

**DENEYSEL SPİNAL KORD HASARININ GEÇ DÖNEMİNDE
MELATONİN VE MELATONİN+DEXPANTHENOL KOMBİNE
TEDAVİSİNİN BİYOKİMYASAL, MOLEKÜLER GENETİK VE
HİSTOPATOLOJİK DEĞİŞKENLERE ETKİSİ**

Mehmet Fatih KORKMAZ

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Doktora Tezi - 2021**

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DENEYSEL SPİNAL KORD HASARININ GEÇ DÖNEMİNDE MELATONİN
VE MELATONİN+DEXPANTHENOL KOMBİNE TEDAVİSİNİN
BİYOKİMYASAL, MOLEKÜLER GENETİK VE HİSTOPATOLOJİK
DEĞİŞKENLERE ETKİSİ**

Mehmet Fatih KORKMAZ

**Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ**

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK-
2021-2367 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA

2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Medulla Spinalisin Anatomi	3
2.1.2. Medulla Spinalis'in Kan Damarları.....	6
2.1.3. Spinal Meninksler.....	7
2.2. Medulla Spinalis Hasar Mekanizması.....	8
2.2.1. Kaspaz Sistemi.....	15
2.2.2. Redükte Glutatyon (GSH).....	18
2.2.3. Malondialdehit (MDA).....	19
2.2.4. Ksantin Oksidaz (XO).....	19
2.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	20
2.2.6. Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB)	22
2.3. Melatonin (Mel).....	23
2.4. Dekspanthenol (Dex).....	26
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Kullanılan Kimyasal malzemeler.....	28
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	28
3.3. Çözeltilerin Hazırlanması.....	29
3.3.1. Melatonin Hazırlanması.....	29
3.3.2. Dekspanthenol Hazırlanması.....	29
3.3.3. RNA Saklama Çözeltisi.....	29
3.3.4. 10X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanışı.....	29
3.4. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması.....	30
3.5. Operasyon.....	31
3.6. Tedavinin Uygulanması.....	36
3.7. Radyolojik Parametreler.....	36

3.8.	Nörolojik Muayene.....	38
3.9.	Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri.....	40
3.10.	Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri	41
3.10.1.	Dokudan RNA Saflaştırılması... ..	41
3.10.2.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT).....	41
3.11.	Biyokimyasal Analiz Yöntemleri.....	42
3.11.1.	GSH Analizi.....	43
3.11.2.	MDA Analizi.....	43
3.11.3.	XO Analizi.....	44
3.11.4.	SOD Analizi.....	44
3.12.	Histopatolojik Analiz Yöntemleri.....	45
3.13.	İstatistik.....	45
4.	BULGULAR.....	46
4.1.	Radyolojik Parametre Bulguları.....	46
4.2.	Nörolojik Muayene Bulguları.....	48
4.2.1.	PAT Bulguları.....	48
4.2.2.	MTS Bulguları	50
4.2.3.	EZT Bulguları	51
4.3.	Moleküler Genetik Analiz Bulguları	54
4.4.	Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	56
4.5.	Histopatolojik Analiz Bulguları	56
5.	TARTIŞMA	67
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
	KAYNAKLAR	78
	EKLER.....	103
EK 1.	ÖZGEÇMİŞ.....	103
EK 2.	ETİK KURUL BELGESİ.....	104
EK 3.	Rattus norvegicus Xanthine Oxidase (XO).....	105
EK 4.	Rattus norvegicus Superoxide Dismutase (SOD).....	106
EK 5.	Rattus norvegicus Nuclear Factor Kappa B (NF-κB).....	107
EK 6.	Rattus norvegicus Caspase 3 (Casp3).....	108
EK 7.	Rattus norvegicus Actin Beta (Actb).....	109

TEŐEKKÜR

Doktora tez çalıŐmama maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BAP, TDK-2021-2367 no'lu proje),Tez danıŐmanım Sayın Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ'e, İnönü Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbı Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'na, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezine, Biyokimya Anabilim Dalı ve Radyoloji Anabilim Dalı'na, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı'na ve de TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü Bioanaliz Laboratuvarına teŐekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatıma kattıkları anlam için,

Onları mutlu etme Őansını bana verdikleri için,

Desteklerini yanımdan hiç eksik etmedikleri için,

Onlardan çaldığım zamanlar için,

Sabırları, Őefkatli ve sevecen tutumları için,

EŐim ve çocuklarıma sonsuz sevgilerimle...

Mehmet Fatih Korkmaz

ÖZET

Deneysel Spinal Kord Hasarının Geç Döneminde Melatonin ve Melatonin+Dexpanthenol Kombine Tedavisinin Biyokimyasal, Moleküler Genetik ve Histopatolojik Değişkenlere Etkisi

Amaç: Sıçanlarda Deneysel Spinal Kord Hasarının Geç Döneminde Melatonin ve Melatonin-Dexpanthenol Kombine Tedavisinin Biyokimyasal, Moleküler Genetik ve Histopatolojik değişikliklere etkilerini göstermek.

Materyal ve Metot: 42 adet *Sprague Dawley* dişi sıçan, her grupta 7 adet olmak üzere; Kontrol, Sham, SKH, SKH+Dex, SKH+Mel ve SKH+Dex+Mel grubu olarak 6 gruba ayrıldı. Periyodik olarak nörolojik muayeneleri yapıldı. 3.hafta sonunda ve tedavi bitiminde MR görüntülemeleri yapıldı. İlaç tedavi protokolü bitiminden sonra spinal kord doku örnekleri alınarak biyokimyasal, moleküler genetik, histopatolojik yöntemlerle analizler yapıldı.

Bulgular: Biyokimyasal analizlerde Kontrol grubuna göre SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında artan GSH, SOD, MDA ve XO düzeyleri tespit edildi. Spinal kord hasarı ile birlikte yükselen GSH, SOD, MDA ve XO seviyeleri SKH+Dex+Mel grubunda Kontrol grubu düzeylerine kadar gerilemişti. Gen ifadesi analizlerinde hiçbir grupta gen ifadelerinde bir değişiklik tespit edilmedi.

Radyolojik parametrelerden spinal kord volüm artışı tüm ilaç verilen tedavi gruplarında belirgin bir azalma göstermişti, T2 sinyal artışı sadece SKH+Dex+Mel grubunda anlamlı düzeyde azalmıştı. Ortalama MTS ölçümleri SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel gruplarında son ölçümlerde anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Histopatolojik incelemede SKH grubunda travmaya bağlı ciddi patolojik hasar tespit edilmişken Mel ve Dex'in ayrı uygulamasının bu hasarı iyileştirdiği, Mel ve Dex in birlikte kombine tedavisinin ise hasarı daha da iyileştirici etki yaptığı tespit edildi.

Sonuç: SKH'nın geç dönemindeki hasarın tedavisinde Mel+Dex kombine tedavisi ile klinik anlamda fayda sağlanabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Spinal Kord Yaralanması, Dexpanthenol, Melatonin, Gen İfadesi, Sıçan

ABSTRACT

The Effect of Melatonin and Melatonin+Dexpanthenol Combined Therapy On Biochemical, Molecular Genetic And Histopathological Parameters Changes in The Late Stage of Experimental Spinal Cord Injury

Aim: To show the effects of Melatonin and Melatonin-Dexpanthenol Combined Treatment on Biochemical, Molecular Genetic and Histopathological Changes in the Late Stage of Experimental Spinal Cord Injury in Rats.

Material and Method: Forty-two *Sprague Dawley* female rats, 7 in each group; The control was divided into 6 groups as Sham, SCI, SCI+Dex, SCI+Mel and SCI+Dex+Mel. Neurological examinations were performed periodically. MRI scans were performed at the end of the 3rd week and at the end of the treatment. After the end of the drug treatment protocol, spinal cord tissue samples were taken and analyzed by biochemical, molecular genetic and histopathological methods.

Results: In the biochemical analyzes, increased GSH, SOD, MDA and XO levels were detected in the SCI, SCI+Dex and SCI+Mel groups compared to the control group. The levels of GSH, SOD, MDA and XO, which increased with spinal cord damage, decreased to the levels of the control group in the SCI+Dex+Mel group. In gene expression analyzes, no changes in gene expressions were detected in any group.

Considering the radiological parameters, the increase in spinal cord volume showed a significant decrease in all drug-administered treatment groups, while the increase in T2 signal decreased significantly only in the SCI+Dex+Mel group. Mean MTS measurements were significantly better in the SCI+Dex and SCI+Dex+Mel groups at the last measurements. In the histopathological examination, while severe pathological damage due to trauma was detected in the SCI group, it was determined that the application of Mel, Dex improved this damage, and the combined treatment of Mel and Dex together had a more restorative effect on the damage.

Conclusion: In our study, we think that Mel+Dex combined therapy may provide clinical benefit in the treatment of this damage in the late phase of SCI.

Key Words: Dexpanthenol, Gene Expression, Melatonin, Spinal Cord Injury, Rat

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMPA	: 2-amino-3 (3 hidroksi-5 metil-izoksazol 4) Propanoik asit
ATP	: Adenozin tri fosfat
BME	: Beta merkapto etanol
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
CAT	: Katalaz
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
Dex	: Dexpanthenol
EZT	: Eğik zemin testi
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
IL-6	: İnterlökin-6
IL-18	: İnterlökin-18
Kaspaz	: Cystein-containing ASPartate ProteASE
GPX	: Glutasyon bağımlı peroksidaz
GSH	: γ - glutamylcysteineylglycine
LOOH	: Lipit hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
Mel	: Melatonin
MP	: Metilprednizolon
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTS	: Modifiye Tarlov skalası
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NGF	: Sinir büyüme faktörü
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OD	: Optik yoğunluk
PA	: Pantotaneik asit
PAT	: Parmak açma testi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RAT	: Reaktif azot türleri

ROT	: Reaktif oksijen türleri
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
SH	: Sülfhidril
SKH	: Spinal kord hasarı
SOD	: Süperoksit dismutaz
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TNF-α	: Tümör nekroz faktör alfa
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
U/g prot	: Unite/gram protein
UV	: Ultraviole
XO	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1.	Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü.....	4
Şekil 2.2.	Omurganın transvers kesit görünümü.....	5
Şekil 2.3.1.	Medulla spinalis'in arterleri.....	7
Şekil 2.3.2.	Medulla spinalis'in venleri.....	7
Şekil 2.4.	Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı..	8
Şekil 2.5.	Spinal kord yaralanmasının patofizyolojisi.....	8
Şekil 2.6.	Spinal kord hasarı sonrası aşamalar.....	10
Şekil 2.7.	Spinal kord hasarının fizyopatolojisi.....	11
Şekil 2.8.	Apoptozis mekanizması.....	12
Şekil 2.9.	Memeli hücrelerinde SOD'un formları.....	21
Şekil 2.10.	Melatoninin kimyasal formülü.....	23
Şekil 2.11.	Dexpanthenol'ün kimyasal formülü.....	26
Şekil 3.4.1.	Deney gruplarının oluşturulması.....	31
Şekil 3.5.1.	Genel anestezi yapılması.....	32
Şekil 3.5.2.	Sırt bölgesinin traşlanması, povidon iyot ile antisepsisinin sağlanması ve cerrahi alanın steril serviyet ile sınırlandırılması...	33
Şekil 3.5.3.	Dorsal laminektomi operasyonu ile spinal kordun açığa çıkarılması.....	34
Şekil 3.5.4.	Spinal kordun üzerine ağırlık düşürme.....	35
Şekil 3.5.5.	Cerrahi alanı dikişlerle kapatma (a), sabit oda sıcaklığında uyanmaya bırakma (b).....	36
Şekil 3.7.1.	MR çekimi.....	37

Şekil 3.7.2.	T2A ağırlıklı görüntüler.....	37
Şekil 3.7.3.	Sagittal düzlemde T2 ağırlıklı sekansta alınan MR görüntüleri	38
Şekil 3.8.1.	Rivliv ve Tator'un eğimli yüzey testi uygulaması.....	39
Şekil 3.8.2.	Eğik zemin açısı tespiti.....	39
Şekil 3.8.3.	Parmak açma testi uygulaması.....	40
Şekil 4.3.1.	<i>β-Aktin, XO, NF-κB, CASP3 ve SOD</i> mRNA'larının GZ-PZT ile çoğalım grafiği.....	54
Şekil 4.3.2.	<i>β-Aktin, XO, NF-κB, CASP3 ve SOD</i> mRNA'larının PZT transkripti büyüklük analizi.....	55
Şekil 4.5.1.	Kontrol grubu, normal histopatolojik görünüm, HEX100.....	58
Şekil 4.5.2.	Sham grubu, hafif derecede ödem, HEX100.....	59
Şekil 4.5.3.	SKH grubu, belirgin enflamasyon, HEX100.....	60
Şekil 4.5.4.	SKH grubu, belirgin enflamasyon, HEX400.....	61
Şekil 4.5.5.	SKH grubu, nöranal dejenerasyon, HEX400.....	62
Şekil 4.5.6.	SKH+Dex grubu normal alanlar, HEX400.....	63
Şekil 4.5.7.	SKH+Dex grubu, hemoraji, HEX400.....	64
Şekil 4.5.8.	SKH+Mel grubu, hemoraji, ödem ve enflamasyon, HEX200....	65
Şekil 4.5.9.	SKH+Dex+Mel grubu, normal histopatolojik görünüm, HEX100.....	66

TABLolar DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 1.	Primer dizilimleri.....	42
Tablo 2.	Radyolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre tanımlayıcı değerleri.....	47
Tablo 3.	PAT ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri.....	49
Tablo 4.	MTS ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri.....	51
Tablo 5.	ETZ ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri.....	52
Tablo 6.	Gruplarda ölçülen sinir dokusu <i>CASP3</i> , <i>NF-κB</i> , <i>SOD</i> ve <i>XO</i> genleri mRNA seviyelerinin/ <i>β-Aktin</i> mRNA seviyesi oranı.....	55
Tablo 7.	Sinir dokusu biyokimyasal parametreleri.....	56
Tablo 8.	Histopatolojik inceleme bulguları.....	57
Tablo 9.	Histopatolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre tanımlayıcı değerleri.....	57

1. GİRİŞ

Omurilik yaralanmaları ciddi fiziki ve sosyoekonomik sonuçları olan yaralanmalardır (1-4). Travmaya bağlı omurilik yaralanma vaka sayısının görülme sıklığının dünya genelinde yıllık 12-59/1.000.000 birey olarak değişiklik gösterdiğini bildiren yayınlar mevcuttur (5). Başka çalışmalarda da bu oranın 15-45/1.000.000 vaka arasında olduğu gösterilmiştir (6,7).

Omurilik yaralanmaları travmaya bağlı ve travmaya bağlı olmayan olarak iki gruba ayrılmaktadır (8). En sık travmatik sebepler; motorlu araç kazaları, spor yaralanmaları (7), ateşli silah yaralanmaları, delici ve kesici alet yaralanmaları ve yüksekten düşmelerdir (4). Travmaya bağlı olmayan nedenler arasında ise iskemi, infarktüs ve tümörler gösterilmektedir (8). Modern cerrahi tekniklere rağmen omurilik yaralanmalarında genellikle tam iyileşme olmamaktadır. Bazen oluşan omurilik hasarı tam ve kalıcı nörolojik fonksiyon kaybına yol açabilmektedir (1,9,10). Buna rağmen günümüzde henüz bu durumu iyileştirmek için kanıtlanmış terapötik bir ajan bulunamamıştır (11). Akut omurilik yaralanmasının sistemik sonuçları kardiyak verim azalması ve hipotansiyondur. Lokal sonuçları ise hasarlı bölgedeki otonöregülasyon kaybı, gri ve beyaz cevherdeki kanama bölgelerindeki mikro dolaşımın bozulması şeklinde görülmektedir (12). Omurilikte oluşan travmatik hasar, doku nekrozuna bağlı fonksiyonel bozukluklarla sonuçlanan önemli biyokimyasal ve patolojik olaylara neden olabilmektedir. Biyokimyasal reaksiyonlar olarak karşımıza membran fosfolipitlerinin yağ asitlerinin hidrolizi, biyolojik olarak aktif eikozanoidlerin üretimi ve reaktif oksijenlerin oluşumuyla meydana gelen lipid peroksidasyonları çıkabilmektedir. Bu durum ise hücre hasardan sorumlu ana faktör olarak sayılabilmektedir (5).

Omurilik hasarı primer ve sekonder olmak üzere iki seviyeye ayrılmaktadır. Primer hasar, mekanik hasarı, sekonder hasar ise travma sonrası oluşan ilerleyici hücre hasarını ifade etmektedir (2,13). Primer hasardan sonra omurilikte hipoksi, hipoksiden sonra elektrolit dengesizliği, nöronal eksitasyon, glutamat salınımı ve enflamasyon gibi reaksiyonlar meydana gelmektedir (14). Sekonder hasar gelişiminde, serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve apoptozis önemli rol oynamaktadır (1,15). Primer hasarı eksitotoksiste, ödem, enflamasyon, demiyelinizasyon ve gliar skarın takip ettiği bildirilmiştir (15). Sinir iskemisini izleyen reperfüzyon, 'oksijen paradoksu' olarak bilinen

mekanizma yoluyla ortaya çıkabilmektedir. Tüm aerobik organizmalar için oksijen gerekli olmasına rağmen, toksisitesi oksijen paradoksu olarak tanımlanmıştır (16). Edinilmiş veya diğer nedenlere bağlı sinir iskemisi ve iskemi reperfüzyonu (I/R) sonrasında gelişen nekroz, siniri tamamen işlevsiz hale getirebilmektedir (17). Günümüzde omurilik yaralanmalarında kortikosteroidlerin yaygın olarak kullanımına rağmen sekonder hasar üzerindeki etkisi kesin değildir (18), bununla birlikte kortikosteroidlerin yan etkilerinden dolayı (13,19) sekonder hasara karşı nöroprotektif etkileri olan başka ilaç arayışları mevcuttur (1).

