

DENEYSSEL OMURİLİK YARALANMASINDA HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Omurilik yaralanması hastanın fiziksel, sosyal ve psikolojik hayatını etkileyen, toplumsal sosyoekonomik kayıplara yol açan, günümüzde halen ciddi bir sağlık sorunu olmaya devam eden önemli yaralanmalardır (1).

Deneysel çalışmalar ile omurilik yaralanmalarında birincil ve ikincil hasar kavramları ortaya konmuştur. Birincil hasar travma anında gerçekleşir, direkt mekanik hasar ve akut hücre ölümü ortaya çıkar. İkincil hasar ise çok sayıda hücre, moleküller ve biyokimyasal endojen hücre ölümü yollarının aktivasyonu ile sonuçlanan, birincil hasar ile başlatılmış programlı hücre ölümü (apoptoz) kaskadı ile gerçekleşir. Ortaya çıkan serbest radikaller ve hücre membranı lipid peroksidasyonunun ikincil hasar sürecinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hasar sonrası omurilikte kanlanmada azalma da olmaktadır. Omuriliği besleyen majör damarlar olan anterior ve posterior spinal arterler sağlam kalsa da mikrosirkülasyon hasarlanmakta ve perfüzyon bozulmaktadır. Ek olarak hasarlı bölgede toplanan proinflamatuvar sitokinler (TNF-alfa, IL-1), proteazlar kan-beyin bariyeri hasarı oluşturur, ekstrasellüler matriksi gevşetir ve yeni lökositlerin bölgeye akımını sağlar. Lökositler de reaktif oksijen metabolitleri, enzimler ve sitokinler ile inflamatuvar yanıtı artırarak, doku hasarını çoğaltır (2-7).

Birincil hasar travma anında oluşur, medikal ya da cerrahi tedavisi bulunmamaktadır. Ancak ikincil değişiklikleri anlamak ve engellemek teorik olarak mümkün gözükmektedir. Bu nedenle, ikincil hasarı önlemeye yönelik çok çeşitli tedavi yöntemleri

araştırılmaktadır. Bu araştırmalar genellikle deneysel hayvan çalışmalarıdır. Bu çalışmalarda histopatolojik inceleme tedavi yöntemlerini değerlendirme açısından gerekmektedir.

Öncelikle; deneysel çalışmalar kurgulanırken, önerilen hipotez doğrultusunda, yapılacak histopatolojik incelemenin deneysel ve teknik gereksinimleri açısından histopatolog ile görüşülerek birlikte planlama yapılmalıdır. Histopatolojik inceleme hedeflerinin belirlenmesi ve bu hedefler için gerekli yöntemin çalışmaya başlamadan önce patolojik ile birlikte saptanması, araştırmanın başarısı ve doğruluğunu artıracaktır. İmmünohistokimyasal ve moleküler çalışmalar genellikle formaldehid tespitli dokularda yapılabilmeyle birlikte, araştırma hedeflerine göre belirlenen antikorlar için uygun tespit solüsyonu önceden belirlenmelidir.

Histopatolojik inceleme genellikle rutin ışık mikroskopunda yapılır. Ancak çalışmada hücre organelleri düzeyinde ve aksonlardaki hasara ait minör değişikliklerin araştırılması gerektiği durumda, ışık mikroskopik incelemelerin yanında mutlaka elektron mikroskopik değerlendirme de yapılmalıdır. Histopatolojik incelemede rutin Hematoksilen Eozin boyalı kesitler yanı sıra çalışmanın hipotezinin doğruluğunu veya yanlışlığını ortaya koymak için histokimyasal, immünohistokimyasal, immüno floresan, moleküler veya elektron mikroskopik incelemeler de yapılabilir.

Rutin histopatolojik değerlendirme için incelenecek materyallerin, çıkartıldıktan sonra hemen %10'luk tamponlu formaldehid solüsyonu içerisine,

ağızı kapalı bir kavanoza konmalıdır. %10'luk formaldehid solüsyonu, örnek materyalin hacminin en az 10 katı kadar olmalıdır. Bu şekilde materyal histopatolojik incelemeyi yapacak olan patoloğa, en kısa süre içerisinde ulaştırılmalıdır. Materyal hemen ulaştırılmayacaksa, oda ısısında, güneş görmeyen bir yerde bekletilmelidir. Diğer yandan; immünohistokimyasal ve moleküler çalışmalar için dokunun çok uzun süreli formaldehid içerisinde bekletilmesi, antijen ekspresyonunda kayıplara yol açabileceğinden istenen bir durum değildir.

