar 30. gün sonunda sakrifiye edildi, travma alanından alınan doku örnekleri hematoksilin & eosin, Tunel ve Kaspaz-3 ile boyanarak histolojik olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Nörodavranışsal testler ile histolojik değerlendirmelerin sonuçları karşılaştırıldığında, gabapentin uygulanan gruplardaki iyileşmenin diğer gruplara göre anlamlı olarak etkin olduğu görüldü. Üçüncü grup ile dördüncü grup karşılaştırıldığında ise dördüncü gruptaki iyileşmenin anlamlı olarak daha etkin olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Spinal kord travması oluşturulan ratlarda gabapentin uygulamasının, nörodavranışsal ve histopatolojik olarak iyileşmeyi artırdığı saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Spinal kord yaralanması, nöroprotektif etki, gabapentin

*J Nervous Sys Surgery 2014; 4(4):169-184*

## Evaluation of Neuroprotective Efficacy of Gabapentin in Experimental Spinal Cord Injury

**Objective:** We aimed to investigate the neuroprotective efficacy of gabapentin in experimental spinal cord injury.

**Material and Method:** Twenty-four Wistar albino female rats with normal motor activity were studied in four groups. They were anesthetized with 35 mg/kg ketamine plus 5 mg/kg xylazine. Laminectomy alone was performed in the first group (sham, n=3) while laminectomy was performed together with induction of injury in the second group (control, n=7). In the third group (drug, n=7), gabapentin (150 mg/kg, IV) was administered 2 hours after the onset of injury. In the fourth group (drug, n=7), gabapentin (150 mg/kg, IV) was used 5 minutes before the induction of injury. Spinal cord injury was performed by applying Yaşargil aneurysm clip. Neurobehavioral tests were done in all groups at days 1, 10, 20, and 30. All rats were sacrificed at day 30 and tissue samples from the injury site were investigated histologically with the usage of hematoxylin&eosin and anticaspace-3 dyes.

**Results:** According to the results of the neurobehavioral tests and histological evaluations, recovery in gabapentin administered groups was significantly better when compared with the others Also, results of the fourth group was significantly better than those of the third.

**Conclusion:** Administration of gabapentin was found to improve neurobehavioral and histological recovery from spinal cord injury in rats.

**Key words:** Spinal cord injury, neuroprotective effect, gabapentin

*J Nervous Sys Surgery 2014; 4(4):169-184*

**Alındığı tarih:** 19.08.2015

**Kabul tarihi:** 28.08.2015

**Yazışma adresi:** Uzm. Dr. Gündüz Kadir İstan, Bahçelievler Mah. 100. Yıl Teknik Lise Cad. No: 50 D: 11 Altiyünlü / Balikesir

**e-mail:** dr.gunduz.istan@gmail.com

**A**kut omurilik yaralanması; modern toplumu fiziksel, psikososyal ve ekonomik açıdan derinden etkileyen, ciddi ve harap edici bir nörolojik sorun olması ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün bulunmaması nedeniyle günümüzün en önemli sağlık sorunlarındanıdır<sup>(10,26)</sup>. Her yıl ABD’de ortalama 10000-15000 akut medulla spinalis yaralanmasına maruz kalan yeni olgu bildirilmekte, 4000 olgu hastaneye yetiştirilemeden ölürken, 1000 olgu hastane izlemi sırasında kaybedilmektedir. Çoğu ülkede insidansın 20-40/1000.000 arasında değiştiği ve bu olguların yaş ortalamasının 16-30 olduğu görülmektedir<sup>(20,21,36)</sup>. Olguların % 64-80’i erkektir ve yaklaşık yarısı nörolojik açıdan komplet hasara sahiptir. Komplet hasarın %54’ü kuadripleji ve %46’sı parapleji şeklindedir. Bu olguların hastanede kalış süreleri ve rehabilitasyonları uzun sürelidir ve yineleyicidir. Tedavi sonrası yaşam kalitesi, sosyal ve ekonomik yaşama dönüş ise düşük sınırlardadır<sup>(34,37)</sup>. Bu hastaların yaşam boyu süren tedavi ve bakım giderleri, işgücü ve gelir kayıpları ile yaşadıkları sosyal ve psikolojik sorunlar gözönüne getirildiğinde hastayı, ailesini ve ülke ekonomisini etkileyen ciddi bir sağlık sorunu ile karşılaşılacaktır<sup>(42)</sup>. Bu durum, yaralanmanın toplum üzerinde yarattığı travmanın büyüklüğü hakkında bilgi vermektedir.

Travmatik medulla spinalis yaralanmalarının en yaygın nedenleri sıklık sırasına göre; motorlu araç kazaları (yaklaşık %50), düşmeler, ateşli silah yaralanmaları veya kesici-delici aletlerle oluşmuş penetran yaralanmalar ve spor kazalarıdır. En sık servikal bölge ve dorsolomber bileşke bölgesindeki spinal kord etkilenmektedir<sup>(1,7,8,34)</sup>.

Yaralanma sonrasındaki ilk birkaç gün içerisinde, omurilikte oluşan lezyonun patolojik görüntüsündeki dramatik değişiklikler, klinik ve deneysel gözlemlerin en önemli noktasını oluşturmaktadır<sup>(6)</sup>. Bununla bağlantılı olarak, omu-

rilik yaralanmasının patofizyolojisinde oluşan hasarın primer ve sekonder mekanizmalarla olabileceği düşüncesini desteklemektedir. Bunlar; birincil mekanik hasar ve bunun tarafından tetiklenerek oluşan ve birçok etkenin rol oynadığı sekonder hasarlanmalardır<sup>(35)</sup>. Omurilik hasarının akut safhasındaki tedavi çalışmalarının büyük çoğunluğu sekonder nörotoksik oluşumları engellemeyi ya da bu sürecin ilerlemesini durdurabilmeyi amaçlar<sup>(12,29,44)</sup>.

Hâlen akut omurilik yaralanmasının tedavisi üzerine yapılan araştırma çabaları, çağdaş tedavi yaklaşımlarına değerli katkılarda bulunmaktadır, fakat kalıcı ve anlamlı derecede etkili ve aynı zamanda evrensel bir tedavi protokolü geliştirilebilmiş değildir<sup>(27,35)</sup>.

Gabapentin, gama amino bütirik asit (GABA) analogu olan antikonvülzan, nöropatik ağrı tedavisinde efektif bir analjezik olarak kullanılan bir farmakolojik ajandır<sup>(19)</sup>. Spastisite tedavisinde spinal refleksleri azaltmak ve nöbet modellerinde, nöbet eşliğini arttırmak amacıyla kullanıma girmiştir. Deneysel ağrı modellerinde antinosiseptif etkinliği gösterilmiştir. Parsiyel nöbet ve nöropatik ağrı tedavisinde klinik kullanımı mevcuttur<sup>(27,19)</sup>. Deneysel olarak diabet oluşturulan ratlarda ortaya çıkan glial ve nöronal hasar tedavisi için gabapentin verilen bir çalışmada; kontrol grubu ile gabapentin 50 mg/kg verilen grup karşılaştırıldığında, gabapentin grubunda nörodejenerasyonun belirgin düzeyde azaldığı bildirilmiştir<sup>(4)</sup>. Deneysel serebral iskemi modellerinde yapılan bir çalışmada ise, 150-200 mg/kg kullanım ile gabapentinin nöroprotektif etkinliği olduğu gösterilmiştir<sup>(5)</sup>.

Bu çalışmada; deneysel omurilik yaralanması modelinde travma öncesi ve travma sonrası 150 mg/kg gabapentin uygulanmasının nöroprotektif etkinliği, histopatolojik ve nörodavranışsal olarak değerlendirilmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulundan onay alındıktan sonra, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

### 1. Kullanılan deneklerin bakım yeri ve koşulları

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında yetiştirilen, ağırlıkları 210-250 g arasında değişen, normal motor aktiviteye sahip, 24 adet Wistar Albino türü dişi rat çalışmaya alınmıştır. Ratlar, standart laboratuvar koşullarında 12 saat gece ve 12 saat gündüz olacak şekildeki düzenekte ad libitum olarak beslenerek izlenmiştir.

### 2. Kullanılan farmakolojik ajanlar

Ketamin (Ketalar, Parke-Davis, Eczacıbaşı, İstanbul)  
Ksilazin (Rompun, Bayer, İstanbul)  
Gabapentin (Biofarma, İstanbul)  
Polyvidon iyot (Batticon, Adeka, Samsun)  
Sefazolin Sodyum (Sefazol, Mustafa-Nevzat, İstanbul)

### 3. Anestezi

Cerrahi işlem öncesi tüm gruptaki ratlara intraperitoneal olarak 35 mg ketamin + 5 mg ksilazin uygulanarak anestezi sağlanmıştır.