Tedavi için en uygun yöntem konusunda fikir birliği yoktur. Nöroprotektif olarak kullanılabilir ajanlar olarak anabolik steroidler, polietilen glikol, magnezyum sülfat, asetil salisilik asit gibi ajanlar ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (20). Steroid olmayan antiinflamatuvar ajanlar, steroidler, sinir büyüme faktörleri, eritropoietin, tiroid hormonu, büyüme hormonu, adrenokortikotropik hormon ve insülin benzeri peptidler řu anda deneysel olarak indüklenen periferik sinir hasarının tedavisinde kullanılmaktadır (21–23).

Bu tezde spinal kord hasarının geç döneminde Melatonin ve Melatonin+ Dexpanthenol kombine tedavi etkisinin moleküler, biyokimyasal ve histopatolojik yönden araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

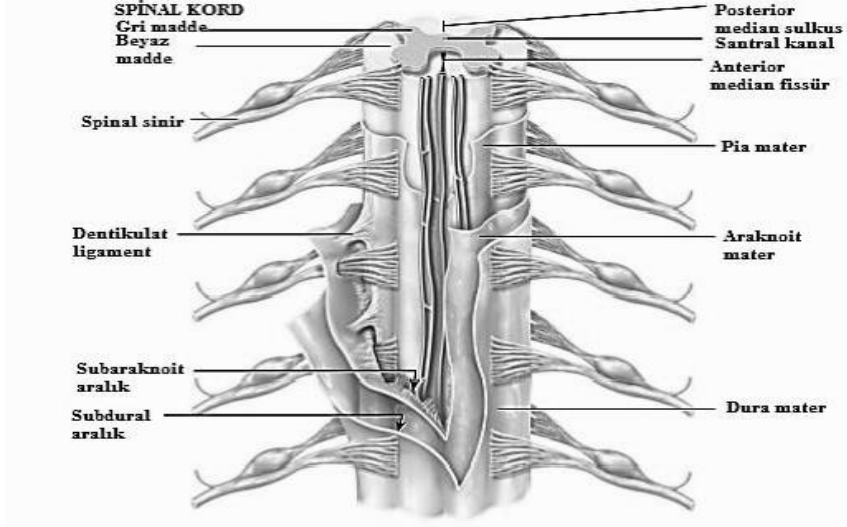
2.1. Medulla Spinalis Anatomisi

Medulla spinalis yaklaşık bir milyon nöron ve daha fazla nöroglıadan oluşan beynin devamı olan merkezi sinir sisteminin bir parçası olarak tanımlanmaktadır (24). Medulla spinalis, iki katman ile korunmaktadır. Bu katmanlardan birincisine kemik çatı (25), ikincisine ise meninksler ismi verilmektedir. Meninksler 3 membran şeklindedir. Ayrıca Beyin Omurilik Sıvısı (BOS) dışarıdan gelen darbelere karşı bir şok emici gibi görev yapmaktadır (24).

Medulla spinalis, beyaz ve gri cevherden oluşan (26), beyazımtırak renkli ve basık silindirik şekilli bir yapıdır (26,27). Medulla oblongata'nın arkasından başlayıp, sakrumun ortalarına kadar uzanmaktadır (27,28). Medulla spinalis, kaudale doğru incelmekte ve conus medullaris oluşturmakta ve filum terminale ismini alarak sonlanmaktadır (25,29). Filum terminale ise kaudale doğru uzanmaktadır. Bu kısım at kuyruğuna benzer bir görüntü verdiği için cauda equina ismini almıştır (24,25,27). Medulla spinalis extremitelere giden sinirlerin çıktığı iki bölgede kalınlaşmaktadır (24,25). İlk kalınlaşma 5. servikal ile 2. torakal vertebra arasında olup, buna intumescentia cervicalis denmekte ve buradan çıkan sinirler plexus brachialis olarak kollara ve göğsün ön ve yan duvarlarına ilerlemektedir. İkinci kalınlaşma ise 4. ve 5. lumbal vertebralar arasında bulunan ve pelvis boşluğu ve bacaklara giden sinirlerin çıktığı intumescentia lumbalis'tir (27,28).

Medulla spinalis, önde fissura mediana ventralis ve arkada sulcus medianus dorsalis ile eşit iki parçaya ayrılmaktadır (25). Medulla spinalis'in dorsolateralinden radix dorsalis'i oluşturan sinir lifleri girerken, ventrolateralinden radix ventralis'i oluşturan sinir lifleri ayrılmaktadır. Radix ventralis'in ve radix dorsalis'in lifleri foramen intervertebrale'de birleşmekte ve n. spinalis'i meydana getirmektedir (25,28). Substantia grisea'nın ortasında nöral tüpün boşluğunu oluşturan kısma canalis centralis ismi verilmektedir (27). Canalis centralis, beyindeki boşluklarının medulla spinalis içinde devam eden kısmıdır. Canalis centralis epandim hücreleri ile kaplıdır ve beyin-omurilik sıvısı ile doludur. Medulla spinalis'in enine kesitinde canalis centralis'in çevresinde gri cevher (substantia grisea) bulunmaktadır. Gri cevher, beyaz cevher (substantia alba) ile çevrelenmiştir. Medulla spinalis kapillar damar ağı ile beslenmektedir. Bununla birlikte

buna yağ doku içindeki büyük venler de katkı sağlamaktadır. Travmatik etkilerden korunmasında zarların ve BOS'un önemli rolü bulunmaktadır (28). Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü Şekil 2.1'de gösterilmektedir.

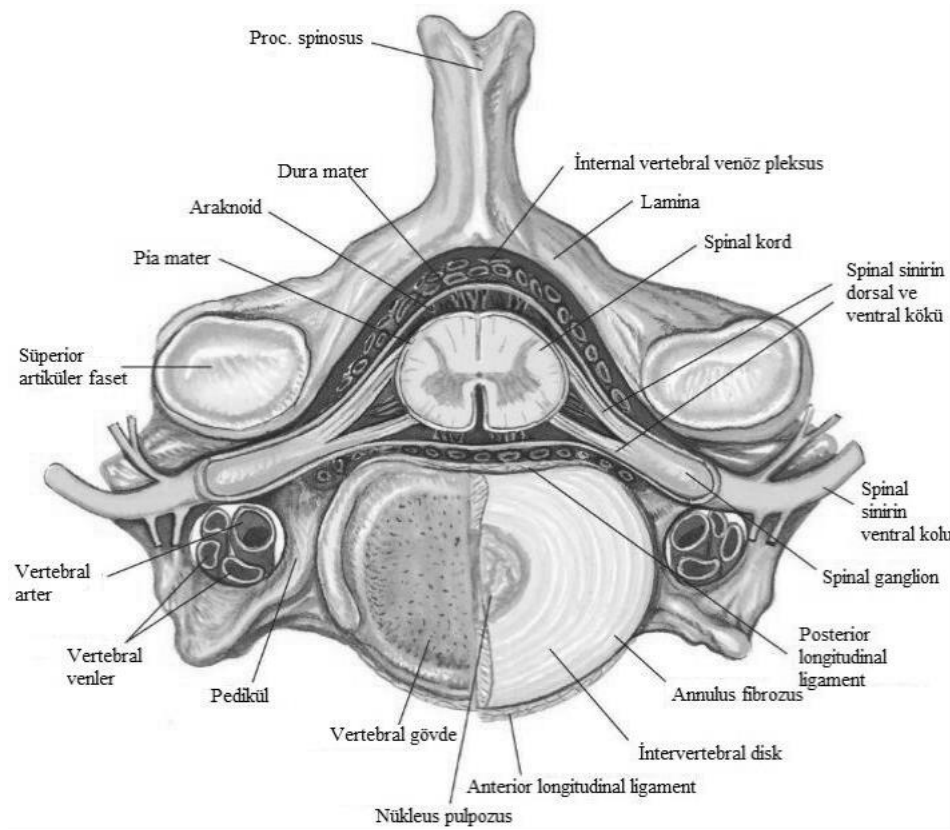


Şekil 2.1. Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü (28)

Gri Cevher glia hücreleri ile myelinsiz sinir hücre gövde ve uzantılarından meydana gelmektedir. Enine kesitinde kelebek veya H harfine benzer şekli vardır (25,27,28). Enine yapının alt ve üst kısmındaki iki çıkıntıya cornu ventrale ve cornu dorsale denmektedir (25,27). Cornu dorsale ve cornu ventrale substance lateralis intermedialis ile birleşerek thoracolumbar seviyede cornu laterale'yi meydana getirmektedirler (25). Gri cevherin, columna dorsalis, columna ventralis ve columna lateralis olarak iki taraflı sütunları bulunmaktadır. Columna dorsalis, somatik ve afferent viseral nöronlarla onların hücre gövdelerinden meydana gelmektedir. Columna lateralis; thoracolumbal bölgede bulunmakta ve visceromotor nöronları içermektedir. Sempatik nöronları taşıyan nucleus intermediolateralis, substantia intermedia lateralis içerisindedir. Columna ventralis ise motor sinirlerden oluşmakta ve motor çekirdekleri bulundurmaktadır (28). Periferik sinirlerden gelen sensöriyal iletiler dorsal boynuzdan girmekte, motor cevaplar ventral boynuzdan çıkmaktadır (26).

Beyaz Cevher inen ve çıkan miyelinli sinir liflerinden meydana gelmektedir (24). Oligodentrositlerden oluşan myelin kılıf beyaz rengin de nedeni olarak gösterilmektedir (27,28). Beyaz cevher, gri cevherin boynuzları ile 3 kordona ayrılmaktadır. Bu kordonlar topografik olarak önem taşımakta ve funiculus dorsalis, funiculus ventralis ve funiculus lateralis'ten oluşmaktadır (27).

Funiculus dorsalis, ağrı, dokunma, basınç ve ısı gibi şuurlu proprioseptif duyuların lokalizasyonlarını ne zaman şekillendiğini ve ne türde olduğunu anlamaya yarayan duyuları nucleus cuneatus ve nucleus gracilis'e ileten afferent yolları kapsamaktadır. Liflerin birinci nöronları unipolar nöronlardır ve ganglion spinalede bulunmaktadır. Periferik uzantıları kas, kemik, eklem, ligament ve tendolarda bulunmaktadır. Alınan duyular önce ganglion spinaleye gitmektedir. Burdan santral uzantıları ile cornu dorsaleden medulla spinalise girmektedirler, çıkan yollar ile medulla oblongataya gelen uyarılar daha sonra talamustaki üçüncü nöronlarına buradan da gyrus postcentralisteki dördüncü nöronlarına ulaşarak, değerlendirileceği merkez olan parietal lob korteksinde sonlanmaktadır (27). Omurganın tam transvers kesit görünümü **Şekil 2.2'** de gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Omurganın transvers kesit görünümü (29)

Nöroglia ektodermal kökenli olup, bağ dokusu işlevlerine sahiptir. Metabolit değişiminde ve patolojik süreçlerde oluşan bozulmuş hücrelerin fagositozunu ve skar

oluşumu sağlayan hücreler olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Astroglia (makroglia), oligodendroglia ve mikroglia olmak üzere üç tip nöroglia bulunmaktadır (25).

Astrositler, büyük ve net bir hücre çekirdeğine sahiptir ve yıldıza benzemektedirler. Astrositler, travma sonrası dokuya destek görevi görmekte, kan damarlarına kadar uzanarak metabolit değişiminde rol oynamakta, merkezi sinir sisteminde iyon dengesinin korunmasını sağlamaktadırlar. Sinir hücreleri tarafından salınan CO₂'yi almakta ve interstisyel pH'ları 7,3'lük sabit bir değerde tutulmasını sağlamaktadırlar (24).

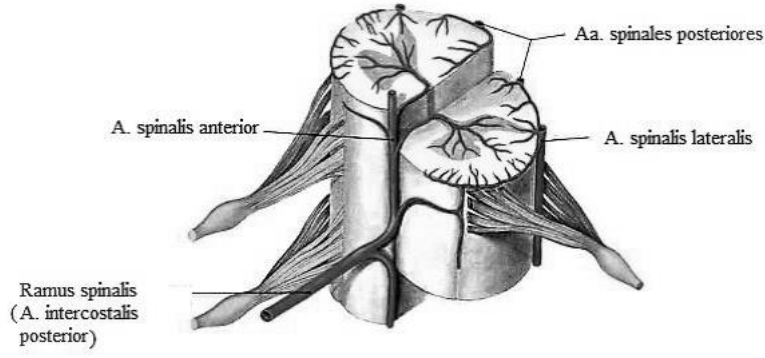
Oligodendrositler, küçük, koyu bir hücre çekirdeğine sahip, myelin kılıfını üreten ve koruyan hücrelerdir (25).

Mikroglialar, oval veya çubuk benzeri bir hücre çekirdeğine sahip, ameboid hareketleri ile beyin dokusuna göç edebilen ve fagositoz yapabilen hücrelerdir (25).

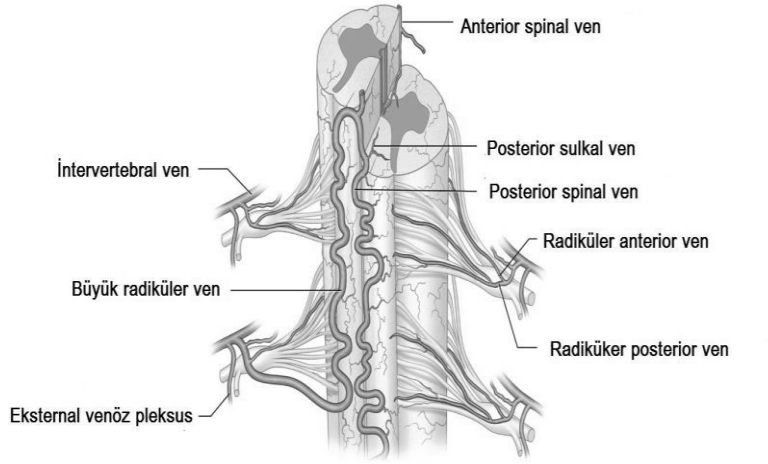
2.1.2 Medulla Spinalis'in Kan Damarları

Medulla spinalis, vertebral arterler ve segmental arterler'den beslenmektedir (interkostal arterler ve lumbal arterler). Vertebral arterler birleşmeden önce, spinal kordun arka yüzeyi boyunca küçük arter ağı oluşturan iki ince posterior spinal arteri vermektedir. Piramidal çaprazlaşma seviyesinde, vertebral arterlerin iki dalı birleşerek anterior spinal arteri oluşturmaktadır ve bu damar ağı omuriliğin ön yüzeyi boyunca dağılmaktadır (25). Segmental damarlar, foramen intervertebrale'den canalis vertebralis'e girmekte ve burada dorsal ve ventral dallara ayrılarak omurilik sinirleriyle birlikte medulla spinalis'e gelmektedir. Medulla spinalis boyunca seyreden a. spinalis ventralis, aa. spinales dorsolaterales olmak üzere 3 damar bulunmakta ve medulla spinaliste plexuslar meydana getirmektedirler (28).

Spinal kordun toplar damarları, bir anterior, iki posterior spinal ven ile belirgin bir ağ oluşturmaktadır. Efferent damarlar spinal kökler boyunca uzanmakta ve epidural venöz pleksusa açılmaktadır(25). Plexus venosus epidurales, omurganın dışındaki plexus venosus'a, sonrasında sırasıyla venae vertebrales, vena cava cranialis, vena azygos veya vena cava caudalis'e açılmaktadır. Cerrahi operasyonlarda plexus venosus epidurales'te kanama meydana gelebilmektedir (28). Medulla spinalis'in arterleri ve venleri sırasıyla **Şekil 2.3.1 ve 2.3.2** de gösterilmektedir.