Rutin ışık mikroskopik inceleme için materyalin en az 4 saat olmak üzere, genellikle 12 saatlik bir süre içerisinde tamponlu formaldehid içerisinde tespit olması (fiksasyon aşaması) için beklenir. Fiksasyon işleminden sonra patoloğ tarafından materyalin çıplak gözle makroskopik incelemesi yapılır. Makroskopik olarak görülen değişiklikler kaydedilir. Materyali ve materyalde izlenen patolojik değişiklikleri temsil edecek şekilde örnekler alınır. Bu örneklerden doku takip işlemi, parafin bloklama, kesit alma (4 mikrometrelik kesitler alınır) işlemlerinden sonra elde edilen kesitler, öncelikle rutin Hematoksilen Eozin boyası ile boyanır. Hipotez doğrultusunda ihtiyaç duyulur ise, rutin Hematoksilen Eozin boyası dışında, amaca yönelik olarak Masson Trikrom, Nissl boyası gibi diğer histokimyasal boyalar da çalışmaya eklenebilir.

Işık mikroskopik incelemede rutin Hematoksilen Eozin boyalı kesitlerde tedavi öncesi ve sonrası omurilikte görülen değişiklikler araştırılabilir. Bu amaçla dokuda konjesyon, ödem, iskemik değişiklikler, nöronal hasar, aksonal dejenerasyon, nekroz, apopitoz, gliozis, inflamatuvar hücreler, vasküler proliferasyon gibi omurilik hasarında görülmesi beklenen değişiklikler araştırılıp, bu veriler yoğunluğuna göre derecelendirilebilir (8,9) Nöronlardaki dejenerasyonu saptamak için histokimyasal olarak Nissl boyası yapılabilir (10). Apopitozu değerlendirmek için kaspaz gibi immünohistokimyasal antikolar, Tunnel in-situ hibridizasyon protokolü uygulanabilir (7,10,11). Araştırılan tedavinin etkinliğini değerlendirmek için bu tedavi öncesi ve sonrası yukarıda örnekleri verilen histopatolojik, histokimyasal, immünohistokimyasal ve in-situ hibridizasyon çalışmalarının sonuçları karşılaştırılabilir.

Elektron mikroskopik inceleme yapılmak üzere materyal **gluteraldehit** içine konmalıdır. Immüno-

loresan inceleme yapılacak ise, doku formaldehid içerisinde konmadan, dokunun transfer süresince kurumasını engellemek amacıyla, serum fizyolojik emdirilmiş gazlı bez içerisinde, en geç yarım saat içinde patoloji laboratuvarına ulaştırılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. Clin Epidemiol 23: 309-31, 2014.
2. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. Neurosurgery 45: 1027-1040, 1999.
3. Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R: Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. Spinal Cord 43: 204-213, 2005.
4. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushi-moto S, Johno M, Naruo M, Okabe H, Takatsuki K: Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. Neuroscience 79: 1177-1182, 1997.
5. Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, Qiu M, Gozal D, Liu R: Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. Spinal Cord 43: 204-213, 2005.
6. Mauter A EM, Weinzierl M R, Donovan F, Noble L J. Vascular Events After Spinal Cord Injury: Contribution to Secondary Pathogenesis. Physical Therapy 80: 673-68, 2000.
7. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Paola R D, Muia C, Esposito E, Bramanti P, Cuzzocrea S. TNF alfa blockade in a mouse model of SCI: evidence for improved outcome. Shock 29: 32-41, 2008.
8. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. Neurobiol Dis 15: 415-36, 2004.
9. Cemil B, Gökce EC, Erdamar H, Karabörk A, Onur O, Heper Okcu A, Yiğitoğlu R, Erdoğan B. Effects of the aged garlic extract on spinal cord injury model in rat. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg 18: 463-8, 2012.
10. Simon F, Scheuerle A, Gröger M, Vcelar B, McCook O, Möller P, Georgieff M, Calzia E, Radermacher P, Schelzig H. Comparison of carbamylated erythropoietin-FC fusion protein and recombinant human erythropoietin during porcine aortic balloon occlusion-induced spinal cord ischemia/reperfusion injury. Intensive Care Med 37: 1525-33, 2011.
11. Solaroglu I, Kaptanoglu E, Okutan O, Beskonakli E, Attar A, Kilinc K: Magnesium sulfate treatment decreases caspase-3 activity after experimental spinal cord injury in rats. Surg Neurol 64 suppl 2: S17-21, 2005.