### 4. Deneysel grupları

Çalışma, her grupta 7 adet rat bulunan 3 çalışma grubu ve 3 adet rat bulunan bir sham grubu olarak planlanmıştır:

*Grup 1 (sham):* Yalnızca laminektomi

*Grup 2 (kontrol):* Laminektomi ve travma uygulanan grup

*Grup 3 (ilaç):* Laminektomi ve travma uygulanmasından 2 saat sonra gabapentin 150 mg/kg intravenöz uygulanan grup

*Grup 4 (ilaç):* Laminektomi ve gabapentin 150 mg/kg intravenöz uygulanmasını izleyen, 5 dk. sonra travma uygulanan grup

### 5. Cerrahi işlem

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Multidisipliner Deneysel Araştırma Laboratuvarı operasyon salonunda, steril şartlarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem öncesi tüm hayvanlara intraperitoneal olarak 35 mg/kg ketamin, 5 mg/kg ksilazin uygulanarak anestezi sağlandı ve hepsi yüzüstü pozisyonda tespit edildi. Tüm hayvanların genel anestezi altında sırt bölgesi traş edildi. Polyvidon iyot ile lokal antisepsi sağlandı. İnterskapuler mesafe referans alınarak prone pozisyonda T5-12 seviyesinde orta hat insizyonu yapılarak cilt, ciltaltı dokuların geçilmesini takiben paravertebral kas fasyası açılarak kaslar laterale künt diseksiyon ile sıyrıldı ve torakal 7-10 laminaları görülerek total laminektomi uygulandı. Bu işlemler sırasında dura mater korundu. Grup 1'e laminektomi dışında işlem yapılmadı. Grup 2'deki ratlara laminektomi takiben ekstradural olarak 1 dk. süre ile klip uygulanarak travma uygulandı ve farmakoterapi verilmedi. Grup 3'teki ratlara laminektomi takiben ekstradural olarak 1 dk. süre ile klip uygulanarak travma oluşturuldu ve kuyruk veninden açılan damar yolu aracılığı ile travmadan 2 saat sonra gabapentin 150 mg/kg intravenöz olarak uygulandı. Daha sonra grup 4'teki ratlara kuyruk veninden 24 G nolu (Bıçakçılar/İstanbul/Türkiye) branül ile damar yolu açıldı ve travmadan 5 dk. önce gabapentin 150 mg/kg intravenöz olarak uygulandı. Ratlara laminektomi takiben ekstradural olarak 1 dk. süre ile klip uygulanarak travma uygulandı. Standart travma amacıyla 63 g'lık kuvvet uygu-

layan Yaşargil anevrizma klipi (Aesculap FE 721 K) ile dura ve spinal kordu çepeçevre saracak şekilde 1 dk. süreyle klipaj uygulandı. Daha sonra, hemostazı takiben kaslar ve cilt insizyon usulüne uygun olarak kapatıldı.

## 6. Deney hayvanlarının postoperatif izlemleri

Tüm denekler postoperatif dönemde, derlenme sürelerinin sonunda kafeslerine yerleştirildi ve serbestçe beslenmelerine izin verilerek, takip süreleri boyunca, günde iki kez manuel olarak mesaneleri boşaltıldı. Tüm ratlara cerrahi saha ve üriner enfeksiyondan korunmak amacı ile ilk üç gün intraperitoneal 40 mg/kg/gün sefazolin sodyum uygulandı. İzlem süresi boyunca ratların düzenli pansumanları yapıldı, sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez manuel idrar yaptırıldı.

## 7. Deney hayvanlarının sakrifikasyonu

Otuz günlük izlem sonrası ratların muayenele-ri yapıldı. Daha sonra, sakrifikasyon işlemi öncesi tüm hayvanlara eter ile inhalasyon anestezi uygulandı. Ratlar sırtüstü pozisyonda tespit edildi. Tüm hayvanların genel anestezi altında sırt bölgesi traş edildi. Polyvidon iyot ile lokal antisepsi sağlandı. Sternum referans alınarak cilt ve ciltaltı geçildi. Sternum sağ ve sol taraftan kostalardan üst sınırı kalacak şekilde serbestleştirildi. Kalbin sağ atriumuna 11 numara bistüri ile insizyon uygulandı. Sol ventrikülden % 0.9'luk serum fizyolojik ile dolaşımdaki tüm kan dolaşımından uzaklaştırılma kadar irrije edildi. Takiben %10'luk formaldehit ile yıkanarak fikse edildi. Hasarlanmış omurilik merkez olacak şekilde 1 cm yukarı ve 1 cm aşağı olmak üzere 2 cm kord disseke edildi. %10 formaldehit solusyonu içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalına teslim edildi.

## 8. Davranış testi ve fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi

Davranış testi ve fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi, "Inclined Plane Test" (IPT) ve Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) davranış derecelendirme skalası kullanılarak yapıldı<sup>(2,24)</sup>. Tüm değerlendirmeler, tedavi grupları hakkında bilgi sahibi olmayan aynı kişi tarafından yapılacak şekilde planlandı. Deney gruplarının davranış testi ve fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi, spinal travma sonrasında 1., 10., 20., 30. günlerde yapıldı ve skorlar kaydedildi.

### 8.1. Inclined Plane Testi (IPT)

Deneysel akut medulla spinalis yaralanmalarında sık kullanılan Rivliv ve Tator'un tanımladığı eğimli alan yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde, hayvan düz bir tabla üzerine konulur. Tabla ilk olarak yere paralelken daha sonra eğimi arttırılarak hayvanın besin ile motivasyonu sağlanarak tablanın üzerinde tırmanması sağlanır. Hayvanın tabla üzerinde 5 sn. boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı hayvanın "inclined plane açısı (İPA)" olarak kabul edilir. Çalışmamızda, tüm gruplardaki deneklere cerrahi işlem sonrası 1., 10., 20., 30. günlerde "Inclined Plane testi" uygulandı.

### 8.2. Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)

#### Skorlaması

Spinal kord yaralanması sonrası gelişen davranışsal sonuçları değerlendirmek için BBB skorlaması 1995'te Basso ve ark.<sup>(24)</sup> tarafından geliştirilmiştir. BBB skorlaması spinal kord yaralanması sonrası tedavilerde davranışsal sonuçların ölçümünde araştırmacılar tarafından sıklıkla yeğlenmektedir.

Bu skala çok merkezli hayvan spinal kord yaralanma çalışmalarında (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study- MASCIS) ve hâlen

nörotravma literatüründe yaygın olarak kullanılmaktadır<sup>(23)</sup>.

BBB skorlaması ile arka ayaklarda hiç hareket olmamasından (0 puan) tam vücut stabilitesi ve kuyruğun havada olmasına kadar (21 puan) çok geniş aralıklarda lökomotor hareket değerlendirilir<sup>(23)</sup>. Yirmi bir puanlı bu skalada 0 ile 7 puan arası ölçümler müdahale sonrası erken dönemde arka ayakların eklem hareketleri, 8 ile 13 puan arası ara dönemde adım atma ve koordinasyon, 14 ile 21 puan arası geç dönemde parmak temizleme hareketi ve pençe rotasyonu değerlendirilir. BBB skalası, veriler hakkında sürekli değil ara dönemlerde bilgi verir (Tablo 1).

Spinal kord yaralanmalarında, ön ve arka ayaklar arasındaki koordinasyonun değerlendirilmesinde BBB testi yetersiz kalıp, lökomotor fonksiyon

yanlış olarak daha düşük tahmin edilebilir<sup>(22)</sup>.

## 9. Histopatolojik değerlendirme

Alınan spinal kord doku örnekleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalında değerlendirilmeye alındı. Çıkartılan spinal kord örnekleri oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içinde 48 saat tespit edildikten sonra, artan oranda alkol serilerinden geçirildi. Dokular, şeffaflandırma amacıyla üç değişim ksilole tabi tutulduktan sonra parafin içine gömüldü.

### Parafin Takibi

1. Fiksasyon: 48 saat % 10 formalin
2. 24 saat akarsuda yıkama
3. % 70 etil alkol (20 dk.)
4. % 80 etil alkol (20 dk.)

Tablo 1. BBB davranış derecelendirme skalası.