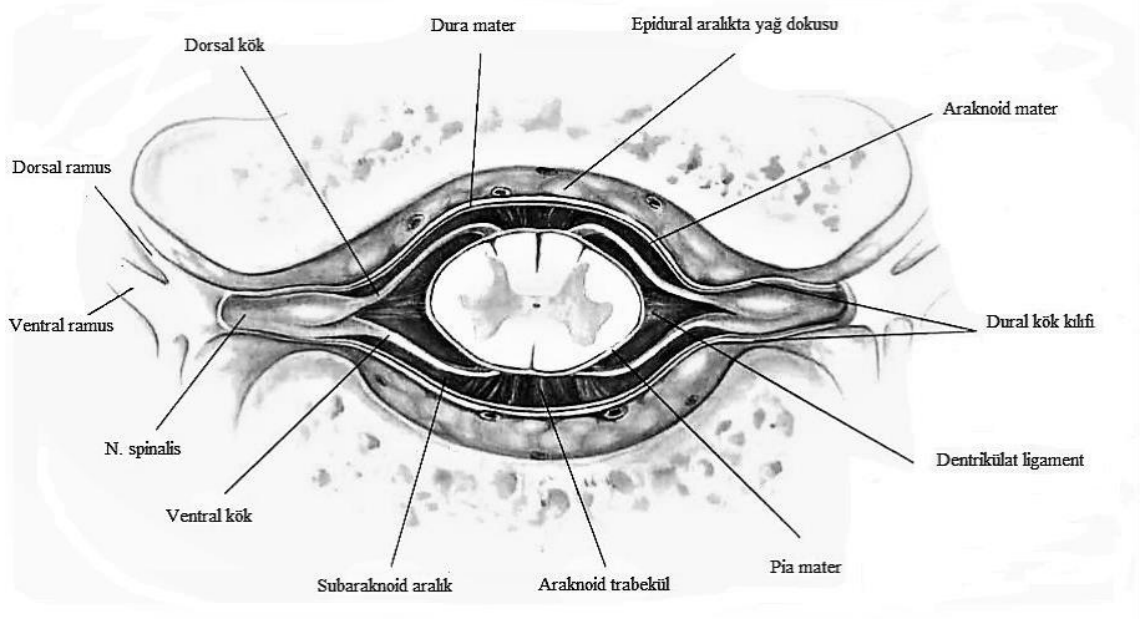
Şekil 2.3.1. Medulla spinalis'in arterleri (30)



Şekil 2.3.2. Medulla spinalis'in venleri (31)

2.1.3 Spinal Meninksler

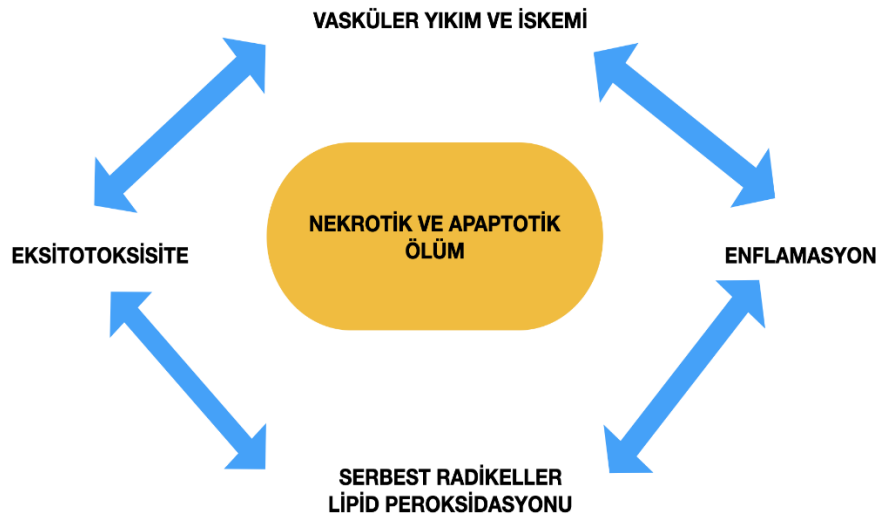
Sert spinal meninks (pachymeninx) diye isimlendirilen spinal duramaterdir. Spinal araknoid ve spinal piamater birlikte yumuşak spinal meninks (leptomeninx) diye isimlendirilmektedir (25). Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı **Şekil 2.4.**'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı (32)

2.2. Medulla Spinalis Hasar Mekanizması

Medulla spinalis hasarı, primer ve sekonder hasar mekanizmalarından oluşmaktadır (12,33). Spinal Kord Hasarı (SKH), nöral dokunun zedelenmesine neden olan direkt mekanik travmaya bağlı olarak primer yaralanma mekanizmaları ve bununla tetiklenen sekonder hasar mekanizmalarını içermektedir (12,26) (**Şekil 2.5**).



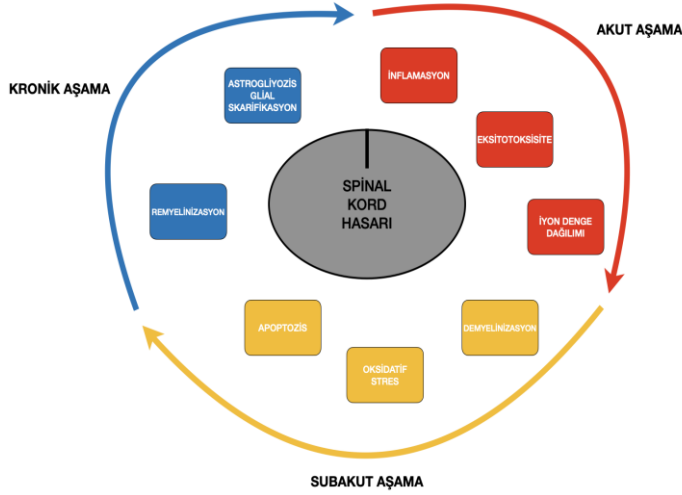
Şekil 2.5. Spinal kord yaralanmasının patofizyolojisi (34)

Primer hasar; direkt mekanik travmaya bağlı olarak n6ral dokunun yaralanması olarak tanımlanmaktadır. Bu ilk hasar gerilme ve kompresyonu içermektedir. Hasar b6lgesindeki kırılmış ve yer değiştirmiş kemik fragmanları, disk materyalleri ve ligament yaralanmaları hem periferde hem de merkezi sinir sisteminde n6ral elemanların direkt kompresyonuna neden olmaktadır. Kan damarlarının zedelenmesi ile, aksonların yapısının bozulması ve n6ral h6cre membranlarında zedelenme oluşmaktadır. Medulla spinalis hasarının ilk dakikaları içerisinde gri cevherde mikrohemorajiler meydana gelmekte ve ilerleyen saatlerde bu kanamalar etrafa dağılmaktadır. Omurilik, dakikalar içerisinde şişmekte ve yaralanma seviyesinde spinal kanalın t6m çapını bu şişkinlik kaplamaktadır. Kordda oluşan bu şişkinlik, ven6z kan basıncını aştığı anda sekonder iskemi meydana gelmektedir. Kan akımı otoreg6lasyonu bozulmakta ve spinal n6rojenik şok, sistemik hipotansiyona neden olmaktadır. Bunun sonucunda ortaya çıkan iskemi daha da şiddetlenmektedir. İskemi sonucu bozulmuş n6ral membranlardan salınan toksik maddeler ve elektrolit d6zeyinde meydana gelen farklılıklar, sekonder yaralanma kaskadını başlatmaktadır (35–37).

Sekonder hasar mekanizmalarının hızla ilerlemesi ile birlikte, iskemik vask6ler bozukluklar, vask6ler otoreg6lasyon kaybı, n6rojenik şok, hemoraji, mikrosirk6lasyonda bozulma, vazospazm ve tromboz oluşmaktadır (12,35–38). Ayrıca biyokimyasal olarak; h6cre içi Ca^{++} artışı, h6cre dışı potasyum artışı ve h6cre içi sodyum birikimi, serotonin, katekolamin ve ekstrasel6ler glutamat, araşidonik asit salınımı, eikasanoid ve serbest radikal artışı ve lipid peroksidasyonu, endojen opiyat artışı, 6dem, enflamasyon, ATP'ye bağlı enerji metabolizmasında bozulma ve apopitoz meydana gelmektedir (39–45). Bunların yanında, akut omurilik hasarı sonrasında, aksonlarda ve n6ronlarda nekroz, miyelin kaybı, kavitasyon oluşması ve infarkt gelişimi de g6zlenmektedir. Omurilik hasarının ilk dakikalarında gri cevherde kanama ve beyaz cevherde 6dem meydana gelmekte, yaklaşık 2. saatte kanama artmakta ve 4. saatte pek çok aksonda şişme g6r6lmektedir (33). Bununla birlikte akut omurilik hasarı belirgin glutamat eksitotoksitesine de neden olmakta, sonuçta n6ronal dendritler hasarlanmakta ve sonra da n6ron 6l6m6 meydana gelmektedir (46).

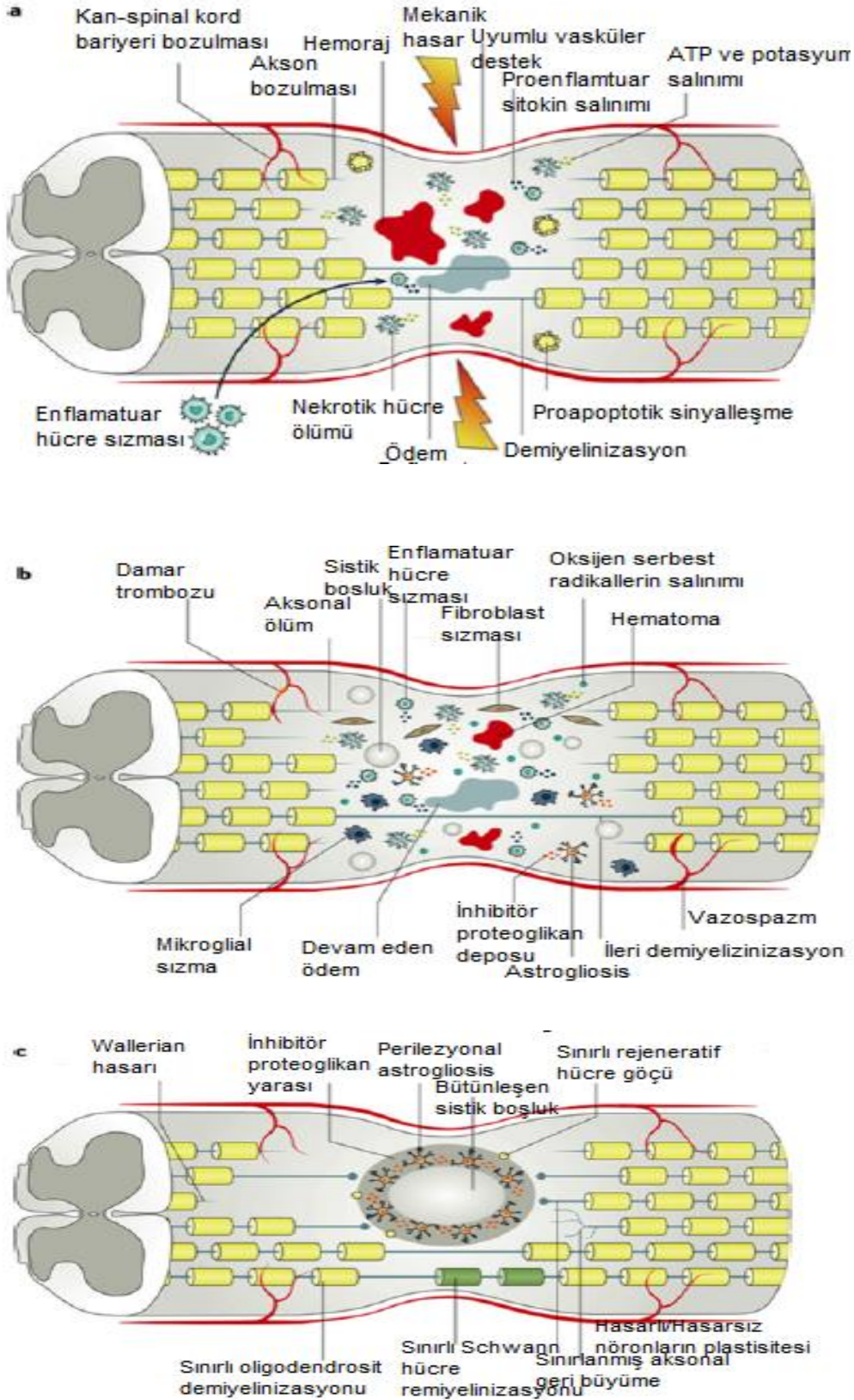
Miyelin kılıf hasarı belirgin olup, 6zellikle b6y6k çaplı miyelinli sinir lifleri travmadan daha fazla etkilenmektedirler (47). Yaralanmayı takiben miyelinli aksonların, miyelinsizlere g6re daha fazla etkilendiği, klip kompresyon metodunda, beyaz cevherde yer alan sinir liflerinin çok daha fazla hasarlandığı rapor edilmiştir (48).

Travmatik SKH, nöronal ve glial hücre zarlarında mekanik hasar, mikrovasküleritede bozulma, iyonik düzensizlik ve proapoptotik sinyallemeyle sonuçlanan ilk travmatik hareket ile karakterizedir (24,49). Bu daha fazla kalıcı hasara ve nörolojik işlev bozukluğuna neden olan ikincil bir yaralanma kaskadını başlatmaktadır. İkincil yaralanma geçici olarak akut (48 saat içinde), subakut (2-14 gün), orta (14 gün-6 ay) ve kronik (6 aydan fazla) aşamalar olarak dörde ayrılmaktadır (Şekil 2.6).



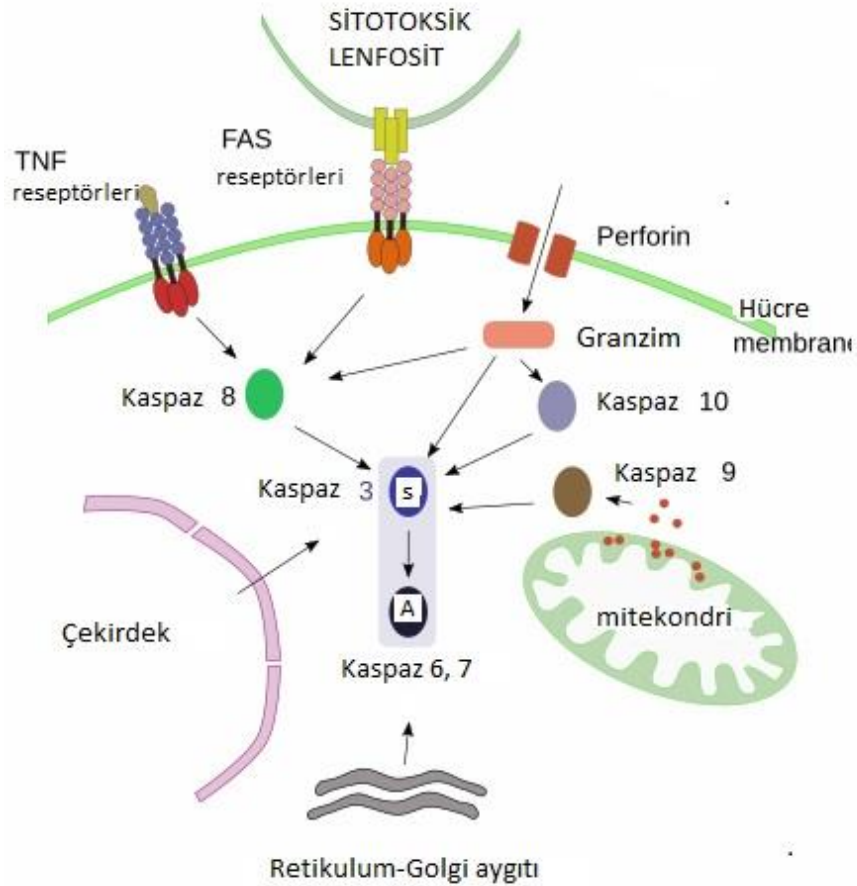
Şekil 2.6. Spinal kord hasarı sonrası aşamalar (7)

Şekil 2.7’de Travmatik SKH’nın patofizyolojisi gösterilmektedir. “(a) Omurilikteki ilk mekanik travma, akut fazda (yani yaralanmadan 0-48 saat sonra) ödem, hemoraji, iskemi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, sitotoksik salınım ile karakterize edilen ikincil bir hasar kaskadını başlatmaktadır. Bu ikincil hasar, demiyelinizasyona ve nöral devrelerin kaybına yol açabilen oligodendrositler gibi nöronların ve glial hücrelerin nekrozuna ve / veya apoptozuna yol açmaktadır. (b) Subakut fazda (yaralanmadan 2-4 gün sonra) devam eden ödem, damar trombozu ve vazospazm nedeniyle daha fazla iskemi oluşmaktadır. Kalıcı inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hücreler ve kordonun hücre dışı yapısı hasar gördükçe daha fazla hücre ölümüne neden olmakta ve kistik mikro boşluklar oluşmaktadır. Ek olarak, astrositler çoğalmakta ve hücre dışı matris moleküllerini perilezyonel alana yerleştirmektedir. (c) Orta ve kronik aşamalarda (2 hafta ila 6 ay), aksonlar dejenere olmaya devam etmekte ve astroglial yara izi, güçlü bir rejenerasyon inhibitörü haline gelmek üzere olgunlaşmaktadır. Kistik boşluklar, aksonal yeniden büyümeyi ve hücre göçünü daha da kısıtlamak için birleşmektedir (50,51,75).



Şekil.2.7. Spinal kord hasarının fizyopatolojisi (a,b,c) (75)

Akut omurilik hasarında, hem nekroz hem de apoptozu içeren, hücresel süreçler meydana gelmektedir (52). Her iki hücre ölüm şekli de iskemi, oksidatif stres ve eksitotoksisite gibi hasarlarla indüklenmektedir. Yaralanmanın çok şiddetli olduğu hallerde, hücreler daha çok nekroza uğramaktadır (53,54). Oligodendrositler, hasarı takiben apoptotik hücre ölümüne hassas hale gelmektedir. Apoptotik sürecin uyarılması ile birlikte Fas ve p75 reseptörlerin artmış üretimi görülmektedir (54). Oligodendrositlerin ölümü aksonlarda demiyelinizasyona neden olabilmekte ve bu durum distal nörolojik fonksiyonun kaybına beraberinde getirebilmektedir (55). Apoptoz, yaralanmadan sonra gelişen sekonder hasarın önemli bir düzenleyicisi olarak karşımıza çıkmaktadır (**Şekil 2.8**) (56, 58). Apoptoz, etkisini iki fazda göstermektedir. Başlangıç fazına genellikle nekroz da eşlik etmekte, geç faz ise daha çok beyaz cevherde görülmektedir. Bu faz daha çok oligodendrosit ve mikrogliaları içermektedir (57).



Şekil 2.8. Apoptozis mekanizması (58)

Lezyon bölgesinde apoptozis yaralanmadan sonraki ilk 6 saat içinde başlamakta ve birkaç gün sonra da bu alanda çok sayıda apoptotik hücre gözlemlenmektedir. Takip eden günlerde, merkez bölgesinde apoptotik hücreler azalırken, primer yaralanma alanından uzaktaki bölgelerde apoptotik hücre ölümü artmaktadır. Bu yeni apoptotik dalga, daha çok beyaz cevherde lokalize olup, yayılımı lezyon merkezinden oldukça uzak alanlara da ulaşabilmektedir (59). Omurilik yaralanmasını takiben gelişen iskemi ve eksitotoksikite gibi durumlarda, apoptoz, dominant dejeneratif süreç olan ve nekroz ile sonuçlanan akut hücre ölüm mekanizması haline gelebilmektedir (51,59).

Travmadan günler veya haftalar sonra dahi görülen apoptozun, oligodendrositlere kadar yayılması (56), apoptoz inhibitörü ilaç kullanımının omurilik travmalarından sonra yeni bir tedavi stratejisi olarak karşımıza çıkabileceğini düşündürmektedir (37,60).

Apoptozun Cystein-containing ASPartate ProteASE (Kaspaz)'ları aktive ettiği bilinmektedir (**Şekil 2.8**). Yaralanma bölgesinden çok uzakta, özellikle aksonların etkilendiği bölgelerde, oligodendrositlerin apoptoza gitmeleri demiyelinizasyon ile ilişkilendirilmiştir (57,61). Ancak bunu tam olarak indükleyen sinyalin ne olduğu bilinmemektedir. Beyaz cevher traktuslarında ölen oligodendrositler ile ilişkili birçok mikroglia rapor edilmiştir (61). Bu mikrogliaların hücre ölümünü düzenleyen mediatörleri salgıladıkları gibi, aynı zamanda oligodendrosit ölümünden sonra ortaya çıkan hücre artıklarını da fagosite ettikleri düşünülmektedir. Aktif mikroglialar TNF- α ve IL-1 β eksprese edebilmektedir. Bununla birlikte oligodendrositler, 2-amino-3 (3 hidroksi-5 metil-izoksazol 4) Propanoik asit (AMPA) reseptörleri tarafından düzenlenen eksitotoksik hücre ölümüne de oldukça hassastırlar (62).

Uzun süreli apoptotik hücre ölümünde, TNF- α ve glutamat reseptörleri arasında güçlü bir etkileşim olabilmektedir (52). Primer yaralanmanın aktive ettiği sekonder hasarlar, temel olarak travma ve iskemi sonucunda oluşan patolojik değişikliklerdir (12,63). Yaralanmadan sonra gri cevherde oluşan hipoperfüzyon, gri cevheri çevreleyen beyaz cevheri de etkilemektedir (38). Hipoperfüzyon, aksiyon potansiyelinin akson boyunca ilerlemesini engellemekte ve spinal şoka neden olmaktadır (39). Sekonder yaralanma sonucu oluşan hasarlı hücreler, aksonlar ve kan damarları toksik kimyasallar salgılamakta ve ortamda biriken bu ajanlar, sağlam komşu hücrelerde de hasar oluşturmaktadırlar. Sekonder hasarı uyaran anahtar moleküllerden biri de glutamat amino asitidir.

Merkezi sinir sistemi (MSS) travmalarından hemen sonra, yaralanma bölgesinde, hücre dışında toksik düzeyde glutamat artışı görülmektedir (64–67). Glutamat, kimyasal

eksitotoksisiteye neden olan yüksek derecede zararlı bir süreçte rol almaktadır. Sağlıklı omurilikte, birçok aksonun uç bölgelerinden de az miktarda glutamat salgılandığı bilinmektedir. Salınan bu glutamat, hedef nörondaki reseptörüne bağlanmakta ve hedef hücrelerde impuls iletimi meydana gelmektedir. Bunun tersine, yaralı spinal kord nöronlarının aksonları ve astrositlerinden salgılanan glutamat miktarı oldukça yüksek olabilmektedir. Yüksek oranda bulunan glutamat, yaralanma bölgesine komşu hücrelerin aşırı uyarımına sebep olmaktadır. Bu durum kalsiyum iyonlarının hücre içine alınmasına neden olabilmekte ve serbest radikal üretimi gibi, bir seri patolojik olayı başlatabilmektedir. Yüksek derecede aktive olmuş bu moleküller, hücre membranlarını ve diğer hücre komponentlerini hasara uğratarak, sağlıklı nöronların ölümüne neden olmaktadır. Eksitotoksisitenin başlangıçta yalnızca nöronları etkilediği kabul edilmiş olmasına rağmen, daha sonraki birçok çalışmada oligodendrositlerin de bu durumdan ciddi oranda etkilendiği açığa çıkarılmıştır (62,67).

Glutamat reseptörleri, oligodendrosit hasarında çok önemli rol oynamaktadırlar. Bu durum omurilik yaralanması sonrası hasarlı aksonların neden demiyelinize hale geldiklerini ve impuls iletiminin bozulmasını aydınlatmaktadır (37). Omurilik yaralanmasını takiben oluşan eksitotoksik hücre ölümü, nihayetinde glia hücrelerini ve özellikle de oligodendrositleri belirgin olarak etkilemektedir (57,62).

Glia hücrelerinde N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptörleri bulunmamaktadır (68). Bu hücrelerdeki eksitotoksisite, AMPA ve Kâinat reseptörleri ile meydana gelmektedir. Hem AMPA hem de Kâinat reseptörlerinin diferansiye olmuş oligodendrositlerde bulunması, nöronlara göre bu hücreleri, kalsiyum iyonuna daha geçirgen hale getirmektedir. Bu durum oligodendrositlerin eksitotoksik hücre ölümüne daha hassas olmalarını açıklamaktadır (48). Özellikle hipoksik çevrede, ekstraselüler glutamat miktarının aşırı artması (69) iyonotropik glutamat reseptörleri olan, NMDA, AMPA ve Kainat reseptörlerinin yüksek oranda uyarılmasına neden olmakta ve bu durum eksitotoksik hücre ölümü mekanizmasını başlatmaktadır (70). Nöronlarda oluşan bu glutamat, AMPA reseptörüne bağlanmakta ve depolarizasyonu başlatmaktadır. Bu durum, voltaj bağımlı sodyum kanallarını aktive etmekte ve depolarizasyon sonucunda intrasellüler sodyum miktarında artışa neden olmaktadır. Bu yanıtın kronikleşmesi, NMDA reseptörlerinin üretimini arttırmakta ve sonuçta oluşan reseptörler de glutamat tarafından aktive edilmekte ve buna bağlı olarak da hücre içi sodyum seviyesinde artış devam etmektedir. Hücre içerisindeki iyonik dengesizlik, klor iyonlarının girişini tetiklemektedir. Bütün bu olaylar sonunda hücrenin osmotik dengesi bozulmakta, hücre

içerisine su girişi olmakta ve sonuçta da hücrede litik değişiklikler meydana gelmektedir (48,70).

Omurilik yaralanmasının akut patofizyolojisinde, lipid peroksidasyonu hem hipoperfüzyonun başlangıcında hemde reperfüzyon aşamasında rol oynamaktadır. Reperfüzyon aşamasında oynadığı rolün daha ciddi olduğu bildirilmiştir (71). Malondialdehit (MDA) gibi oksidatif reaksiyonların ürünleri, omurilik yaralanmasından sonra ortamda hızla artmaktadır (72).

Serbest radikaller, çiftlenmemiş elektronlara sahip moleküller olduğu için proteinlere, lipidlere ve DNA'ya karşı yüksek derecede reaktiftirler. Ortaya çıkan serbest radikaller, hücre membranlarındaki yağ asitlerinin ilerleyici oksidasyonuna yani lipid peroksidasyonuna neden olmakta ve bu oksidasyon süreci, daha çok serbest radikal oluşumunu tetikleyerek hücre yüzeyinde reaksiyonun yayılmasını beraberinde getirmektedir. (72). Oluşan oksidatif stres, mitokondriyal solunum zinciri enzimlerini etkisiz hale getirmekte, DNA'yı ve DNA ile ilişkili proteinleri değiştirmekte ve Na-K ATPaz'ı inhibe ederek metabolik bozulmayı artırmakta sonuçta da apoptotik hücre ölümleri ve nekroz oluşmaktadır (55,73).

Omurilik yaralanmasını takiben ilk birkaç gün içinde reperfüzyon, hücre hasarı oldukça artırmaktadır. İskemi süresince endotelial hücrelerdeki ksantin dehidrogenaz proteolizise neden olmaktadır. Başka bir enzim olan ksantin oksidaz normalden farklı olarak, elektronları moleküler oksijene aktarmaktadır. Endotel hücrelerinin aşırı oksijene maruz kalması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) ortaya çıkmasına neden olan enzimatik reaksiyonları oluşturmaktadır (55). Ortaya çıkan yüksek orandaki reaktif oksijen türleri nekrotik hücreler (74) ve nötrofillerdeki ROT'la birlikte (75) hücre ölümü için çok güçlü bir uyarı meydana getirmektedir. ROT, merkezi sinir sistemi hücrelerinde lipid, protein ve nükleik asitleri etkileyerek hücre hasarı arttırabilmektedir (48).

2.2.1. Kaspaz Sistemi

Kaspazların apoptozisteki rolleri ilk olarak *Caenorhabditis elegans*'ta hücre ölümü için gerekli gen ürünü olan CED-3'ün memelilerde ki interlökin-1 β -dönüştürücü enzim (ICE veya kaspaz-1) ile ilişkisi keşfedilmesiyle anlaşılmıştır (76). Kaspazlar, apoptozisde hem başlatıcı pro-apoptotik sinyallere yanıt olarak ortaya çıkar hem de hücre yıkılmasında görev almaktadırlar (77). Apoptozisde Kaspaz sistemi tarafından yürütülen iki yol bulunmaktadır. Birincisi; İntrensik (Mitokondriyal) Yol, ikincisi Ekstrinsik (Ölüm Reseptörleri) Yoludur. İntrensik Yol; dış mitokondri zarının geçirgenliğinin artması ve

pro-apoptotik bir kısım faktörlerin sitozole salınması ile oluşmaktadır (78). Bu faktörler arasında Cyt c, AIF (apoptozis indükleyici faktör), EndoG ve Smac/Diablo bulunmaktadır (79). Sitotoksik maruziyete uğrayan hücreler de Bcl-2 ve Bcl-2 ile ilgili proteinlerin etkisinde mitokondri içinde yer alan moleküller sitozole salınmaktadır. Bax gibi proteinler dış mitokondri zarında delikler açmakta, geçirgenlik artırmakta ve bunun sonucunda mitokondri membran geçiş kontrolü bozulmaktadır. Sonuçta mitokondri şişmekte ve dış zar tamamen parçalanmaktadır (78,80). Ekstrinsik Yol; TNF reseptör ailesinin görev aldığı yoldur. Bu reseptörler ölüm reseptörü olarak bilinir. (81). TNF veya ilgili ölüm reseptörlerinin uyarısı ile reseptörün sitozolik C-terminalinde ölüme sebep olan sinyal kompleksi (DISC) olarak bilinen kompleks bir protein oluşmaktadır. Bu protein kompleksi, pro-Kaspaz-8'i DISC'e alan Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain (TRADD) protein ve Fas-associated death domain (FADD) protein gibi adaptör proteinleri barındırmaktadır. Adaptör proteinlerinin uyarısı ile pro-Kaspaz-8, Kaspaz-8'e dönüştürülmektedir (82).

Ekstrinsik veya intrinsik yollarda Kaspaz aktivitesi en fazla ölçülen Kaspaz-3'tür. Kaspaz-3 hem mitokondriyal hem de reseptör aracılı apoptoziste görev almaktadır. Apoptotik herhangi bir uyarı geldiğinde prokaspazlardan 2, 8, 9 aktive edilmekte ve bunlarda Kaspaz-3'ün zimojen formunu aktif hale getirmektedir. Aktifleşen Kaspaz-3 ise hücrenin iskelet proteinleri, nükleer bileşenleri, DNA metabolizmasında bulunan proteinleri parçalayarak apoptozisi başlatmaktadır (83).

Kaspaz-3 enziminin MSS yaralanmalarında görülen apoptoziste en önemli enzim olduğu bildirilmiştir (83). İskemi sonrası hücre ölümü kaskadının en önemli düzenleyici enzimleri olarak karşımıza Kaspaz-3 ve Kaspaz-1 enzimleri çıkmaktadır. Hücre ölümü üzerine, Kaspaz-1 inhibitörlerine göre Kaspaz-3 inhibitörleri daha etkili olmaktadır (84).

Apoptozis DNA hasarı, büyüme hormonu azalması, hipoksi veya sitotoksik ilaç kullanımında indüklenmektedir (84). Oksidatif stres sonucu oluşan apoptozisin mekanizmaları arasında reseptörlerin uyarımı, Kaspaz aktivasyonu, Bcl-2 proteinlerinin aktivasyonu ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu yer almaktadır (85).

İskemik yaralanma sonrasında omurilikte, nöronlarda ve glial hücrelerde apoptozis görülmektedir. İskemi sonrasında genetik kontrolle aktive olan Kaspazlar, apoptozisten sorumlu olarak değerlendirilmiştir. Kaspaz-3 enzim aktifliğinin apoptoziste önemli rolü bulunmaktadır. Efektör Kaspaz olarak bilinen Kaspaz-3, DNA tamir mekanizmasında yer alan moleküllerin ve enzimlerin parçalanmasında başlıca rolü oynamaktadır. (86). Apoptozis sırasında, mitokondriyal değişikliklerle ilişkili olan

Kaspaz aktivasyonu sitoplazmadaki en önemli belirleyici faktördür. Kaspaz aktivasyonunun ardından yapısal proteinlerin (fodrin, aktin, lamin A-B vb.) yıkımı başlamaktadır (56). Kaspazlar apoptozisde hücreyi parçalayan etkenler olarak bilinmektedirler (56,87). Kaspazlar sistein proteazlardır. Aspartik asitten sonraki peptit bağını kırmaktadırlar (88). Kaspazlar hücreleri etraflarından izole etmekte ardından çekirdeğin yapı proteinlerini ve enzimlerini parçalayarak etkisizleştirmektedirler. Sonunda da DNA tamirini ve replikasyonunu sonlandırmaktadırlar. Bu süreçte DNA tahrip edilmekte, çekirdek yapısı bozulmakta, fagositoz için gerekli hücre sinyalleri üretilmekte ve son olarak apoptotik cisimcikler hücrede bozulmayı sağlamaktadırlar (89). Kaspaz aktivasyonu olan hücrelerde, ölüm şekli apoptozisten nekroza dönüştüğü düşünülürse, Kaspaz aktivasyonunun apoptozisdeki önemi daha net anlaşılmaktadır. Sonuçta Kaspaz aktivasyonu olmadan apoptozis olmamaktadır (89).

Omurilik yaralanmalarında hücre ölüm mekanizması sekonder olaylara bağlı olarak gerçekleşmektedir ve bu Kaspaz-3 ve Kalpainle yapılmaktadır. Hücre hasarında, yaralanmadan yaklaşık 4 saat sonra, mitokondrinin zarar görmesiyle nöronlardan aşırı miktarda Kalpain salınımında artış görüldüğü bildirilmiştir (90,91).

Apoptozisin nekrozun bir parçası gibi algılanabilmesinin sebebi hücrede yarattığı değişikliklerdir. Apoptozisi indükleyen en önemli iki faktör oksidatif stres ve DNA hasarı olarak karşımıza çıkmaktadır. Eğer hücre ciddi olarak hasar görürse apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamadığı için nekroz ile ölecektir (92). Nöronlarda, miyelinli sinir liflerinde ve gliya hücrelerinde yapısal dejenerasyonların meydana geldiği tespit edilmiştir. Yaralanmadan 72 saat sonra alınan doku kesitlerinde, bu hücresel değişikliklerin daha belirgin olduğu gözlenmiştir (93). Spinal kord hasarı sonrası Kaspaz sisteminin etkisini sıçanlarda inceleyen Matsushita ve ark., nöronlarda belirgin Kaspaz 8 aktivasyonu tespit etmişlerdir (94). Keane ve ark., sıçanlarda T9-T10'da bir kontüzyon hasarının, gri cevher nöronlarında ve beyaz cevher hücrelerinde (muhtemelen oligodendrositler) yaralanmadan 6 saat sonra Kaspaz-8 immünoaktivitesinin ortaya çıkmasına yol açtığını göstermiştir (95).

2.2.2. Redükte Glutasyon (GSH)

γ - glutamylcysteineylglycine, ökaryotik hücrelerde bulunan çok işlevli bir substrattır. Redükte glutasyon glisin, glutamik asit ve sisteinden meydana gelen bir tripeptit olup bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda hücrede sitozolde fazla bulunan hücre içi tiyoldür (96). Tiyol-disülfid dengesi, enzim aktivitesi, taşıma aktivitesi, sinyal iletimi ve gen ifadesi dahil olmak üzere çok sayıda metabolik süreci düzenlemektedir (97).

GSH'nın γ -glutamyl bağı ve sülfhidril (-SH) grubu olmak üzere yapısal iki karakteristik özelliği olup hücrenin en önemli tiyol-disülfür redoksudur (98). GSH, ksenobiyotiklerin detoksifiye edilmesinde, ROTun ortadan kaldırılmasında antioksidan olarak çok yönlü fizyolojik işleviyle bilinmektedir (99).

Redükte glutasyonun antioksidan savunma sistemindeki görevi dışında başka pek çok görevi de bulunmaktadır. Bunlar arasında; bazı enzimatik tepkimelerde koenzim görevi görmesi, proteinlerdeki sülfidril gruplarının redükte tutulması, aminoasit taşınması ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu olarak sayılabilmektedir. Redükte glutasyon, glutasyon peroksidaz enzimiyle katalizlenen tepkime ile, hidrojen peroksit veya lipid peroksitleri detoksifiye etmektedir. Daha sonra kendisi başka bir glutasyon molekülü ile disülfid köprüsü oluşturmakta ve okside glutasyon (GSSG) biçimine dönüşmektedir. Okside glutasyonun redükte formuna geri dönüştürülmesi hücre içinde serbest radikallerin detoksifikasyon işleminin devamı için gerekmektedir. Okside glutasyon, NADPH ile glutasyon redüktaz enzimi kullanılarak tekrar redükte formuna çevirmektedir (100). Bu tepkimeler sırasında hücre, GSH miktarını fazla muhafaza edemez ise hücre ölümü olabilmektedir (101).