#### I. İyileşmenin erken döneminde (Arka ekstremite hareketleri)

0. Gözlenebilen arka ekstremite (AE) hareketi yok
1. Bir veya iki eklemde hafif hareket (genelde diz ve/veya kalça)
2. Bir eklemde geniş hareket veya bir eklemde geniş hareket + diğer eklemde hafif hareket
3. İki eklemde geniş hareket
4. Üç eklemde hafif hareket (AE) (kalça, diz, ayak bileği)
5. İki eklemde hafif hareket+üçüncü eklemde geniş hareket
6. İki eklemde geniş hareket +üçüncü eklemde hafif hareket
7. Üç eklemde geniş hareket (AE)

#### II. İyileşmenin Orta Döneminde (Adım atma koordinasyonu)

8. Ağırlığını taşımadan sürünmek veya pençenin plantar yerleştirilmesi
9. Ağırlığını taşıyarak pençenin plantar yerleştirilmesi veya tek bir defa, ara sıra, sık sık, sürekli ağırliğini kaldırarak dorsal adımlama + plantar adımlama yok
10. Ara sıra ağırliğini taşıyarak plantar adımlama. Ön ekstremite (ÖE) arka ekstremite koordinasyonu yok
11. Sık sık, sürekli ağırliğini taşıyarak plantar adımlama ve ÖE, AE koordinasyonu yok
12. Sık sık, sürekli ağırliğini taşıyarak plantar adımlama ve ara sıra ÖE, AE koordinasyonu mevcut
13. Sürekli ağırliğini kaldırarak plantar adımlama ve sık sık ÖE, AE koordinasyonu

#### III. İyileşmenin Geç Döneminde (Ayrıntılar, ince hareketler)

14. Sürekli ağırliğini taşıyarak adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu veya hareket sırasında dominant pençe pozisyonunda yuvarlanma veya sık plantar adımlama, sürekli ÖE, AE koordinasyonu, arasıra dorsal adımlama
15. Sürekli ÖE, AE koordinasyonu, parmak temizleme hareketi yok veya ekstremitenin öne ilerletilmesi ile ara sıra parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta dominant pençe hareketi vücuda paralel
16. Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta dominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak
17. Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu, ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sık sık parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında dominant pençe hareketi paralel
18. Yürüyüş sırasında sürekli ÖE, AE koordinasyonu ve ekstremitenin öne ilerletilmesi ile sürekli parmak temizleme hareketi; ilk dokunuşta dominant pençe hareketi paralel ve kaldırıldığında yuvarlak
19. Yürüyüş ile sürekli koordineli ÖE, AE hareketi, ekstremitenin öne hareketi ile sürekli parmağı temizleme hareketi; ilk dokunuşta ve kaldırıldığında dominant pençe hareketi paralel
20. Sürekli koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme hareketi, ilk dokunuşta ve kaldırıldığında dominant pençe hareketi paralel fakat gövde instabilitesi var; kuyruk sürekli havada
21. Koordineli yürüyüş, sürekli parmak temizleme, dominant pençe pozisyonu paralel, sürekli gövde stabilitesi, kuyruk sürekli havada

5. % 96 etil alkol (20 dk.)
6. Aseton I (20 dk.)
7. Aseton II (20 dk.)
8. Aseton III (20 dk.)
9. Aseton IV (20 dk.)
10. Ksilol I (30 dk.)
11. Ksilol II (30 dk.)
12. 60°C'lik etüvde erimiş parafin I (1 saat)
13. Parafin II (1 saat)
14. Parafin içinde bloklama

Etüvden çıkarılan parçalar parafine gömülerek bloklandı. Mikrotom (Leica RM2255) yardımıyla bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara yerleştirildi. Her bloktan seri kesitler alındı. Kesitlere Hematoksilen&Eozin (H&E), TUNEL boyama ve Kaspaz-3 için immunohistokimya uygulandı. Hematoksilen-Eozin Boyası:

1. Ksilol I (20 dk.)
2. Ksilol II (10 dk.)
3. Ksilol II (10 dk.)
4. % 96 alkol (1 dk.)
5. %80 alkol (1 dk.)
6. %70 alkol (1 dk.)
7. Distile su (5 dk.)
8. Hematoksilen (10 dk.)
9. Akarsu (10 dk.)
10. Eozin (2 dk.)
11. %70 alkol (1 dk.)
12. %80 alkol (1 dk.)
13. %96 alkol (1 dk.)
14. Ksilol (3 değişim) (30-60 dk.)
15. Entellan ile kapama

### Histolojik Değerlendirme

Elde edilen preparatlardan ışık mikroskopik bakı ve lezyon alanı ölçümleri yapıldı. Spinal korddan alınan örneklemelerdeki anormallikler ve zararlanmalar histolojik skorlamaya göre belirlendi (Tablo 2).

**Tablo 2. Histopatolojik skorlama.**

0	Anormal hücre yok
1	Hemoraji Gliyal hücre reaksiyonu Bu değişikliklerin birkaç alanda gözlenmesi
2	Gri cevherde belirgin nekroz Büyük hemoraji veya yaygın demyelinizasyon Fibrozis ve inflamatuvar hücrelerin varlığı

### TUNEL Tekniği ile Boyama

Lezyon bölgesinden alınan kesitler dokudaki apoptotik hücreleri göstermek amacı ile TUNEL tekniği ile boyandı. Bu teknik için Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 3 değişim ksilen ile deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dk. bekletildi. Dokuya zarar vermeden kurulanıp pappen (Invitrogen, Camarillo, CA, 00-8877) ile çevreleri sınırlandı. Kesitler 15 dk. 20 µg/ml proteinase K ile enkübe edildikten sonra, distile su ile 5 dk. yıkandı. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Germany) uygulandıktan sonra 3 defa 5'er dk. fosfat tampon solüsyonu (Phosphate Buffered Saline Solution, DBS, Pleasanton, CA) ile yıkanan kesitler TdT-enzimi 37°C'de 1 saat enkübe edildi. Ardından tampon solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dk. yıkanan kesitler anti-streptavidin-peroksidaz ile 30 dk. enkübe edildi. Tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapılan kesitler %80 ve %96'luk alkollerde dehidratasyon ve 30'ar dk. 3 değişim ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

### İndirekt İmmünohistokimya Yöntemi

TUNEL tekniği ile belirlenen apoptozun destek-

lenmesi amacıyla, kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra immunohistokimyasal yöntemle boyandı. Kaspaz-3 immunreaktivitesinin gösterilmesi amacıyla rat spesifik antikaspaz-3 (1:50; Neomarkers, Fremont, CA) antikoru kullanıldı. Lizinli kesitler üç değişim ksilol ile deparafinizasyon işlemine tabi tutuldu. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dk. bekletildi. Proteinaz K solüsyonu içinde 37°C etüvde 15 dk. tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. %3'lük hidrojen peroksit uygulandı. Üç defa 5'er dk. fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler 1 saat oda ısısında blokama solüsyonu (İnvitrogen, Histostain-Plus Bulk Kit) ile enkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan anti-kaspaz-3 antikoru ile bir gece +4°C'de enkübe edildi. Ertesi gün fosfatlı tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biyotinlenmiş sekonder antikor (İnvitrogen- Plus Broad Spectrum) ile 30 dk. enkübe edildi. Sekonder antikor enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) (Histostain- Plus Broad Spectrum) ile bağlandıktan sonra antikor-biyotin-avidin-peroksidaz kompleksi %0.02 Diaminobenzidin (DAB) kullanılarak görünür hâle getirildi. Zemin boyaması Mayers hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ksilol ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

### Apopitotik hücre sayılarının belirlenmesi

İmmunohistokimyasal boyama işlemlerinin tamamlanmasının ardından hazırlanan preparatlar Olympus BX-51 model ışık mikroskobu ve video kameradan (Olympus DP71) oluşan görüntü analiz sistemi (DP Controller Olympus Corp. 3.1.1.267) aracılığıyla bilgisayar ekranında kaydedilerek değerlendirildi.

Medülla spinalise ait kesitlerde apopitoz oranını belirlemek için 40X objektif ile her kesitin gri

cevher bölgesinde on farklı alandaki hücreler sayılarak TUNEL-pozitif ve antikaspaz-3 pozitif hücre sayıları belirlendi. Apopitotik hücre oranı yüzde cinsinden hesaplandı ve gruplar arasındaki fark analiz edildi.

### 10. İstatistiksel yöntem

Tüm veriler ortalama±SH olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS 15.0 programında One-way ANOVA posthoc Bonferroni testi ve Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. p<0.05 anlamlılık düzeyi esas alındı.

### BULGULAR

Üç grupta 7 rat olmak üzere, sham grubunda 3 rat olmak üzere toplam 24 rat kullanıldı. Çalışmadan 5 rat kendi ayaklarını yemeleri nedeniyle çıkartıldı. Bu ratlar yerine yeni ratlar çalışmaya alındı.