Glutasyon, hidroksil radikali ve singlet oksijeni direkt olarak yakalamakta, glutasyon peroksidazın katalizörlüğünde hidrojen peroksit ve lipid peroksitleri detoksifiye etmektedir. Bunların dışında, E ve C vitamini gibi önemli bazı antioksidanları aktif formlarına dönüşecek şekilde rejenere etmektedir (98).

Lucas ve ark., bir sıçan kontüzyon yaralanma modelinde glutasyon tedavisinin SKH sonrası lipid peroksidasyonu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Araştırmacılar, δ -glutamilsistein ile irrigasyon yoluyla glutasyon seviyelerinin yükselmesinin, SKH'dan sonra lipid peroksidasyonuna karşı önemli bir koruma sağladığını, glutasyon güçlendirmesinin, SKH'de lipid peroksidasyonunun aracılık ettiği hasarın azaltılması için etkili bir strateji olabileceğini öne sürmüşlerdir (102).

2.2.3. Malondialdehit (MDA)

MDA, yüksek derecede sitotoksik ürüne dönüşmüş bir lipid radikaldır. Aldehid grubundandır. Lipid radikalleri doymamış yağ asitlerinden meydana gelmektedir. Lipid radikali oksijen ile reaksiyona girince lipid peroksi radikali oluşmaktadır. Bu radikal, diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatabilmektedir. Ortamda bulunan bakır ve demir iyonlarının katalizör etkisi ile lipid hidroperoksitler oluşmaktadır (103).

Lipit peroksidasyonu, fazla miktarda ROT üretiminin önemli bir neticesidir. MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin lipit peroksidasyonu sonucu meydana gelmektedir. Bir oksidatif hasar belirteçidir. Organ, kan ve dokularda lipit peroksidasyonunun etkileri belirebilir. Bunun nedeni aldehit yapıları bileşimlerin ömürlerinin uzun olmasından kaynaklanmaktadır (104).

Oksidatif stres ve serbest radikallere bağlı hücre hasarında bilhassa mikrozom, endoplazmik retikulum ve mitokondride patogenezin en mühim aktörü lipid peroksidasyonudur (105,106). Bu organellerde lipid peroksidasyonunda hücre ve doku yollarının zarara uğraması serbest radikal ve oksidatif strese sebebiyet vermektedir (107).

Christie ve ark., yaptıkları hayvan çalışmasında MDA seviyeleri ile ölçülen oksidatif stresin, sıçanlarda akut SKH'den sonra 5 güne kadar devam ettiğini göstermişlerdir (108).

2.2.4. Ksantin Oksidaz (XO)

XO, nükleik asitlerden pürin türevlerinin bozunma yolundaki son enzimdir ve oksijen radikallerinin en iyi ortaya konulmuş biyolojik kaynağıdır (108). XO enzimi oksijeni indirgeyerek süperoksit ve hidrojen peroksit gibi ROT'ları oluşturabilmektedir.

XO aktivitesindeki artış ROT üretimini arttırmaktadır. Özellikle hasarlı dokularda bu enzimin arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla XO'nun pro-oksidatif bir enzim olduğu kabul edilmiştir (109).

XO'nun endojen ve eksojen ksenobiyotiklerin katabolizmasında da rolü olduğu bildirilmiştir (110).

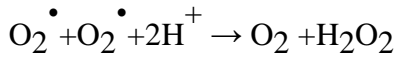
Travmatik SKH patogenezi ile ilişkili diğer potansiyel ROT biyolojik kaynakları; çözünür hücre bileşenleri, sitozolik oksidazlar, geçiş metalleri, lizozomlar, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumdur. Katalitik döngülerinde moleküler oksijenin indirgenmesi yoluyla ROT üretebilen birçok sitozolik enzim vardır. Ancak en dikkate değer olanı, moleküler oksijeni doğrudan süperoksit ve hidrojen peroksite indirgeyen ksantin oksidazdır (111).

Oksidatif stres ve enflamasyon, travma veya iskemi reperfüzyon hasarı sonrası Spinal kord sekonder hasarının altında yatan ana mekanizmalardır (112). Başlangıçta süperoksit serbest radikalleri ($O_2^{\bullet-}$), sızan nötrofiller ve makrofajlar, monoamin oksidaz-B aktivitesinin aşırı aktivasyonu, dopamin, norepinefrin dahil biyojenik amin nörotransmitterlerinin oto-oksidasyonu ve ksantin oksidaz aktivitesi artışı çeşitli kaynaklara göre travmadan sonraki ilk dakikalar ve saatler içinde meydana gelmektedir. Bunların tümü, zar lipid peroksidasyonuna, oksidatif hasara ve kendi kendine çoğalan bir döngüde daha fazla ROT üretimine yol açmaktadır. Gerçekten de, spinal kordun oksidatif stres hasarının şiddetini XO'nun aracılık ettiği ROT oluşumu ve akabinde meydana gelebilen MDA'nın etkilediği bildirilmiştir (113).

1968 Yılında McCord ve Fridovich sitokrom c nin ksantin oksidaz ile indirgenmesinde ROT üretildiğini gösterdiler (114). 1980'lere kadar iskemi reperfüzyon hasarının ROT ile ilişkisi bilinmiyordu (115) Son zamanlarda, XO'nun makrofajların uyarılması da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik sinyallerin iletiminde de işlev gördüğü gösterilmiştir (116).

2.2.5. Süperoksit Dismutaz (SOD)

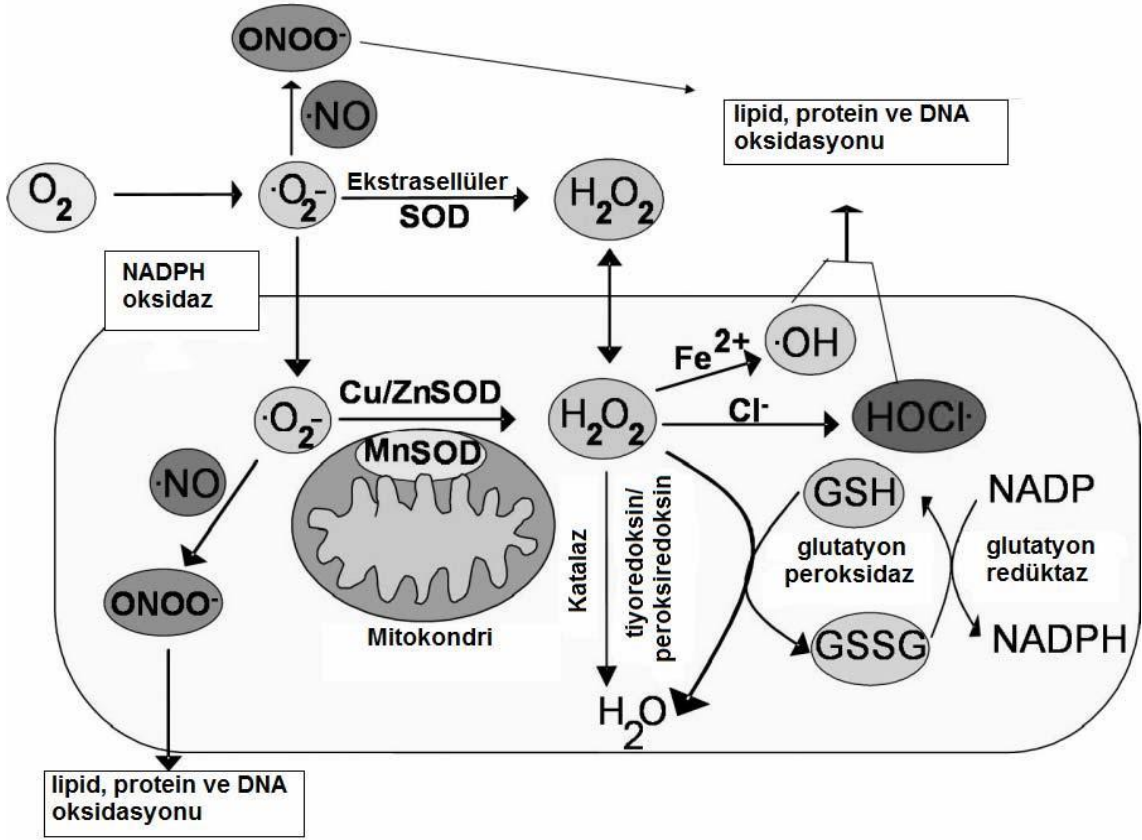
Antioksidan savunmanın birinci aşaması süperoksitin H_2O_2 'e ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalizleyen süperoksit dismutaz enzimidir (99).



Süperoksit dismutazın katalizlediği tepkimenin hızı, kendiliğinden gelişen tepkimenin takribi 4000 katıdır. Enzimin fizyolojik olarak işlevi; hücreler oksijeni metabolize ederken meydana gelen süperoksit serbest radikallerinin zararlı tesirlerine karşı hücreyi korumaktır. SOD etkinliği, fazla oksijen kullanan dokularda yüksektir ve dokudaki pO_2 artışı ile artmaktadır. Olağan metabolizma sırasında hücrelerde fazla miktarda süperoksit üretilmesine rağmen, bu enzim hücre içi süperoksit düzeylerinin düşük tutulmasını sağlamaktadır. Süperoksit dismutazın hücre dışı etkinliği düşüktür (99,117,118).

Memeli hücrelerinde SOD'un; Mn-SOD, CuZn-SOD ve hücre dışı SOD olmak üzere üç formunu vardır (**Şekil 2.9**). Mn-SOD en çok mitokondride bulunurken, CuZn-SOD sitoplazmada baskındır. SKH'yı takiben ROT'un ortadan kaldırılması, özellikle hücresel antioksidan glutatyon ve CuZn-SOD tarafından yapılır. Grabitz ve ark., yaptıkları çalışmada CuZn-SOD genini aşırı eksprese eden transgenik farelerin, SKH'ye

direnç gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Bu da CuZn-SOD'un spinal nöron ölümüne karşı korunmada önemli bir rolü olduğunu göstermektedir (119).



Şekil 2.9. Memeli hücrelerinde SOD'un formları (120)

Hücredeki ilk detoksifikasyon enzimi ve en güçlü antioksidan olan SOD, ROT'a karşı ilk sırada yer alan savunma sisteminin bir parçası olarak görev almaktadır (121). Bu nedenle, hücrede SOD'un yeterli miktarda bulunması, hücre içi düzenlemede ve oksidatif stresin azaltılmasında çok önemli bir yer tutmaktadır. Birçok araştırma Melatonin'in (Mel) SOD gen ifadesini ve aktivitesini arttırdığını bildirmiştir (122).

SKH'da serbest oksijen radikalleri endotel hasarına neden olmaktadır. Buna bağlı olarak kan-omurilik bariyeri bozulmaktadır. Bunun sonucunda yaralanma bölgesine zararlı maddelerin birikimi olabilmektedir. MSS'de glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve SOD aktivitelerinin az olması nedeniyle MSS'nin serbest radikal hasarına daha karşı hassas olduğu bildirilmiştir (123).

2.2.6. Nüklear Faktör Kappa B (NF-κB)

NF-κB; yangı, doğal bağışıklık, hücre büyümesi ve hücre ölümü de dahil olmak üzere hücrel cevaplarda önemli olan çeşitli genlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan ve oksidatif strese oldukça duyarlı olan bir transkripsiyon faktörüdür. Yangısal süreç sırasında, yangı ile ilişkili genlerin uyarılması, NF-κB aktivasyonu ile oluşabilmektedir. NF-κB temel olarak tüm hücrelerde hemen hemen ifade edilebilmektedir. Aktivasyonundan sonra NF-κB çekirdeğe geçmekte ve proinflamatuar genlerin transkripsiyonunu düzenleyecek olan spesifik elementlere bağlanmaktadır (124).

Günümüzde yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir ki spinal kord hasarı sonrası NF-κB, sekonder hasarın patofizyolojik mekanizmasında inflammatuar yanıt ve hücre ölümünde görev almaktadır (125,126). Spinal kord hasarında rol alan proinflamatuar IL-6 ve IL-8 etkinliği NF-κB tarafından düzenlenmektedir (127). Sinir sistemi hasarı sonrası astrositlerin aktivasyonu ve glial hasar oluşumunda NF-κB'nin rolü olduğu gösterilmiştir (128,129). Oluşan bu glial skar omurilikte oluşan en belirgin konak reaksiyonlarından biri olup burada astrositler aktive olmakta, çoğalmakta ve yaralı doku ile sağlam doku arasında uzun içiçe geçmiş arayüz oluşturan hücreler meydana gelmektedir (128).

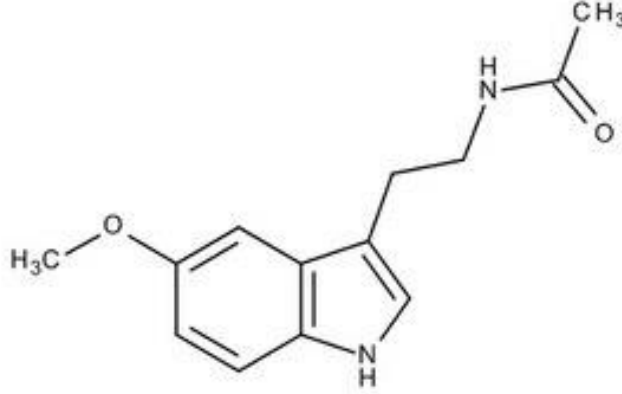
NF-κB uyarımı klasik ve alternatif olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Klasik yol NF-κB1 (p50/p105) tarafından başlatılmaktadır. Alternatif yol ise NF-κB2 (p52/p100) tarafından başlatılmaktadır. Aktif NF-κB nükleusa transloke olmadan önce, aktif p50 ve p52 alt ünitelerine dönüşmektedirler (130). p100 fosforilasyon ile bölünerek p52'yi oluşturur, p105 ise bölünerek p50'yi oluşturur (131).

Aktive NFκB, hücre büyümesi, diferansiyasyonu, sitokin hazırlanması ve salınması, hematopoez, transformasyon, apoptoz, proliferasyon, immün sistem, invazyon, anjiogenez ve metastaz ile ilgili birçok sayıda gen ekspresyonunu kontrol etmektedir (131,132). Aktive edilmiş NF-κB fosforilasyon, asetilasyon ve metilasyon gibi birçok posttranslasyonel modifikasyona uğramaktadır. Bu modifikasyonlar NF-κB aktivitesini gücünü ve süresini belirlemektedir (130).

Travma sonrası NF-κB bağlı genler yüksek oranda aktive olarak sinir sisteminde iyileşme etkilerine öncülük etmektedir (133). Astroglial NF-κB inhibe edilmiş transgenik hayvanlarda spinal kord hasarının fonksiyonel iyileşme sürecinde gelişme olduğu gösterilmiştir (134). NF-κB ve alt yolağındaki sitokinlerin (IL-1β, IL-18, TNFα) spinal kord hasarının sekonder sürecindeki rolünden dolayı inhibitör çalışmaları yapılmış ve iyileşmede pozitif etkileri tespit edilmiştir (135).

2.3 Melatonin (Mel)

Mel, Pineal bezden salgılanan en önemli hormondur. Epifiz bezinde triptofan aminoasitlerinden sentezlenmekte ve plazmada proteinlere bağlı olarak bulunmaktadır (22). Molekül formülü $C_{13}H_{16}N_2O_2$ ve molekül ağırlığı 232,278 g/ mol dur (**Şekil 2.10**). Böbrekte de metabolize olmaktadır ancak daha fazla karaciğerde metabolize olmaktadır. Başlıca metaboliti 6- Hidroksimelatonin sülfat (6-HMS)' dir (136).



Şekil 2.10. Melatoninin kimyasal formülü

Birçok antioksidan ve serbest radikal süpürücünün iskemik ve reperfüzyon hasarında yararlı etkileri bulunmaktadır. Mel, güçlü bir antioksidan olup direkt olarak radikal süpürücüdür (137). Lipofilik özelliğindedir (138,139). Bu sayede hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabilmekte, kan-beyin bariyerini geçebilmektedir. Dokuda oluşabilecek hasarlara karşı koruyucu özelliği kanıtlanmıştır (140).

Ekzojen Mel'in 20-60 dakikalık kısa bir metabolik yarı ömrü vardır. Mel, en gelişmişinden en ilkeline (tek hücreli algler) kadar bütün aeorbik organizmalarda bulunan bir moleküldür. Yaşa bağımlı dejeneratif olayları engellemede serbest radikal tutucu özelliğinden dolayı yararlı olabilmektedir (141).

Mel'in salgılanma hızını çevrenin aydınlık veya karanlık olması belirlemektedir (141). Işık Mel salgılanma hızını azaltmakta, karanlık ise artırmaktadır. Mel'in pineal bezden başka bağırsak, retina gibi organlarda da sentezlendiği gösterilmiştir ancak bunların kan Mel düzeyine etkisi neredeyse yok denecek düzeydedir (142). Mel sentezlendikten sonra kana, beyin omurilik sıvısına, tüm dokulara ve tüm biyolojik sıvılara dağılmaktadır. Bu lipofilikliğinin çok yüksek olmasından dolayıdır (136). Gebelerden fetüse ve emziren anneden süt yoluyla yeni doğana geçebilmektedir. Yaşlanma ile pineal bezden Mel salgılanması azalmaktadır ve apoptozis artmaktadır (143). Ekzojen Mel uygulaması apoptozisi inhibe edebilmektedir. Ayrıca yaşlanmayla

artan hasarlanmış, fonksiyonları bozulmuş hücrelerde koruyucu rol de oynayabilmektedir. Mel, güçlü bir endojen antioksidandır (144).

Mel molekülü hidroksil radikali üreten reaksiyonlara katılmaz, otooksidasyona uğramaz ve kolaylıkla oksitlenmez. Serbest radikal süpürücü özelliğinin tüm antioksidanlardan (glutasyon, mannitol, vitamin E, C vb.) daha güçlü olduğu keşfedilmiştir (145). Mel'in hidroksil radikalini nötralize etme özelliği mannitolden 15 kat, glutatyondan 5 kat daha yüksektir. Peroksit radikalini, E vitamininden 2 kat daha fazla güçlü olarak süpürür (146,147).

İmmün yanıtı artırıcı etkisi yaşlanmaya bağlı immün yetersizliklerde de gösterilmiştir (148). Pineal bezin tümör büyümesini engelleyici özelliğe sahip olması bilinmektedir. Pineal bezin kanser önleyici etkisi büyük oranda Mel'den kaynaklanmaktadır. Mel, göğüs kanserinde rol alan hormonların azalmasını sağlamaktadır (149). Pinealektomi yapılmış sıçanlarda, oksidatif hasarın arttığı, buna bağlı olarak deneklerin ortalama yaşam sürelerinin azaldığı gözlenmiştir (148). Sıçanlarda Mel uygulaması yaşam süresinde %25' lik bir uzamayı sağlayabilmekte, seksüel aktiviteleri artırabilmekte ve hayvanları daha sağlıklı, genç ve güçlü yapabilmektedir (139). Mel'in güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidan olması ve hücre içi kalsiyumu düzenleyebilmesi, iskemi-reperfüzyon hasarında etkili olabileceğini düşündürmektedir (150–153). Mel çeşitli nöroprotektif etkilere sahiptir ve beyin omurilik sıvısında bolca bulunmaktadır (154). Birçok çalışmada Mel'in spinal hasar sonrası sinaps ve nöron gövdesinde yararlı etkileri özellikle hücre içi organellerin ve mitokondrinin korunmasında ki etkileri gösterilmiştir (155,156). Mel, mt-1 mRNA miktarının artmasını sağlayarak prooksidatif enzim miktarlarının azalmasına neden olmaktadır ve hücrel antioksidan savunma sistemini uyarmaktadır (157). Jiagi bi ve ark., 2020 yılında yaptıkları çalışmada Mel'in NF- κ B ve GAP-43 mRNA sentezini arttırarak sinir lifi iyileşmesine katkı sağladığını göstermişlerdir (158).

Düşük oksijen, kanser ilaçları, gamma ve ultraviyole ışınlar, radyasyon gibi etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirebilmektedirler (159). Mel'in antioksidan enzimleri aktifleştirmesi sonucu oluşan iskemiye bağlı hücrel hasarı önlediği bildirilmiştir (160). Mel'in nöronal hasarı önlemedeki etkinliği omuriliğin yaralanması sonucu artan lipid peroksidasyonunu azaltarak olduğu gösterilmiştir (161).

Mel'in bir proteozom inhibitörü olarak görev yapabildiği de belirtilmiştir. NF- κ B'nin yıkılımı da proteozom tarafından düzenlenmektedir. Mel'in NF- κ B aktivitesini inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, Mel'in bir

proteazom inhibitör olduğu görüşü ile tutarlıdır, fakat aynı zamanda Mel'in doğal bir NF- κ B inhibitörü olduğuna dair kanıt olarak da yorumlanabilmektedir. Mel'in NF- κ B üzerindeki bu inhibe edici etkileri, dokuda anti-enflamatuar ve pro-apoptotik etkiye katkıda bulunabilmektedir (128). Spinal kord hasarını takip eden zamanda bölgede enflamasyon kompleksi genlerinde ve apoptozu tetikleyen yollara bağlı genlerde ifade artışı tespit edilmiştir (162).

Mel'in, XO aktivitesini inhibe ettiği düşünölmektedir. Ancak bununla ilgili çalışmalar henüz net değildir ve Mel'in bu inhibisyonu doğrudan baskılamak yerine ksantin oksidaz kaynaklı reaksiyon ürünlerini nötralize ederek sağladığı belirtilmiştir (163).

Mel, akut SKH modellerinde ikincil hasarı iyileştirmede etkili olabilmektedir. Mel, lipid peroksidasyonunu önleyebilmekte ve ayrıca tıkanıklık, ödem, aksonal dejenerasyon ve nekroz derecesini de azaltabilmektedir (23). Mel'in, hem oksidatif hem de nitrozatif stresi bloke ederek enflamasyon ve doku hasarı gelişimini azalttığı gösterilmiştir (47). Mel, p38 MAPK, JNK, ERK1/2 ve HMGB167'nin aktivasyonunu azaltarak motor fonksiyonunu güçlendiren fonksiyonel TNF- α 38 ekspresyonunu baskılayarak hem MMP-9 hem de MMP-2 aktivitesini ve ekspresyonunu azaltabilmekte ve histolojik ve davranışsal iyileşmeyi artırabilmektedir. Mel tedavisi ayrıca NADPH-d ürününü önleyerek nöronal ölüm dalgalarını hafifletebilmektedir (158).

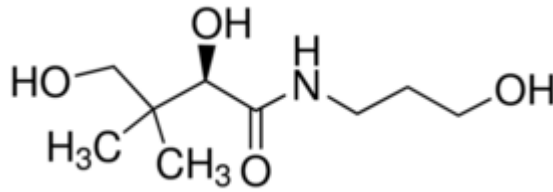
Hücre dışı ortamda ve mitokondride Mel, eNOS ve nNOS aktivitesine bağlı olarak NO'nun mevcudiyetinin bir sonucu olarak üretilen bir ONOO temizleyicisidir. Mel, SOD ve GSH-Px aktivitelerini artırarak dolaylı bir antioksidan etkiye sahiptir (164).

Tüm bu yollar, Mel'in SKH sekonder hasarının önlenmesine katkıda bulunduğunu ve bunu dolaylı olarak antioksidan yollar ve doğrudan anti-inflamatuar ve immünomodölatör etkileri olan serbest radikal süpürücü aktivite ile yapabileceğini göstermektedir. Birkaç yıldır yaygın olan SKH modelleri için Mel dozu ile ilgili bazı tartışmalar da vardır. Rogerio ve ark., 1-50 mg/kg dozlarında Mel'in nöronal ölümü azalttığını, ancak 50 ve 100 mg/kg dozlarında gelişme geriliği, nöbet ve hatta ölüm gibi bir durum olabileceğini bulmuşlardır (68). Ancak Gül'ün grubu, 50 veya 100 mg/kg dozunda Mel'in sıçanlarda deneysel SKH'de doza bağlı nöroprotektif etkilere sahip olduğunu ve bu etkilerin dozdaki artışlarla uyumlu olarak önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (42). Mel'in SKH'ını takiben nörolojik iyileşme için 12.5 mg/kg dozundaki tedavinin; 2 mg/kg, 30 mg/kg ve 100 mg/kg doz tedavilerine göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir (165). Pineal bez ve Mel'in birçok mekanizması hala

aydınlatılmayı beklese de burada açıklanan çalışma, Mel'in bir sıçan modelinde travmatik kord yaralanması ile bağlantılı patolojik olayları önlemede yararlı olduğunu göstermiştir (165).

2.4. Dekspanthenol (Dex)

Pantotenik asit ilk kez 1933 yılında Williams tarafından tanımlanmıştır. Dex'in kimyasal yapısı: (R)-2,4-Dihidroksi-N- (3-hidroksipropil)-3,3- Dimetilbutiramid'dir [129]. Dex (Provitamin B5)'in molekül formülü C₉H₁₉NO₄'dür. B-kompleks vitaminlerinden olan pantotenik asit (PA)'in aktif alkolüdür (Şekil 2.11). Oral yolla veya parenteral verildiğinde, kemirgen ve diğer memelilerin dokularında hızla emilerek vücutta PA'e dönüşmektedir (166).



Şekil 2.11. Dekspanthenol'ün kimyasal formülü

PA birçok farklı besinle vücuda alınabilmektedir. Yetişkinler için günlük gerekli olan miktar 4-7 mg arasında olup, alınan miktar işlenmesi ve rafineri edilmesi sonucu % 35-70 kayba uğramaktadır. (167). Topikal iyi emilim gösteren Dex karaciğerde PA'e dönüştürülmektedir. Emilimin çoğunluğu ince bağırsaklarda olmaktadır. Portal dolaşım yoluyla karaciğere gelmekte ve koenzim A'nın yapısına katılarak tüm vücut dokularına dağılmaktadır (168–171). Yapılan araştırmalar; topikal ve oral olarak uygulanan PA'in yara iyileşmesini ve epitelizasyonu hızlandırdığı görülmüştür. PA'in antiinflamatuvar ve antioksidan etkileri de gösterilmiştir (172–174). PA ve türevlerinin antioksidan özellikler göstererek hücre hasarı ve radyasyona karşı koruyucu etki yaptığı birçok araştırmada belirtilmiştir. PA, bu etkisini koenzim A, ATP sentezi ve GSH'ı arttırarak göstermektedir (175–177). Dex'in iskemi reperfüzyon hayvan modellerinde glutasyonu arttırarak, lipid peroksidasyonuna (MDA seviyesini düşürerek) zayıflatıcı etki yaparak hasar azalmasını sağladığı ortaya konmuştur (178,179). Dex'in fibrozisi azalttığı bir dizi çalışma ile ortaya konmuştur (179).

Ermis ve ark., intraüretal fibrozu histopatolojik değerlendirme ile fibrozis ve enflamasyon skar skorlaması kullanarak araştırmışlar ve Dex'in epitel dokusunun fibrozisini azalttığını göstermişlerdir (179).

Çalışmalar, periferik sinir yaralanmasından sonra oksidatif stresin azaltılmasının onarım sürecini uyarabileceğini ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırabileceğini göstermiştir. Dex'ün kompresyon tipi sinir yaralanmalarının iyileşmesine etkisini araştıran bir başka deneysel çalışmada fonksiyonel değerlendirme için yürüme yolu analiz yöntemi (siyatik statik indeks) kullanılmıştır. Sonuçlar, Dex'in fonksiyonel iyileşme üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu ortaya koymuştur (180).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulundan 22.02.2021 tarih ve 2021/44 karar numarası ile onay alındı. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinde tüm uygulamalar etik kurul protokolüne uygun şekilde yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Sığır serum albümin (Sigma-Aldrich), Agaroz (Sigma-Aldrich), Etidyum bromid (EtBr, Fisher Scientific), Hibrişen Genel RNA İzolasyon kiti (Katalog no: MG-RNA-01-100), BioRad CFX96 Real Time Thermal Cycler cihazı, BioRad firmasının ürettiğı “iTağ™ Universal SYBR® Green One-Step Kit” (Katalog no: 172-5151), Bradford solüsyonu (Thermo Scientific The Pierce Coomassie Protein Assay Kit), GSH’a spesifik antikor (Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No EA0113Ra), Sıçan MDA’sına spesifik antikor (Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E0156Ra), Sıçan XO’ya spesifik antikor (Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E1263Ra), Sıçan SOD antikor (Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E2269Ra) temin edildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada; millipore marka saf su ünitesi, BioRad CFX96 Real Time Thermal Cycler cihazı, Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, United States), Ohaus marka hassas terazi, Denver Instrument marka terazi, Biorad marka elektroforez güç kaynağı, Mettler Toledo marka EL20 model pH metre, Retsch marka MM400 model bilyeli parçalama sistemi, Hermle marka Z216MK model mikro santrifüj, Hettich-zentrifugen marka 200 model masaüstü santrifüj cihazı, EpochBiotek marka spektrofotometre cihazı, Heidolph marka manyetik karıştırıcı, Heidolph marka vorteks, bazı kimyasal reaksiyonlar için Memmert marka su banyosu, MRG cihazı 1.5T (Siemens, Avanto, Erlangen,) (Germany), Nüve Bench Topsantrifüj (Turkey), Himac Microcentrifuge CT 15RE (Japan), Herolab UV transluminator (Germany), VWR Galaxy Ministar spin arttırıcı (Korea), Scotsman AF80 Buz makinesi (IL, USA), Thermo

Scientific OWL EASYCASTTM B2 Jel elektroforez sistemi (USA), Schimadzu Biotech Biospec-nano spektrofotometre (Japan), Schimadzu UV-Pharmaspec 1700 spektrofotometre (Japan), Cleaver Scientific MSCHOICE elektroforez tankı, Consort EV265 elektroforez güç kaynağı (Belgium), Mikrodalga fırını SAMSUNG MV71E (Korea) kullanıldı.

3.3. Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. Mel Hazırlanması

Sigma Aldrich firmasının (M5250-1G Mel powder, >98% (TLC) 1 g) enjeksiyonluk Mel toz içeren flakondan sıçan başına 5 mg/kg dozda 50 mg/mL ethanolde çözüldü (0.35 mL Mel çözdürülmüş ethanol) ve %0.9 izotonik serum fizyolojik kullanılarak (13.65 mL) (%2.5) SKH+Mel ve SKH+Mel+Dex gruplarına enjekte edilecek 14 mL çözelti hazırlandı

3.3.2. Dex Hazırlanması

Bayer firmasının Bepanthen (R) 500 mg/2 mL Enjeksiyonluk Dex içeren ampul sıçan başına 500 mg/kg dozda Dex, SKH+Mel ve SKH+Mel+Dex gruplarına enjekte edilecek şekilde hazırlandı.

3.3.3. RNA Saklama Çözeltisi

100 mL dietilpirokarbonat (DEPC)'lı suda 70 g Amonyum Sülfat çözüldü. Üzerine 25 mM Sodyum Sitrata (pH=5.2) ve 10 mM EDTA (pH=8) eklenip DEPC'li saf su ile 150 mL'ye tamamlandı ve pH 5.2'ye ayarlandı.

3.3.4. 10X Tris-Borat-EDTA (TBE) Çözeltisinin Hazırlanışı

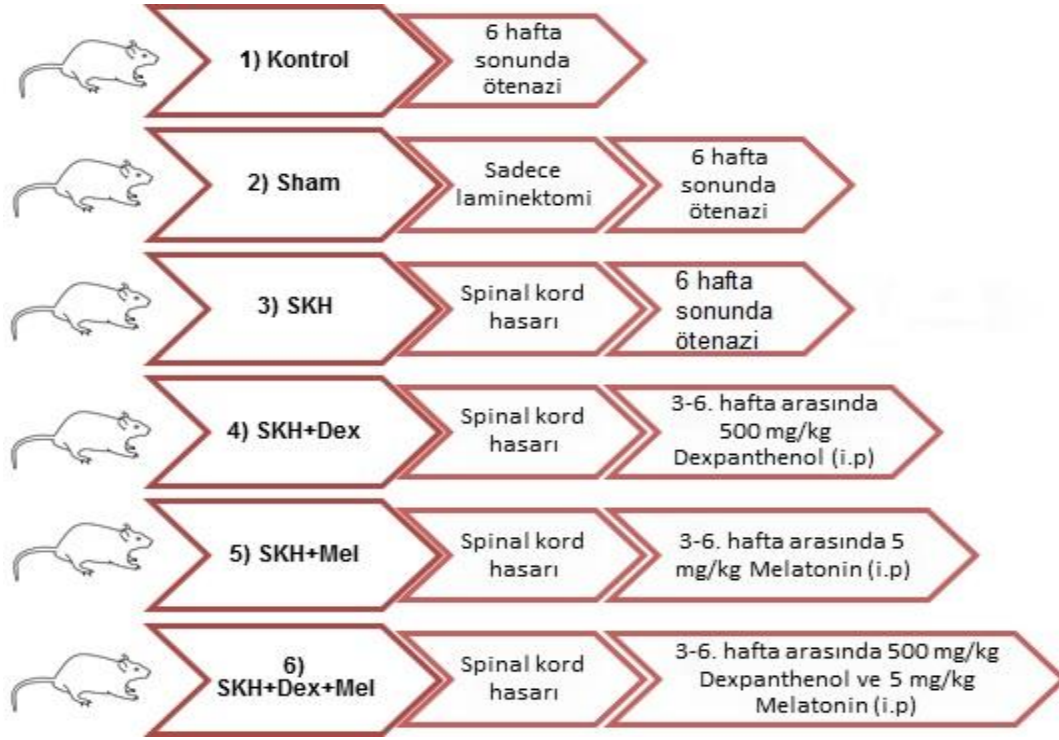
1 litre 10X TBE tamponu hazırlarken; öncelikle manyetik karıştırıcıda 900 mL saf su içerisinde 55 g borik asit, 108 g TRIS baz ve 40 mL 0.5 M EDTA çözeltisi çözdürüldü. Yeterince HCl eklenerek çözeltinin pH değeri 8.0'a getirildi. Ardından çözeltinin toplam hacmi 1000 mL'ye tamamlandı. En son olarak otoklavda 121 °C' de 20 dakika otoklavlandı.

3.4. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi ve Gruplara Ayrılması

Çalışmada, 250-300 g ağırlığında ve ortalama ağırlıkları 274 g olan 42 adet *Sprague Dawley* dişi sıçan kullanıldı, Çalışmada hayvanlar basit randomizasyon yöntemiyle 6 gruba (grup ağırlık ortalamaları birbirine en yakın olacak şekilde ayarlandı) ayrıldı. Her gruptaki hayvan sayısı hesaplanması Power Analizle yapıldı. Örneklem büyüklüğü gruplar arası en yüksek SOD farkı ele alındığında; I. Tip hata miktarı (alfa) 0.05, testin gücü (1-beta) 0.9, ve etki büyüklüğü 0.88 iken bu test kullanılarak anlamlı bir fark bulunabilmesi için gerekli olan minimum örneklem büyüklüğü her bir grup için 7 olarak tespit edildi. Sıçanlar, laboratuvar koşullarında 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde türe özel pelet yem ile *ad libitum* olarak beslendi.