### 1. Vücut ağırlıkları

Gruplardaki ratların ağırlıkları arasında anlamlı farklılık gözlenmedi (p>0.05) (Tablo 3). Ratların çalışma sırasındaki ağırlık ölçümlerinde %10'dan fazla ağırlık kaybı olmadı. Ağırlık kaybı nedeniyle çalışmadan çıkartılan rat olmadı.

Tablo 3. Ratların vücut ağırlıkları ortalamaları (ort±SS).

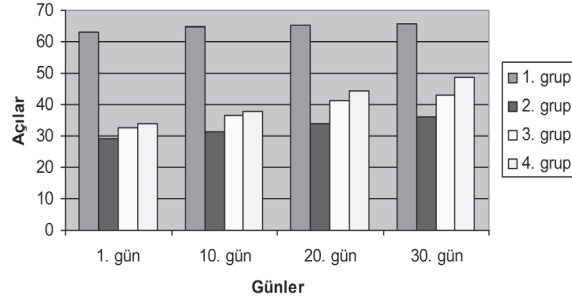
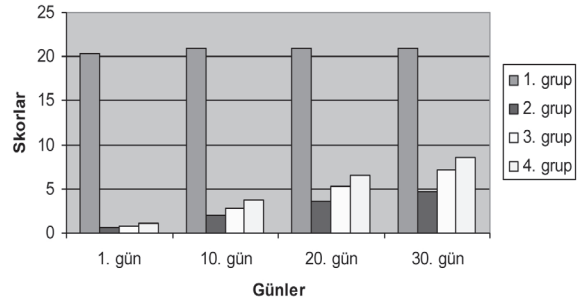
Grup 1	223.00±2.65
Grup 2	224.86±2.65
Grup 3	224.71±2.69
Grup 4	224.29±1.80

### 2. Inclined plane test (IPT) sonuçları (Tablo 4, Grafik 1)

Birinci gün IPT sonuçları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 (p=0.016), grup 3 (p=0.016) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır (p=0.016). Grup 2 ile grup 3 (p=0.002) ve grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.002). Ancak, grup

**Tablo 4. Zamana göre inclined plane dereceleri (ort±SS).**

	1. gün	10. gün	20. gün	30. gün
<b>1. Grup</b>	63±1.0	64.67±1.52	65.33±1.52	65.67±1.52
<b>2. Grup</b>	29.29±1.11	31.14±1.46	33.86±1.57	36.29±1.49
<b>3. Grup</b>	32.71±1.11	36.57±1.13	41.29±1.49	42.86±2.79
<b>4. Grup</b>	33.71±1.11	38±1.15	44.14±0.89	48.71±1.12

**Grafik 1. Zamana göre inclined plane dereceleri.****Grafik 2. Zamana göre BBB skorları.****Tablo 5. Zamana göre BBB skorları (ort±SS).**

	1. gün	10. gün	20. gün	30. gün
<b>1. Grup</b>	20.33±0.58	21±0	21±0	21±0
<b>2. Grup</b>	0.57±0.53	2±0.82	3.57±0.79	4.71±0.76
<b>3. Grup</b>	0.857±0.69	2.86±0.69	5.29±1.13	7.14±0.90
<b>4. Grup</b>	1.14±0.38	3.71±0.76	6.57±0.79	8.57±0.98

3 ile grup 4 arasındaki fark anlamlı değildir ( $p=0.131$ ).

Onuncu gün IPT sonuçları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 ( $p=0.015$ ), grup 3 ( $p=0.015$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.015$ ). Grup 2 ile grup 3 ( $p=0.002$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.002$ ). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır ( $p=0.042$ ).

Yirminci gün IPT sonuçları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 ( $p=0.016$ ), grup 3 ( $p=0.016$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.015$ ). Grup 2 ile grup 3 ( $p=0.002$ ) ve arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.001$ ). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır ( $p=0.002$ ).

Otuzuncu gün IPT sonuçları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 ( $p=0.016$ ), grup 3 ( $p=0.016$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.017$ ).

Grup 2 ile grup 3 ( $p=0.025$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.002$ ). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır ( $p=0.002$ ).

### 3. BBB skorumlama sonuçları (Tablo 5, Grafik 2)

Birinci gün BBB skorları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 ( $p=0.012$ ), grup 3 ( $p=0.013$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.007$ ). Grup 2 ile grup 3 ( $p=0.424$ ) arasındaki fark anlamlı değilken, grup 4 ile arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.044$ ). Ancak, grup 3 ile grup 4 arasındaki fark anlamlı değildir ( $p=0.335$ ).

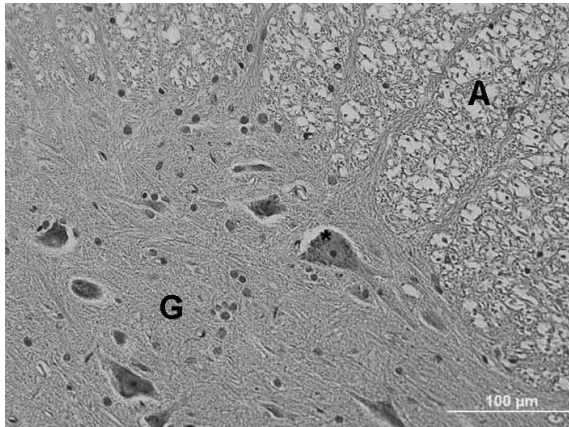
Onuncu gün BBB skorları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 ( $p=0.014$ ), grup 3 ( $p=0.012$ ) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.013$ ). Grup 2 ile grup 3 ( $p=0.065$ ) arasındaki fark anlamlı değilken, grup 4 ile arasındaki fark anlamlıdır ( $p=0.005$ ). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark



da anlamlıdır (p=0.053).

Yirminci gün BBB skorları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 (p=0.012), grup 3 (p=0.014) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır (p=0.012). Grup 2 ile grup 3 (p=0.010) ve grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.001). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.038).

Otuzuncu gün BBB skorları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 (p=0.013), grup 3 (p=0.014) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır (p=0.017). Grup 2 ile grup 3 (p=0.002) ve grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.001). Grup 3 ile grup 4 arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.021).

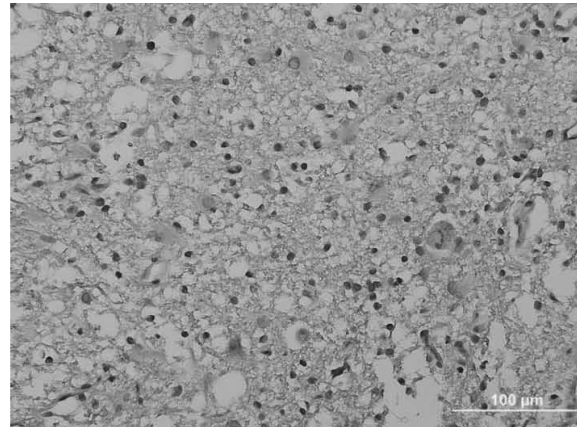


Resim 1. H&E boyama: Grup 1'in medulla spinalisine ait histolojik görünümü (x40). G: Gri cevher, A: Ak cevher alanları, \*: Motor nöron.

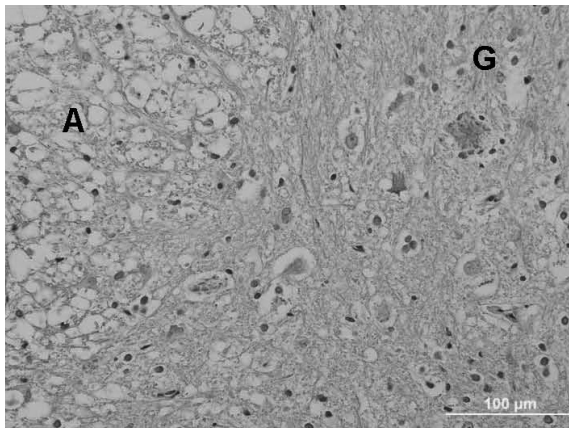
#### 4. Histopatolojik bulgular

Hemaktoksilen-Eosin (H&E) ile hazırlanan preparatlar histolojik olarak değerlendirildiğinde, grup 1'de normal spinal kord dokusu izlenirken (Resim 1), grup 2'de gri cevherde belirgin nekroz, yaygın hemoraji, demyelinizasyon, glial hücre reaksiyonu, fibrozis, inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ile birlikte dural kalınlaşma gözlemlendi (Resim 2). Gabapentin verilen gruplarda ise bu değişiklikler birkaç alanda sınırlı hemoraji ve glial hücre reaksiyonu şeklinde daha hafif olarak izlendi (Resim 3 ve 4).

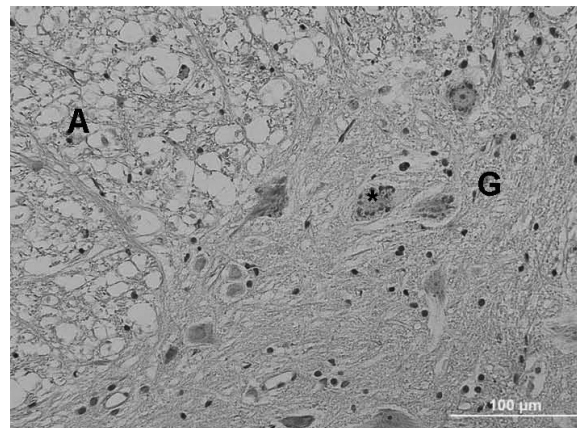
H&E ile histopatolojik bakı sonuçları karşılaştırıldığında, grup 1 ile grup 2 (p=0.003), grup 3 (p=0.011) ve grup 4 arasındaki fark anlamlıdır



Resim 2. Grup 2'ye ait medulla spinalis (x40): Yaygın glial reaksiyon.



Resim 3. Grup 3'e ait medulla spinalis (x40).



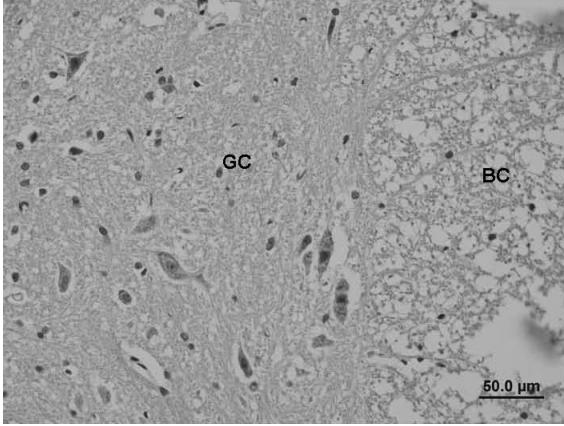
Resim 4. Grup 4'e ait medulla spinalis (x40). \*: Motor nöron.

**Tablo 6. TUNEL-pozitif hücre oranları.**

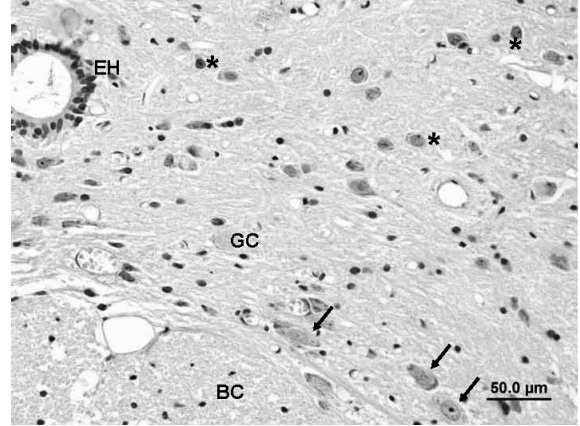
Gruplar	TUNEL-pozitif hücre (%)
1	9.6±1.63*
2	49.4±3.12#
3	34.6±1.81
4	25.2±1.35

**Tablo 7. Antikaspaz-3-pozitif hücre oranları**

Gruplar	Antikaspaz-3-pozitif hücre (%)
1	7.2±1.28
2	33.6±2.80
3	25.6±1.43
4	18.2±1.15



**Resim 5. TUNEL boyama; Grup 1, (x40) (Mayer's). GC: Gri cevher, BC: Beyaz cevher.**

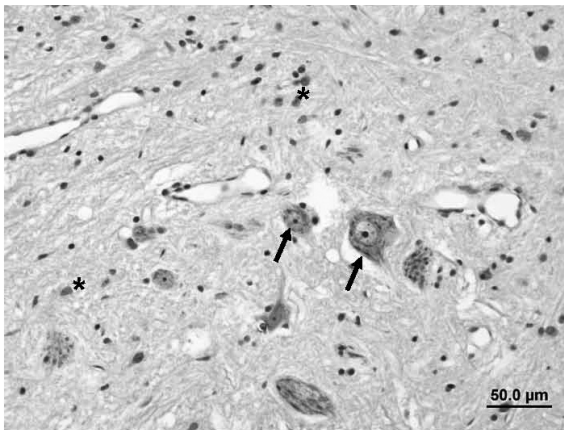


**Resim 6. Grup 2 (x40) (Meyer's). EH: Ependim hücreleri, Oklar: TUNEL-pozitif motor nöronlar, yıldızlar; TUNEL-pozitif glia hücreleri.**

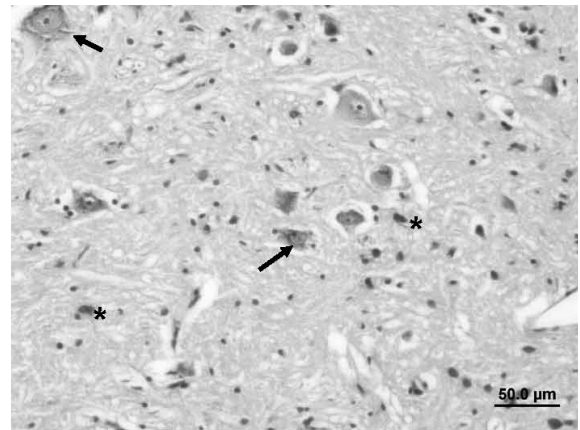
(p=0.017). Grup 2 ile grup 3 (p=0.023) ve grup 4 ile arasındaki fark da anlamlıdır (p=0.007). Ancak, grup 3 ile grup 4 arasındaki fark anlamlı değildir (p=0.591).

Dokulardaki apoptoz değerlendirmesi için yapılan TUNEL immünohistokimya boyama sonuçları değerlendirildiğinde (Tablo 6), grup

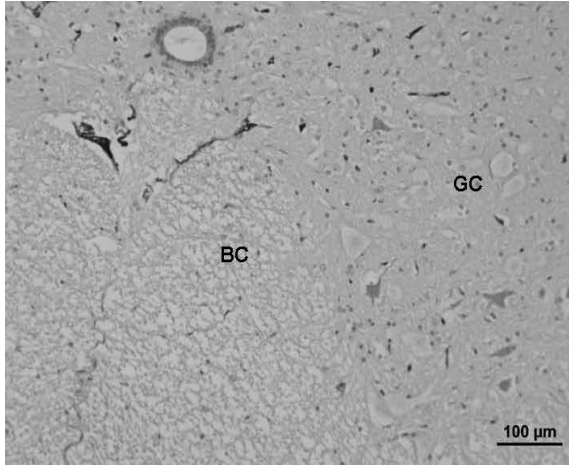
1'de TUNEL-pozitif hücre oranı grup 2, grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (p=0.00) (Resim 5). Grup 2'de TUNEL-pozitif hücre oranı, grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (p=0.001) (Resim 6). Grup 3'teki TUNEL pozitif hücre oranı da grup 4'e göre anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.001) (Resim 7 ve 8).



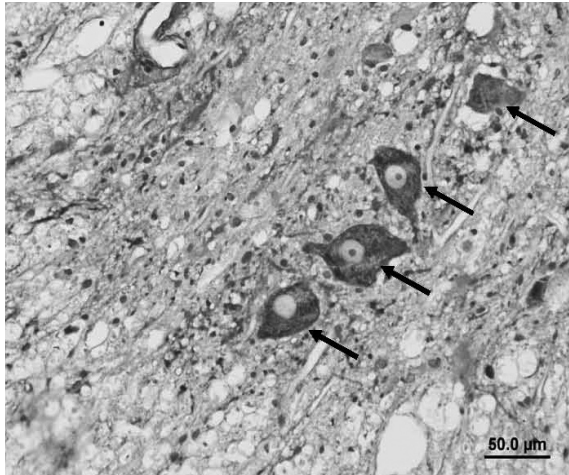
**Resim 7. Grup 3 (x40) (Mayer's) Oklar; TUNEL-pozitif motor nöronlar, yıldızlar; TUNEL pozitif glia hücreleri.**



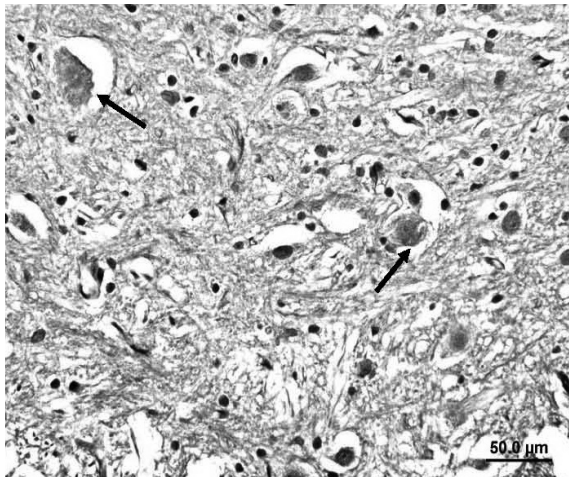
**Resim 8. Grup 4 (x40) (Mayer's) Oklar; TUNEL-pozitif motor nöronlar, yıldızlar; TUNEL pozitif glia hücreleri.**



Resim 9. Antikaspaz-3 immünohistokimya boyama: Grup 1 (x40).