Grupların oluşturulması (n=7) (Şekil 3.4.1)

1. Grup (Kontrol grubu): Herhangi bir cerrahi işlem yapılmadı.
2. Grup (Sham grubu): Spinal kord T7-T10 segmentleri arasında yalnızca laminektomi oluşturulan Sham operasyon yapıldı.
3. Grup (SKH grubu): Deneysel spinal kord hasarı oluşturularak tedavi yapılmadı.
4. Grup (SKH+Dex grubu): Deneysel spinal kord hasarı oluşturulan 3.hafta sonunda 500 mg/kg Dex günde tek doz i.p. yolla (180) 3 hafta boyunca verildi.
5. Grup (SKH+Mel grubu): Deneysel spinal kord hasarı oluşturulan 3.hafta sonunda 5 mg/kg dozda Mel günde tek doz i.p. yolla (165) 3 hafta boyunca verildi.
6. Grup (SKH+Dex+Mel grubu): Deneysel spinal kord hasarı oluşturulan 3.hafta sonunda 3 hafta boyunca Dex ve Mel kombine tedavisi verildi.



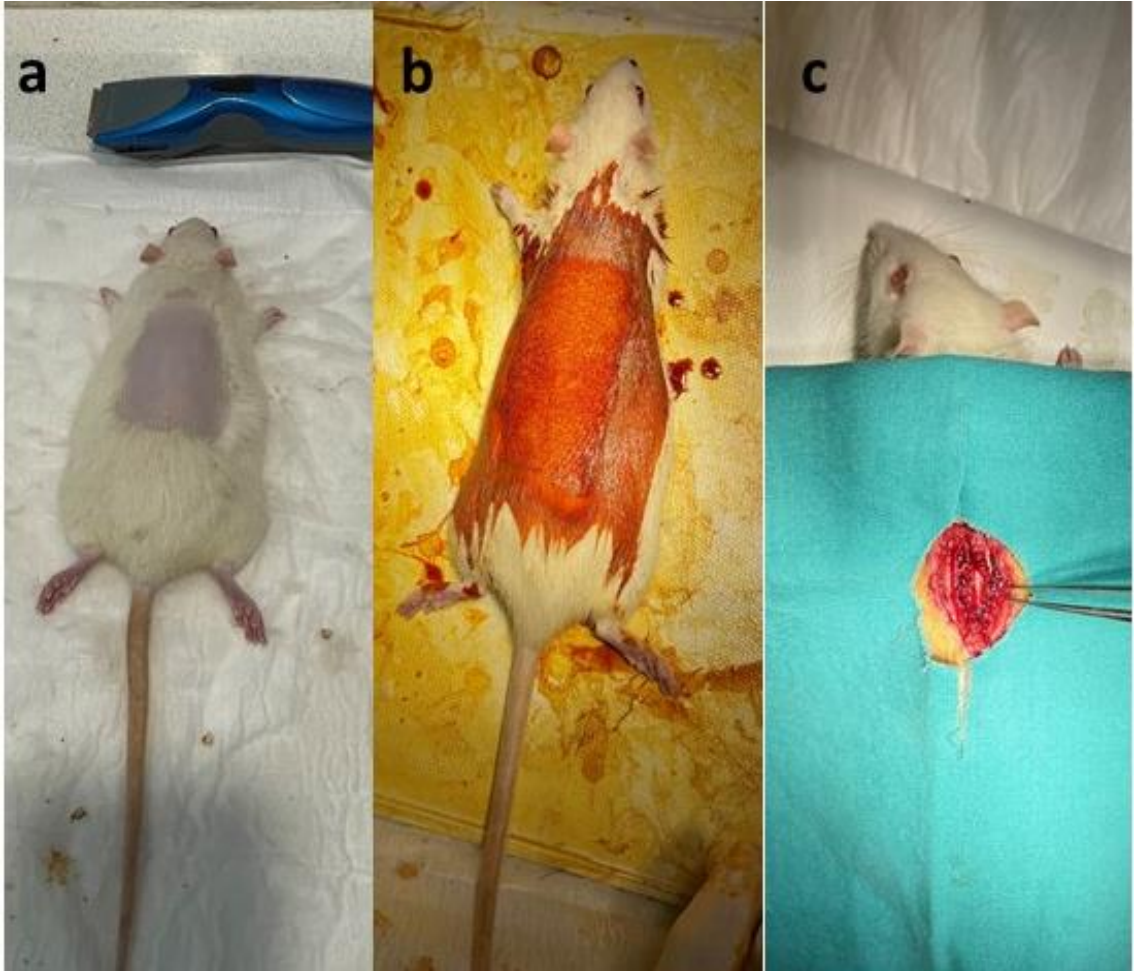
Şekil 3.4.1. Deney gruplarının oluşturulması

3.5. Operasyon

Bütün cerrahi işlemler 75 mg/kg Ketamin, 5 mg/kg Xylazine ile genel anesteziyle gerçekleştirildi (**Şekil 3.5.1**). Anesteziye alınan sıçanlar sternal pozisyonda sabitlendikten sonra sırt bölgesi geniş olarak traşlandı ve povidon iyot ile antisepsisi sağlandı. Cerrahi işlem yapılacak alan steril serviyet ile sınırlandırıldı (**Şekil 3.5.2**).



Şekil 3.5.1. Genel anestezi yapılması



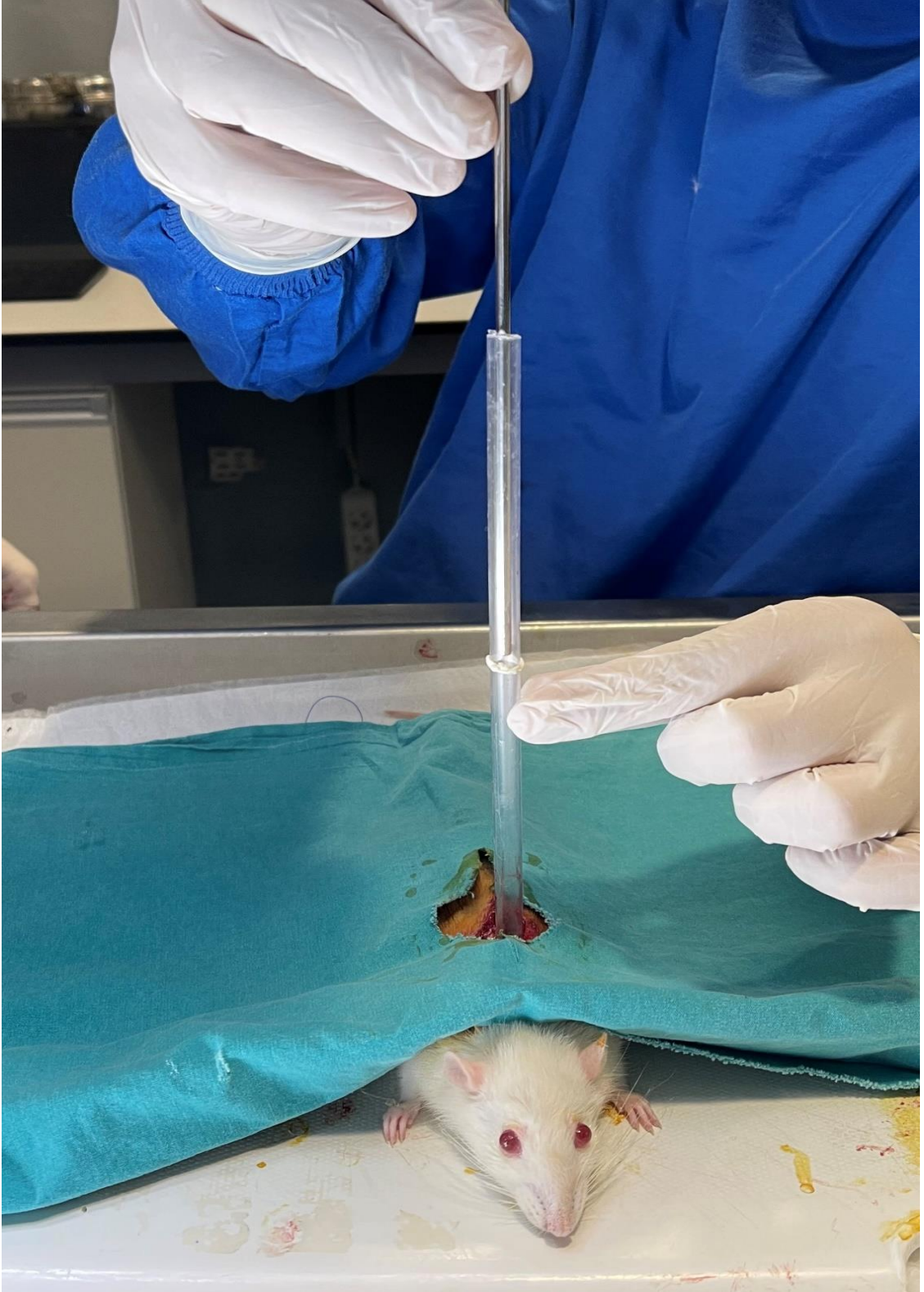
Şekil 3.5.2. (a) Sırt bölgesinin traşlanması, (b) povidon iyot ile antisepsisinin sağlanması ve (c) cerrahi alanın steril serviyet ile sınırlandırılması

T5-T12 seviyesinde iki cm'lik insizyon ile deri ve deri altı dokular geçildikten sonra paravertebral kaslara ulaşılarak paravertebral kaslar disseke edilip prosesus spinozuslar ile vertebral laminalara ulaşıldı. T7-T10 seviyesinde total laminektomi ile dura mater bütünlüğü bozulmadan spinal kord açığa çıkarıldı (**Şekil 3.5.3**).



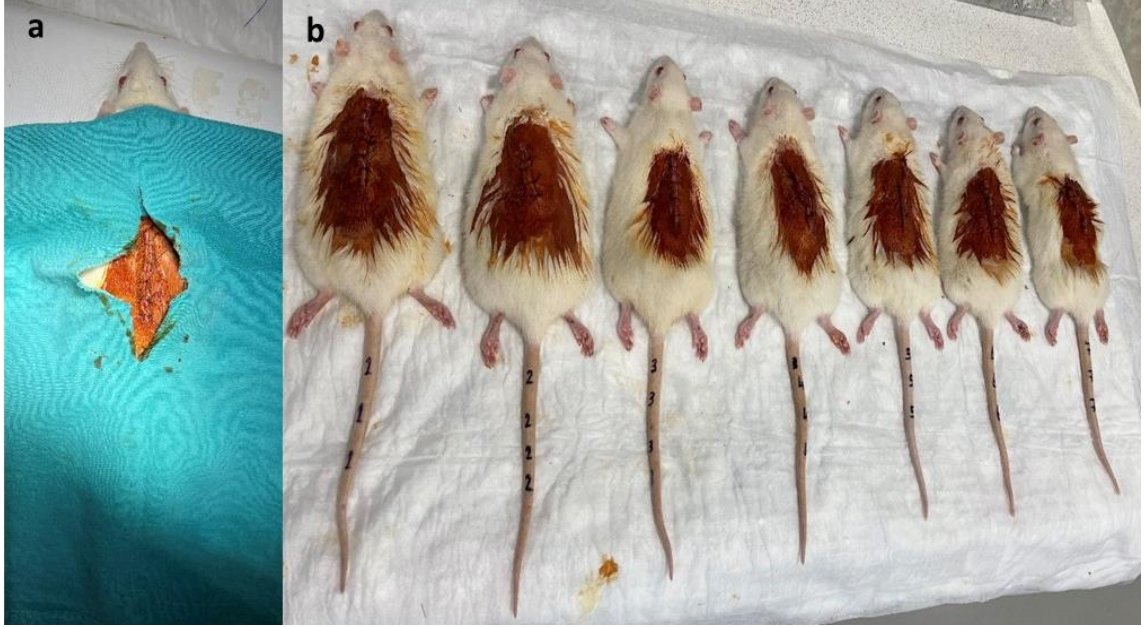
Şekil 3.5.3. Dorsal laminektomi operasyonu ile spinal kordun açığa çıkarılması

Çalışmada SKH, T7-T10 dorsal laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kordun üzerine ağırlık düşürme modeli ile oluşturuldu (181). SKH için; 18 g ağırlığında 3 mm çapındaki metal çubuk 10 cm yükseklikten (180 g/cm) bırakılarak ve sıçanların paraplejik olmaları sağlandı (Şekil 3.5.4).



Şekil 3.5.4. Spinal kordun üzerine ağırlık düşürme

Hemostazı takiben paravertebral kaslar ve deri anatomik katlarına uygun olarak dikilip operatif girişimden sonra sıçanlar sabit oda sıcaklığında uyanmaya bırakıldı (Şekil 3.5.5).



Şekil 3.5.5. Cerrahi alanı dikişlerle kapatma (a), sabit oda sıcaklığında uyanmaya bırakma (b)

3.6. Tedavinin Uygulanması

Postoperatif olarak bireysel kafeslere alınan sıçanlar serbest olarak beslendi ve antibiyoterapileri yapıldı (amoksisilin, 15 mg/kg ve meloxicam 0.2 mg/kg im), göz enfeksiyon profilaksisi yapıldı (Oksitetrasiklin HCl ve Polimiksin B sülfat) ve travma sonrası idrar keseleri günde iki kez manuel olarak boşaltıldı. İlaç tedavileri planlandığı şekilde uygulandı.

3.7. Radyolojik Parametreler

Çalışmamızda hayvanların medulla spinalisteki kord hasarını tespit için MR çekimi yapıldı. Çekim yapılacak olan tüm gruplardaki sıçanlara genel anestezi amaçlı 10 mg/kg Ksilazin hidroklorür (ip) (Alfazyne %2 enj. 50 mL, EGE-VET, Türkiye) ve 50 mg/kg Ketamin hidroklorür (ip) (Alfamine %10 enj. 50 mL, EGE-VET, Türkiye) uygulandı. Anesteziye alınan sıçanlar sternal pozisyonda sabitlendikten sonra çekimler gerçekleştirildi (Şekil 3.7.1). MR çekiminden sonra sıçanlar sabit oda sıcaklığında uyanmaya bırakıldı.



Şekil 3.7.1. MR çekimi (1.5T MRG cihazı (Siemens, Avanto, Erlangen, Germany))



Şekil 3.7.2. T2A ağırlıklı görüntüler (14450 ms/84 ms TR/TE, 240 × 320 görüntü matrisi)

MR görüntüleri 1.5T MRG cihazı (Siemens, Avanto, Erlangen, Germany) ile yapıldı ve çekimlerde 8 kanallı koiller kullanıldı (**Şekil 3.7.1.**). Tüm sıçanlara çalışmanın 21. ve 42. günlerinde sagittal ve koronal düzlemde FSE T2A ağırlıklı MR sekansları alındı. T2A ağırlıklı görüntüler 14450 ms/84 ms TR/TE, 240 × 320 görüntü matrisi ve 2 mm kesit kalınlığı parametreleri kullanılarak elde edildi (**Şekil 3.7.2.**).

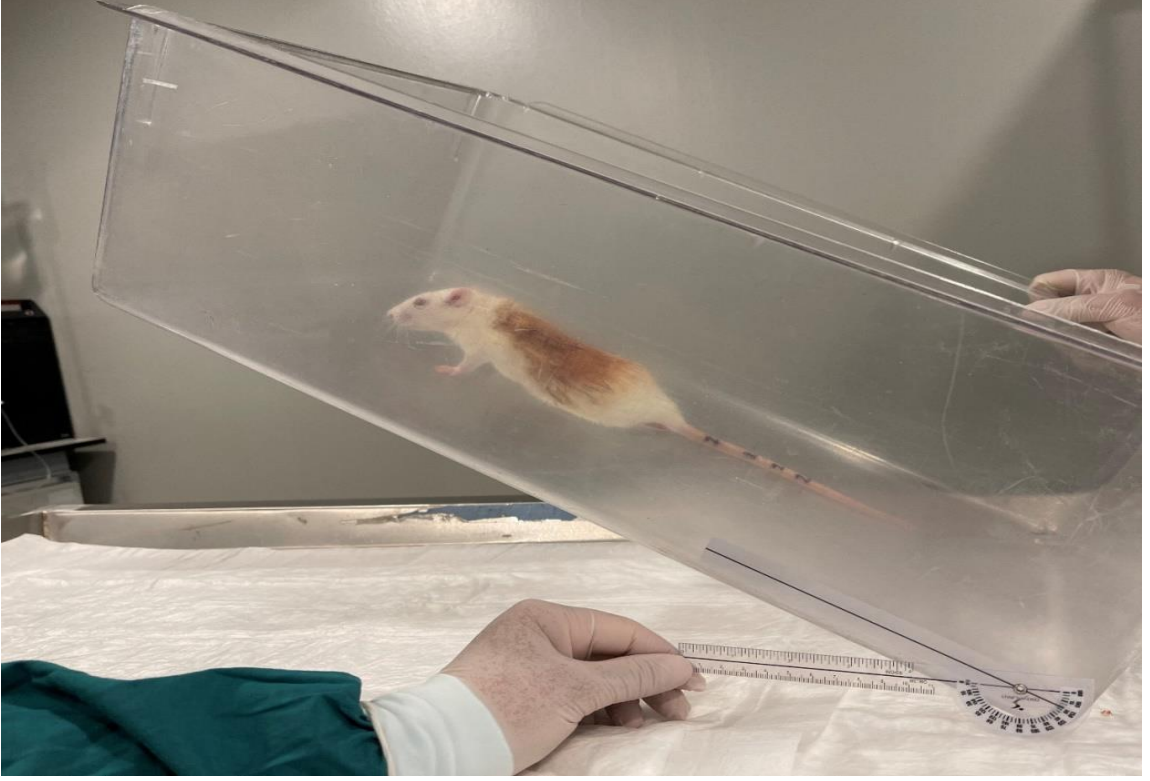
Çalışmanın 21. günü ve 42. gününde tüm gruplara sagittal düzlemde T2 ağırlıklı sekansta MR görüntüleri alındı (**Şekil 3.7.3.**). Bu görüntülerde; etkilenen spinal kord segmentinin seviyesi, spinal kordda ödem-kontüzyon bölgesine karşılık gelen anormal sinyal artışı, kordda volüm değişikliği ve eşlik eden hemorajik sinyal değerlendirildi ve spinal kordda T2 sekansta saptanan sinyal değişimleri yok=0, hafif=1, orta=2 ve belirgin=3 olarak sınıflandırıldı.