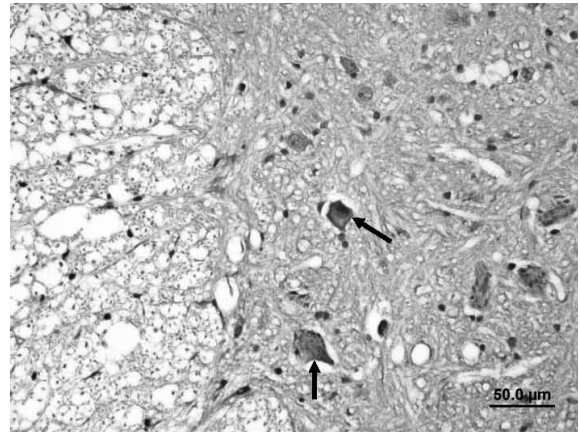


Resim 10. Antikaspaz-3 immünohistokimya boyama: (Grup 2 (x40).



Resim 11. Antikaspaz-3 immünohistokimya boyama: (Grup 3 (x40).

TUNEL boyama ile gösterilen doku apoptozunu desteklemek amacıyla kesitlere antikaspaz-3 immünohistokimyasal boyama uygulandı. Her kesitte 20X mikroskopik büyütmede gri cevherde on farklı alanda antikaspaz-3-pozitif hücre sayımları gerçekleştirildi. Sonuçlar yüzde oran cinsinden belirtildi (Tablo 7). Sham grubunda antikaspaz-3-pozitif hücre sayısı hasar gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ( $p=0.00$ ) (Resim 9). Grup 2'de antikaspaz-3-pozitif hücre oranı grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu ( $p=0.037$ ) (Resim 10, 11 ve 12).



Resim 12. Antikaspaz-3 immünohistokimya boyama: (Grup 4 (x40).

## TARTIŞMA

Akut omurilik yaralanması, yüzyıllardır bilinen bir patolojik durum olup, toplumu sosyal ve ekonomik açıdan oldukça derinden etkilemektedir. Günümüzde omurilik yaralanmasında oluşan hasarı önlemede veya iyileştirmede etkin tedavi hâlen yeterli düzeyde değildir ve evrensel kabul gören bir tedavi protokolünün düzenlenememesi nedeniyle günümüzün en ciddi sağlık sorunlarından biri olmaya devam etmektedir<sup>(10,11,22)</sup>.

Omurilik yaralanmasının patofizyolojisinde oluşan hasarın, primer ve sekonder mekanizmalarla gerçekleştiğine dair çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunlar; primer mekanik hasar ve bu hasar

tarafından tetiklenerek ortaya çıkan ve birçok faktörün rol oynadığı sekonder hasarlanmalardır<sup>(35)</sup>. Primer hasarlanma ile mücadelede seçeneklerimiz hâlâ çok sınırlıdır. Bununla birlikte, bilinmektedir ki sekonder hasarlanma daha uzun sürmekte, daha önemli yer tutmakta, morbidite ve mortalitenin düşürülmesinde esas hedef olmaktadır. Omurilik hasarının akut safhasındaki tedavi yaklaşımlarının büyük çoğunluğu sekonder nörotoksik oluşumları engellemeyi ya da bu sürecin ilerlemesini durdurabilmeyi amaçlar<sup>(12,29,44)</sup>. Bu safhada özellikle apoptozis mekanizması spinal kordda sekonder hasarlanmanın önemli mekanizmalarından biri olarak bilinmektedir<sup>(11,16,17,34,37,44,48)</sup>.

Gabapentin (GBP), bir inhibitör nörotransmitter olan GABA'ya yapısal olarak benzeyen bir lipofilik analog olan yeni kuşak antiepileptik bir ilaçtır. Kesin etki mekanizması hâlen bilinmemekle birlikte, gabapentin, GABA sinapslarında etki gösteren bazı ilaçlardan farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda, antiepileptik etkisinden başka analjezik ve anti-enflamatuvar etkileri de olduğu bildirilmiştir.

GBP'in hücrel mekanizmalardaki farmakolojik rolü net olarak anlaşılabilmiş değilse de bazı hipotezler öne sürülmektedir. Hayvan modellerinde antikonvülzan, antinosiseptif, anksiyolitik ve nöroprotektif etkinliğinde farklı mekanizmalar rapor edilmiştir:

- 1) Gabapentin, vücuttaki çeşitli membran bariyerlerden, spesifik aminoasit transport sistemini (sistem L) kullanarak ve bazı aminoasitlerle yarışarak geçmektedir<sup>(33,38)</sup>.
- 2) GABA'nın konsantrasyon ve sentez hızını artırır<sup>(25,28)</sup>.
- 3) Beyinde, olasılıkla voltaj bağımlı Ca<sup>++</sup> kanallarının altbirimi ile ilişkili, farklı bir bölgeye yüksek affinite ile bağlanır<sup>(13)</sup>.

- 4) Çeşitli monoamin nörotransmitterlerin salınımını azaltır<sup>(9,32)</sup>.
- 5) Elektrofizyolojik çalışmalar voltaj ile aktive olan Na<sup>+</sup> kanallarını inhibe ettiğini gösterse de, başka çalışmalar zıt düşmektedir<sup>(43,46)</sup>.
- 6) Kanda serotonin konsantrasyonunu yükseltmektedir<sup>(31)</sup>.
- 7) Birçok modelde nöronal hücre ölümünü önlemektedir<sup>(14,15)</sup>.

Sistem L aminoasit transporter özelliğinden dolayı, gabapentin molekülleri membran bariyerleri kolaylıkla geçebilmekte ve sitozolde yüksek konsantrasyona ulaşabilmektedir<sup>(38,39)</sup>.

Yapılan bir çalışmada, GBP'in nöroprotektif etkisine aracılık eden iki hipotez sunulmuştur<sup>(47)</sup>. Beyin dokusunda glutamat sentezi için bir yolak,  $\alpha$ -ketoglutaratın, dallı-zincirli amino asitlerden (lösin, isolösin, valin) dallı-zincirli aminotransferaz enzimi (BCAA-T) aracılığıyla transaminasyonudur. GBP, BCAA-T'in kompetatif inhibitörüdür. GBP, beyin sitozolünde bulunan BCAA-T'in isoform (nöronal form)'una selektif etkiliyken, mitokondrial BCAA-T'a etkisi minimaldir<sup>(18)</sup>. GBP in vivo olarak BCAA-T'in etkisini önemli oranda inhibe ederek, glutamatın sitozolik konsantrasyonunu düşürmektedir, bu da glutamata bağımlı hücre ölümünü azaltmaktadır. NMR spektroskopisi ile GBP tedavisi uygulanmış rat beyinlerinde glutamatın %20 oranında azaldığı gösterilmiştir<sup>(30)</sup>.

Sonuç olarak, GBP'in hücrel ve moleküler aktivitesi konusunda çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen, hâlen tam olarak bilgi sahibi değiliz. GBP glutamat, glutamin veya GABA'nın metabolizma veya konsantrasyonu üzerine etkili antiepileptik, antinosiseptif bir ajandır.

Streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda yapılan bir çalışmada, GBP almayan grupta lipid

peroksidaz ve glutatyon değerlerinin arttığı görülmüş, GBP tedavisinin diyabetik ratlarda hipokampal ve kortikal nörodejenerasyonu azalttığı bildirilmiştir<sup>(4)</sup>.

İntraoküller basınç arttırılarak retinal iskemi yaratılan ratlarda GBP doz ve verilme zamanı değiştirilerek ganglion hücre tabakasındaki histolojik değişiklikler saptanmıştır. Sonuç olarak, ilk 4 saat içinde GBP verilmesinin nöroprotektif etki gösterdiği, 25-50-75 mg/kg olarak farklı dozlarda verildiğinde ise 25 mg/kg nöroprotektif olmadığı, 50-75 mg/kg nöroprotektif olduğu bildirilmiştir<sup>(45)</sup>.

On iki günlük sağ karotisi bağlanan farelerde yapılan bir çalışmada, GBP nöbet kontrolü ve hemisferik beyin atrofisi yönünden karşılaştırılmış, farklı dozlarda (0, 50, 100, 150, 200 mg/kg) GBP intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Dört hafta sonra yapılan kontrollerde, 150-200 mg/kg GBP'in nöbetleri azalttığı, beyin atrofisini yavaşlattığı, daha düşük dozlarda ise nöroprotektif etkisinin izlenemediği bildirilmiştir<sup>(5)</sup>.

Çalışmamızda kullanılacak GBP dozu, literatürde bulunan çalışmalar göz önünde bulundularak, 150 mg/kg (İV) olarak belirlendi. GBP, ratlarda maksimum etkiye ulaşma süresi göz önüne alınarak, grup 4'te travmadan 5 dk. önce uygulandı. Grup 3'te ise travmadan 2 saat sonra uygulandı.

Çalışmamızda standart travma sağlayabilmek amacı ile Tator tarafından tanımlanan standart klip kompresyon modeli uygulandı<sup>(41)</sup>. Bu modelde klip kapanma gücü ve kompresyon süresi değiştirilerek istenen şiddette yaralanma oluşturulabilmektedir. Bu modelin avantajı omurluğun tamamının travmaya maruz bırakılarak, aynı zamanda iskemiye yol açmasıdır ki bu da insanlarda meydana gelen travma sonrası omurilik yaralanmasına benzer bir model olmaktadır. Anevrizma klipi olarak 63 g basınç uygulayan

Aesculap FE 721K kullanıldı. Klipaj süresi 1 dk. olarak belirlendi.

Çalışmamızda, Inclined Plane Test sonuçları değerlendirildiğinde Sham grubu ile travma uygulanan gruplar arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur. Spinal kord hasarlanması öncesi ve sonrası gabapentin uygulamasının 10. günden sonra fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. Travma öncesi GBP uygulanan gruptaki iyileşmenin, travma sonrası GBP uygulanan grupla karşılaştırıldığında daha hızlı ortaya çıktığı ve daha belirgin olduğu gösterilmiştir.

Grupların nörodavranışsal sonuçlar değerlendirildiğinde ise, BBB davranış skoruna göre, Sham grubu ile travma uygulanan gruplar arasındaki fark anlamlı olarak bulunmuştur. Spinal kord hasarlanması öncesi GBP uygulamasının 10. günden sonra fonksiyonel iyileşme üzerine olumlu etkisi olduğu gözlenmiştir. GBP uygulanan grupların motor fonksiyonlarında iyileşmenin diğer gruplara göre belirgin olduğu saptandı. Travma öncesi GBP uygulanan gruptaki iyileşmenin, travma sonrası GBP uygulanan grupla karşılaştırıldığında daha iyi olduğu gösterildi. Glutamat'ın, yaralanmadan sonra 15 dk. içinde pik değerine ulaşması ve 120 dk. kadar yüksek kalması, travma öncesi GBP uygulanan grubun, eksitotoksik etkiye daha kısa süre ile maruz kaldığını göstermektedir. Literatür ile birlikte değerlendirildiğinde travma öncesi GBP uygulanan grup, darbe sonrası aşırı glutamat artışının neden olduğu eksitotoksik etkiye daha dirençli hâle gelmektedir. Bu durum, grup 4'te yer alan ratlardaki iyileşmenin, grup 3'teki ratlara göre daha iyi olmasını açıklamaktadır.

Çalışmamızda kullanılan her iki nörodavranışsal testin benzer sonuçlar vermesi, kullanılan testlerin ve elde edilen tedavi sonuçlarının güvenilirliği açısından önemlidir. Yapılan değerlendirmelerde BBB skorlaması ve inclined plane testleri

Gabapentin uygulamasının iyileşmeye olumlu katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Işık mikroskopunda Hemotoksilen-Eosin (H&E) inceleme sonucunda; GBP uygulanmayan grup 2'de, yaygın hemoraji, belirgin polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu, glial hücre reaksiyonu ve yaygın demiyelinizasyon izlenirken, GBP uygulanan gruplarda (grup 3 ve 4), hemorajinin daha sınırlı olduğu ve polimorfonükleer lökosit infiltrasyonu ve glial hücre reaksiyonunun daha hafif olduğu görülmüştür. Histopatolojik skorlama sonucunda, GBP uygulanan gruplarda hasarın, kontrol grubuna göre daha hafif olduğu saptanmıştır.

Dokulardaki apoptozun değerlendirilmesi amacıyla TUNEL-boyama uygulanan kesitlerde, TUNEL-pozitif hücre sayımları yapıldı. Sonuçlar yüzde oran cinsinden belirtildi. Yapılan istatistik analizde gruplar arasında fark olduğu gözlemlendi. Sham grubunda TUNEL-pozitif hücre sayısı hasar gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Grup 2'de TUNEL-pozitif hücre sayısı grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu. Travma öncesi GBP uygulanan grupta, travma sonrası GBP uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunması GBP'in spinal kord yaralanmasında nöroprotektif etkisi bulunduğunu göstermektedir.

TUNEL-boyama ile gösterilen doku apoptozunu desteklemek amacıyla kesitlere uygulanan antikaspa-3 immunohistokimyasal boyamada, gri cevherde on farklı alanda antikaspa-3-pozitif hücre sayımları gerçekleştirildi. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında fark olduğu gözlemlendi. Sham grubunda antikaspa-3-pozitif hücre sayısı hasar gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu. Grup 2'de antikaspa-3-pozitif hücre sayısı grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak daha yüksek bulunması GBP'in nöroprotektif etkisini destekleyen bir bulgudur.

H&E, TUNEL ve antikaspa-3 immunohistokimyasal boyamaların gruplar arasında anlamlı farklı bulunması ve bu üç boyama tekniği sonuçlarının birbirlerini desteklemeleri, travma öncesi GBP uygulanan grupta, travma sonrası GBP uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı daha iyi bulunması GBP'in nöroprotektif etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak, akut omurilik yaralanmaları, olumsuz sonuçları ve kısıtlı tedavi seçenekleri nedeniyle ümit kırıcı gözükse de, omurilik yaralanmalarındaki hasar mekanizmalarının anlaşılmasını sağlayacak deneysel modellerin gelişmesi ve hasarın engellenmesi yolunda yeni tedavi çalışmalarının hızlanması ve artması, gelecek günlerin sanıldığı kadar karanlık olmadığını göstermektedir.

Çalışmamızda, GBP'in spinal kord travması oluşturulan ratlarda nörodavranışsal ve histopatolojik olarak iyileşmeyi arttırdığı saptanmıştır. Travma öncesi yapılan GBP'in iyileşme üzerindeki etkisinin, nörodavranışsal olarak daha güçlü olduğu görülmüştür.

GBP'in hem travma öncesi hem de travma sonrası uygulamalarında etkinliğinin yüksek bulunması, yalnızca spinal travma geçirmiş olgularda değil, cerrahi olarak spinal travmaya açık, riskli nöroşirürjikal olgularda da, cerrahi travmanın olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla kullanılabilirliğini düşündürmüştür. Bu düşüncenin kullanıma geçirilebilmesi için değişik hayvan modellerinde, farklı doz, süre ve uygulama protokolleri ile çalışmanın geliştirilmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. **Aguayo AJ.** Axonal elongation in peripheral and central nervous system transplants. *Advances in Cellular Neurobiology* 3, New York: Academic Press: 1982:215-34.
2. **Anderson DK, Hall ED.** Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993;22:987-92.

- [http://dx.doi.org/10.1016/S0196-0644\(05\)82739-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0196-0644(05)82739-8)
3. **Apuzzo M.** Pharmacological therapy after acute cervical spinal cord injury. *Neurosurgery* 2002;50(3):63-72.
  4. **Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M.** Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats. *Acta Pharmacologica Sinica* 2005;26(4):417-22.  
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7254.2005.00072.x>
  5. **Comi AM, Beatrix S, Justin D, Mulholland BS, Shilpa D, Johnston MV.** Gabapentin Neuroprotection and Seizure Suppression in Immature Mouse Brain Ischemia. *Pediatric Research* 2008;64(1):81-5.  
<http://dx.doi.org/10.1203/PDR.0b013e318174e70e>
  6. **Cayli SR.** Neuroprotective effect of etomidate on functional recovery in experimental spinal cord injury. *Int J Dev Neurosci* 2006;24(4):233-9.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2006.04.003>
  7. **De La Torre JC.** Spinal cord injury: review of basic and applied research. *Spine* 1981;6:315-35.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00007632-198107000-00001>
  8. **Demediuk P, Saunders RD, Clendenon NR, Means ED, Anderson DK, Horrocks LA.** Changes in lipid metabolism in traumatized spinal cord. *Prog Brain Res* 1985;63:211-26.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)61985-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6123(08)61985-8)
  9. **Dooley DJ, Suman-Chauhan N, Madden Z.** Inhibition of K<sub>v</sub>-evoked [3H]noradrenaline release from rat neocortical slices by the anticonvulsant gabapentin [abstract]. *Soc Neurosci. Abstr.* 22, 1992, 1996.
  10. **Dumont AS, Oskouian RJ.** Will improved understanding of the pathophysiological mechanisms involved in acute spinal cord injury improve the potential for therapeutic intervention? *Curr Opin Neurol* 2002;15(6):713-20.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00019052-200212000-00009>
  11. **Dumont RJ.** Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24(5):254-64.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00002826-200109000-00002>
  12. **Fiford RF, Bilston LE.** A vertebral dislocation model of spinal cord injury in rats. *J of Neurotrauma* 2004; 21(4):451-8.  
<http://dx.doi.org/10.1089/089771504323004593>
  13. **Gee NS, Brown JP, Dissanayake VUK, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN.** The novel anticonvulsant drug, gabapentin (Neurontin), binds to the  $\alpha 2\delta$  subunit of a calcium channel. *J Biol Chem* 1996;271:5768-76.  
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.271.10.5768>
  14. **Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al.** Motor neuron degeneration in mice expressing a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 1994;264:1772-5.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.8209258>
  15. **Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED.** Benefit of vitamin E, riluzole and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1996;39:147-57.  
<http://dx.doi.org/10.1002/ana.410390203>
  16. **Hagg T, Oudega M.** Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2006;23:264-80.  
<http://dx.doi.org/10.1089/neu.2006.23.263>
  17. **Hall ED, Yonkers PA, Andrus PK.** Biochemistry and pharmacology of lipid antioxidant in acute brain and spinal cord injury. *J Neuro Trauma* 1992;9:165.
  18. **Hutson SM, Drown P, Ilyosova D, Reinhart GD.** Role of gabapentin and branched chain aminotransferase isoenzymes in astrocyte neurotransmitter metabolism. *J Neurochem* 1995;66:76.
  19. **Jen-Kun C, Lih-Chu C.** Mechanisms of the antinociceptive action of Gabapentin. *J of Pharmacol Sci* 2006;100:471-86.  
<http://dx.doi.org/10.1254/jphs.CR0050020>
  20. **Joshi M, Fehlings MG.** Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 2. Quantitative neuro-anatomical assessment and analysis of the relationships between axonal tracts, residual tissue, and locomotor recovery. *J Neurotrauma* 2002;19(2):191-203.  
<http://dx.doi.org/10.1089/08977150252806956>
  21. **Joshi M, Fehlings MG.** Development and characterization of a novel, graded model of clip compressive spinal cord injury in the mouse: Part 1. Clip design, behavioral outcomes, and histopathology. *J Neurotrauma* 2002;19(2):175-90.  
<http://dx.doi.org/10.1089/08977150252806947>
  22. **Kaptanoğlu E, Attar A.** Omurilik yaralanmasında rejenerasyon çalışmaları ve kök hücre uygulamaları. *Türk Nöroşirürji Bülteni* 2005;9:43-53.
  23. **Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR.** Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine* 2004;4(4):451-64.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.spinee.2003.07.007>
  24. **Lapchak PA, Araujo DM, Song D, et al.** Neuroprotection by the selective cyclooxygenase-2 inhibitor SC-236 results in improvements in behavioral deficits induced by reversible spinal cord ischemia. *Stroke* 2001;32:1220-5.  
<http://dx.doi.org/10.1161/01.STR.32.5.1220>
  25. **Löschner W, Honack D, Taylor CP.** Gabapentin increases aminooxyacetic acid induced GABA accumulation in several regions of rat brain. *Neurosci Lett* 1991;128:150-4.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90249-S](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3940(91)90249-S)
  26. **Marion DW.** Head and spinal cord injury. *Neurol Clin* 1998;16(2):485-502.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8619\(05\)70073-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-8619(05)70073-6)
  27. **Murugiah KD, Hemmings HC.** Effects of intravenous general anesthetics on [3H]GABA release from rat cortical synaptosomes. *Anesthesiology* 1998;89(4):919.  
<http://dx.doi.org/10.1097/0000542-199810000-00017>
  28. **Myung Ha Yoon, Jeong Il Choi.** Hemodynamic effects of gabapentin in rats. *The Korean Acad of Med Sci* 2003;18:478-82.  
<http://dx.doi.org/10.3346/jkms.2003.18.4.478>
  29. **Ohnishi ST, Barr JK, Katagi C, Katsuoka M.** Protection of rat spinal cord against contusion injury by new prostaglandin derivatives. *Arzneimittelforschung* 1989;39(2):236-9.
  30. **Petroff OA, Manor D, Behar KL.** Gabapentin decreases cortical glutamate rapidly in a rat model. *Epilepsy Res* 1997;
  31. **Rao ML, Clarenbach P, Vahlensieck M, Kraetzschmar S.** Gabapentin augments whole blood serotonin in healthy young men. *J Neural Transm* 1998;73:129-134.  
<http://dx.doi.org/10.1007/BF01243384>

32. **Reimann W.** Inhibition by GABA, baclofen and gabapentin of dopamine release from rabbit caudate nucleus: are there common or different sites of action? *Eur J Pharmacol* 1983;94:341-4.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(83\)90425-9](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(83)90425-9)
33. **Satzinger G.** Antiepileptics from g-aminobutyric acid. *Drug Res* 1994;44:261-6.
34. **Schwab ME, Bartholdi D.** Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spina cord. *Physiol Rev* 1996;76(2):319-70.
35. **Schwab ME.** Repairing the injured spinal cord. *Science* 2002;295(5557):1029-31.  
<http://dx.doi.org/10.1126/science.1067840>
36. **Sekhon LH, Fehlings MG.** Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 2001;26(24):2-12.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00007632-200112151-00002>
37. **Sonntag VKH.** History of degenerative and traumatic disease of the spine. In a history neurosurgery. Greenblatt SH (ed). American association of Neurological Surgeons, Washington, 1997:355-71.
38. **Stewart BH, Kugler AR, Thompson PR, Bockbrader HN.** A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharmaceut Res* 1993;10:276-81.  
<http://dx.doi.org/10.1023/A:1018951214146>
39. **Su T, Lunnay E, Campbell G, Oxender DL.** Transport of gabapentin, a gaminoacid drug, by system L a-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes and CHO cells. *J Neurochem* 1995;64: 2125-31.  
<http://dx.doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64052125.x>
40. **Taoka Y, Okajima K.** Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998;56(3):341-58.  
[http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00049-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00049-5)
41. **Tator CH.** Acute spinal cord injury: a review of recent studies of treatment and pathophysiology. *Can Med Assoc J* 1972;107(2):143.
42. **Tator CH.** Review of experimental spinal cord injury with emphasis on the local and systemic circulatory effects. *Neurochirurgie* 1991;37:291-302.
43. **Taylor CP.** The anticonvulsant lamotrigine blocks sodium currents from cloned a-subunits of rat brain Na channels in a voltage-dependent manner but gabapentin does not. *Soc Neurosci Abstr* 1993;23:1631.
44. **Xarchas KC, Bourandas J.** Injuries and diseases of the spine in the ancient times. *Spine* 2003;28(13):1481-4.  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.BRS.0000067113.15385.8D>
45. **Lagrèze WA, Müller-Velten R, Feuerstein T.J.** The neuroprotective properties of gabapentin-lactam. Graefe's *Arch for Clin Experim Ophthal* 2001;26(24):87-98.  
<http://dx.doi.org/10.1007/s00417-001-0383-5>
46. **Wamill AW, McLean MJ.** Limitation by gabapentin of high frequency action potential firing by mouse central neurons in cell culture. *Epilepsy Res* 1994;17:1-11.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)90074-4](http://dx.doi.org/10.1016/0920-1211(94)90074-4)
47. **Welty DF, Schielke GP, Rothstein JD.** Potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis by the anticonvulsant gabapentin: A hypothesis. *Ann Pharmacother* 1995;29:1164-7.
48. **Yang L, Blumbergs PC, Jones NR.** Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine* 2004;29:966-71.  
<http://dx.doi.org/10.1097/00007632-200405010-00004>