Şekil 3.7.3. Sagittal düzlemde T2 ağırlıklı sekansta alınan MR görüntüleri

3.8. Nörolojik Muayene

Bütün deney gruplarında nörolojik muayene değerlendirildi. Tüm sıçanlara deney başlangıcında, omurilik yaralanması sonrası ve tedavi uygulanması



Şekil 3.8.1. Rivliv ve Tator'un eğimli yüzey testi uygulaması



Şekil 3.8.2. Eğik zemin açısı tespiti

- Klinik motor muayene için Modifiye Tarlov Skalası kullanıldı (183). Bu skalada;
- 0- Arka ekstremitelerde hareket yok, ağırlık taşıma yok, arka ekstremitelerde tam paraliz.
 - 1- Arka ekstremitelerde ağırlık taşıma yok, farkedilebilir arka ekstremitte hareketleri.
 - 2- Ağırlık bindirme veya lokomasyonla sonuçlanmayan belirgin arka ekstremitte hareketleri, sık ve/veya güçlü arka ekstremitte hareketi.
 - 3- Arka ekstremiteler vücut ağırlığını destekler, bir veya iki adım atabilir.
 - 4- Yürüyüşte hafif bir kayıp.
 - 5- Normal yürüyüş olarak kategorize edildi.

Parmak açma testinde, sıçan gövdesinden kaldırılarak arka ekstremiteler asılı tutuldu ve parmakların açılması gözlemlenerek refleksler aşağıdaki gibi sınıflandırıldı (Şekil 3.8.3) (183).

- 0- Parmakların açılmaması, 1- Parmakların hafif açılması, 2- Parmakların tam açılması



Şekil 3.8.3. Parmak açma testi uygulaması

3.9. Dokuların Alınması ve Örneklerin Analizleri

Deney sonunda tüm hayvanlar ksilazin-ketamin anestezisi altında (ketamin hidroklorür, Parke- Davis. Eczacıbaşı, İstanbul, 75 mg/kg ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid Rompun, Bayer İlaç) sakrifiye edilip spinal kord dokuları alındı. mRNA seviyelerinin tespiti için, gruplardan alınan dokuların bir kısmı steril şartlarda ve buz üzerinde küçük parçalar halinde kesildi ve RNA saklama çözeltisi içinde -80⁰C derin dondurucuda analiz gününe kadar saklandı. Geri kalan dokulardan biyokimyasal, histopatolojik analizler yapıldı. Çalışmalar tek kör olarak yürütüldü.

3.10. Moleküler Genetik Analiz Yöntemleri

3.10.1. Dokudan RNA Saflaştırılması

XO, *SOD*, *NF-κB* ve *CASP3* ve *β-Aktin* ifade seviyelerinin tespiti için hayvan gruplarından alınan doku örnekleri RNA izolasyonu için HibriGen Genel RNA İzolasyon kiti (Katalog no: MG-RNA-01-100) kullanılarak saflaştırıldı. 100 mg doku için 1 mL HT tamponu kullanıldı ve dokular bu solüsyon içinde homojen hale getirildi. Nükleoprotein kompleksinin tamamen parçalanması için buz üzerinde 5 dakika inkübasyon yapıldı. Süpernatant, yeni bir RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 200 µL kloroform eklendi, 15 saniye vorteks ile homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Buz üzerinde 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Örnek 4 °C’de 12000 rpm’de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra karışım iki faza ayrıldı, üstte RNA içeren renksiz faz pipet yardımıyla alttaki fazın karışmasına olanak vermeyecek şekilde dikkatlice yeni bir RNaz içermeyen boş tüpe aktarıldı. Alınan renksiz fazın hacmine göre üzerine 1/2 oranında önceden soğutulmuş etanol (%100) eklendi. Karışım vorteksle iyice karıştırıldı. Karışım filtreli tüpe aktarıldı, 4 °C’de 12000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi ve filtrenin altındaki tüpte toplanan sıvı atıldı. Filtreye 500 µL RY1 eklendi ve 4 °C’de 12000 rpm’de 30 saniye kalacak şekilde santrifüj edildi ve yine altta kalan sıvı atıldı. Daha sonra filtreye 500 µL RY2 eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı ve 4 °C’de 12000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi ve altta kalan sıvı atıldı. Filtreli tüp 12000 rpm’de 2 dakika kuruması için santrifüj edildi. Kalan 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Doğrudan membran üzerine 30 - 100 µL DEPC ile muamele edilmiş su eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve RNA’yı bu su içerisinde çözdürüp alttaki tüpte toplamak için 12000 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Uzun süreli saklama için RNA -80 °C’de buzdolabında muhafaza edildi.

3.10.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Tepkimesi (GZ-PZT)

Tek basamaklı GZ-PZT analizinde; BioRad CFX96 Real Time Thermal Cycler cihazı, BioRad firmasının ürettiği “iTaQ™ Universal SYBR® Green One-Step Kit” (Katalog no: 172-5151) kullanıldı. *XO*, *SOD*, *NF-κB*, *CASP3* ve kontrol olarak *β-Aktin* genleri için tasarlanan primerler kullanılarak genlerin mRNA seviyeleri ölçülerek kontrol genine göre oranlandı. **Tablo 1**’de dizilimleri ve büyüklükleri verilen primerler gen ifadelerinin analizinde kullanıldı. Reaksiyonlar 20 µL toplam hacimde hazırlandı. Bunun için 10 µL master mix, 0.25 µL iScript ters transkriptaz enzimi, 1.8 µL ileri ve geri

primerler, 1.15 µL PZT kalitesinde su ve 5 µL RNA kullanıldı. Çalışmada, her örnek için 3 PZT tekrarı yapıldı. PZT şartları kullanılan kitin önerdiği şekilde yapıldı; ilk olarak ters transkriptaz basamağı 50 °C’de 10 dakika, daha sonra ilk denaturasyon 95 °C’de 1 dakika, ikinci denaturasyon 95 °C’de 10 saniye, bağlanma 55 °C’de 45 saniye olarak 55 döngü tekrarlandı.

Doku örneklerinden saflaştırılan RNA’lardan *XO*, *SOD*, *NF-κB*, *CASP3* ve *β-Aktin* genlerine özgü primerler kullanılarak tek basamaklı GZ-PZT ile çoğaltıldı ve gen seviyelerinin *β-Aktin* gen seviyesine oranları belirlendi.

Tablo 1. Primer dizilimleri

Genler	Primer Dizileri	PZT ürün büyüklüğü (bp)
<i>β-Aktin-F</i>	5'-CTGAAGTACCCATTGAACA-3'	178
<i>β-Aktin-R</i>	5'-GTCTCAAACATGATCTGGGT-3'	
<i>XO-F</i>	5'-TTCACCACCCTGTGTGT-3'	77
<i>XO-R</i>	5'-TGGAGACCTTCTCTTCAGAT-3'	
<i>SOD-F</i>	5'-GAGAACCCAAAGGAGAGTTG-3'	146
<i>SOD-R</i>	5'-ACCTTGCTCCTTATTGAAGC-3'	
<i>NFKB-F</i>	5'-CTGTCAACAGATGGCC-3'	200
<i>NFKB-R</i>	5'-CCATTTGTGACCAACTGAAC-3'	
<i>CASP3-F</i>	5'-GGAAGCCGAACTCTTCAT-3'	163
<i>CASP3-R</i>	5'-TCCAGGAATAGTAACCGG-3'	

F: ileri primer, R: geri primer

3.11. Biyokimyasal Analiz Yöntemleri

Sinir dokuları, 100 mM Fosfat tamponu (pH 7.4) içerisinde, 6 dk 25/sn frekansta doku homojenizatörü ile homojenize edildi. Homojenatlar 9500xg de 15 dk 4°C’de santrifüj edildi ve supernatanları ayrıldı. Dokulardan elde edilen supernatanlardan sığır serum albumininin standart olarak kullanıldığı Bradford yöntemiyle (184) protein analizi yapıldı.

Çalışmamızda yöntemi uygulamadan önce standart solüsyonlar hazırlandı. 96’lık pleytdaki kuyucuklara belirlenmiş pozisyonlara blank olarak 25 µL su, 25 µL

standartlardan ve 25 µL de konsantrasyonu belirlenecek numunelerden eklendi. Daha sonra her bir kuyucuğa 200 µL hazırlanan Bradford solüsyonu (Thermo Scientific The Pierce Coomassie Protein Assay Kit) eklendi. Plate 30 sn karıştırıcıda bekletildikten sonra 37°C'de 30 dk inkübe edildi. Daha sonra 595 nm'de absorbans ölçüldü. Numunelerdeki konsantrasyon, oluşturulan standart eğrisinde yerine konularak hesaplandı. Dokulardan elde edilen supernatandan aynı zamanda GSH, SOD, MDA ve XO düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçüldü.

3.11.1. GSH Analizi

Bu parametre kompetitif ELISA metoduyla çalışıldı. Ticari kitle birlikte gelen mikro ELISA pleyti, GSH'a spesifik antikor ile önceden kaplanmıştı [Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No EA0113Ra]. Çalışılacak örnekler ve hazırlanan standartlar kuyucuklara pipetlendi. Sonra biyotinlenmiş antijen eklendi. Bağlanmamış antijenler yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra avidin-HRP enzimi eklendi ve ardından inkübe edildi. Bağlanmamış avidin-HRP yıkanarak uzaklaştırıldı. Ardından TMB substratı eklendi ve bu enzime bağlanarak renk oluşturdu. Enzim-substrat reaksiyonu, stop solüsyonu eklenerek sonlandırıldı ve renk maviden sarıya döndü. Optik yoğunluk (OD) 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü (Multiskan FC Microplate Photometer; Thermo Scientific, United States). Test edilen numunelerdeki GSH konsantrasyonu, numunelerin OD'sinin standart eğriyle karşılaştırılmasıyla hesaplandı.

Tespit Aralığı: 20-1600 mg/L

Sensitivite: 10.25 mg/L

3.11.2. MDA Analizi

Bu parametre sandwich ELISA metoduyla çalışıldı. Elisa pleyti sıçan MDA'sına spesifik antikorla önceden kaplanmıştı. [Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E0156Ra] Standartlar ve numuneler, kuyucuklara pipetlendi böylece standartlarda ve numunelerde bulunan MDA kuyucuklarda bulunan antikorlara bağlandı. Daha sonra biyotinlenmiş sıçan MDA antikoruna eklendi ve numunedeki MDA'ya bağlandı. Ardından Streptavidin-HRP enzimi eklendi ve biyotinlenmiş MDA antikoruna bağlandı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve sıçan MDA miktarıyla orantılı olarak renk değişimi oluştu. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450

nm'de absorbansı ölçüldü. (Multiskan FC Microplate Photometer; Thermo Scientific, United States) Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan MDA konsantrasyonu hesaplandı.

Tespit Aralığı: 0.05-10 nmol/mL

Sensitivite: 0.01 nmol/mL

3.11.3. XO Analizi

Bu parametre sandwich ELISA metoduyla çalışıldı. Pleyt, Rat XO'ye spesifik antikor ile önceden kaplanmıştı [Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E1263Ra]. Standartlar ve numuneler, kuyucuklara pipetlendi böylece standartlarda ve numunelerde bulunan XO kuyucuklarda bulunan antikorlara bağlandı. Daha sonra biyotinlenmiş Rat XO antikoruna eklendi ve numunedeki XO'ye bağlandı. Ardından kuyucuklara Streptavidin-HRP enzimi eklendi ve bunlar biyotinlenmiş XO antikoruna bağlandı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP'ler yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve sıçan XO miktarıyla orantılı olarak renk değişimi oluştu. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm'de absorbansı ölçüldü (Multiskan FC Microplate Photometer; Thermo Scientific, United States). Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan XO konsantrasyonu hesaplandı.

Tespit Aralığı: 0.1-40 ng/mL

Sensitivite: 0.043 ng/mL

3.11.4. SOD Analizi

Bu parametre sandwich ELISA metoduyla çalışıldı. Pleyt sıçan SOD antikoruna ile önceden kaplanmıştı [Bioassay Technology Laboratory (BT LAB), CAT No: E2269Ra]. Standartlar ve numuneler, kuyucuklara pipetlendi böylece standartlarda ve numunelerde bulunan SOD kuyucuklarda bulunan antikorlara bağlandı. Daha sonra biyotinlenmiş sıçan SOD antikoruna eklendi ve numunedeki SOD'a bağlanması sağlandı. Ardından Streptavidin-HRP enzimi eklendi ve bunlar biyotinlenmiş SOD antikoruna bağlandı. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra substrat solüsyonu eklendi ve sıçan SOD miktarıyla orantılı olarak renk değişimi gerçekleşti. Reaksiyon, asidik durdurma solüsyonunun eklenmesiyle sonlandırıldı ve 450 nm'de absorbansı ölçüldü (Multiskan FC Microplate Photometer; Thermo Scientific,

United States). Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki sıçan SOD konsantrasyonu hesaplandı.

Tespit Aralığı: 5-2000 ng/L

Sensitivite: 3.04 ng/L

3.12. Histopatolojik analiz yöntemleri

Tüm gruplardan alınan spinal kord örnekleri %10'luk formol ile fikse edildi ve rutin takip prosedüründen sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 mikrometre kalınlığında kesitler alınarak elde edilen preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu (Olympus BX53) altında incelendi. 4X, 10X, 20X ve 40X objektif altında omuriliğin beyaz ve gri cevheri değerlendirildi. Doku örnekleri histopatolojik değişikliklere göre semikantitatif bir skorlama sistemine göre 0 ila 3 arası skorlandı. Altı farklı parametre (hemoraji, laserasyon, nekroz, ödem, nöronal ve aksonal dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu) histopatolojik olarak değerlendirildi, dokular 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=ağır olarak skorlandı. Her bir omurilik için patoloji skoru bu altı parametre için alınan skorların ortalaması hesaplanarak ölçüldü [177]. Her grubu temsilen seçilen preparatlar Olympus BX 53 immünflorasan mikroskopta Olympus DP2 BSW görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı.

3.13. İstatistik

Elde edilen verilere ait tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma (SD) ve quartiller olarak hesaplandı. Her bir ölçüm periyodunda 6 grubun karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve farklı grupların belirlenmesinde post-hoc Dunn testi kullanıldı. Her bir grupta ölçüm periyotları arası farklılıkları incelemek amacıyla Friedman testi ve farklı grupların belirlenmesinde post-hoc Dunn testi kullanıldı. İstatistik anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi ve hesaplamalarda SPSS (ver. 23) programı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Radyolojik Parametre Bulguları

Radyolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre tanımlayıcı değerleri **Tablo 2**' de verildi. **Tablo 2** incelendiğinde;

21.gün değerlendirme sonuçlarına göre;

T2A MR bulgusu sadece Kontrol grubunda gözlenmedi, diğer gruplarda benzer oranda (hepsinde %100) görüldü ve Kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek orandaydı. Hemoraji bulgusu Kontrol ve Sham gruplarında hiç gözlenmedi, diğer gruplarda benzer oranda (hepsinde %100) görüldü. Diğer 4 gruptaki hemoraji sıklığı anlamlı düzeyde yüksek bulundu. T2 sinyal artışı sadece Kontrol grubunda hiç gözlenmedi. Sham grubunda ise tüm hayvanlarda hafif düzeyde görüldü. SKH+Dex, SKH+Mel ve SKH+Dex+Mel gruplarında ise tüm hayvanlarda orta düzeydeydi. Buna karşın SKH grubundaki hayvanların tamamında belirgin olarak bulundu. Spinal kordda volüm artışı Kontrol ve Sham gruplarındaki hayvanların tamamında gözlenmedi. Orta şiddette volüm artışı ise sadece SKH+Dex+Mel grubunda %100 oranındaydı. Diğer 3 grupta ise belirgin bir volüm artışı bulundu. Hiçbir grupta hafif düzeyde volüm artışı gözlenmedi.

42.gün değerlendirme sonuçlarına göre;

42. gün değerlendirmesinde Kontrol grubundan ölçüm alınmadı. 3 haftalık süre içerisinde spinal kordda değişiklik olmasını gerektirecek bir müdahale olmadığı için 21. gün değerleri geçerli kabul edildi. T2A MR bulgusu sadece Sham grubunda gözlenmedi, diğer gruplarda benzer oranda (hepsinde %100) görüldü ve Kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek orandaydı. Hemoraji bulgusu sadece Sham grubunda gözlenmedi, diğer gruplarda benzer oranda (hepsinde %100) görüldü ve Kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek orandaydı. T2 sinyal artışı, Sham ve SKH+Dex+Mel gruplarındaki tüm hayvanlarda hafif düzeyde görüldü. SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarındaki tüm hayvanlarda ise orta düzeydeydi, farkedilir bir düzelme olmadı. Buna karşın SKH grubundaki hayvanların tamamında belirgin olarak tespit edildi. Sadece SKH+Dex+Mel gruplarındaki tüm hayvanlarda belirgin bir düzelme oldu. Spinal kordda volüm artışı Sham grubundaki hayvanların tamamında gözlenmedi. Hafif şiddette volüm artışı ise sadece SKH+Dex+Mel grubunda %100 oranındaydı. SKH+Dex ve SKH+Mel

gruplarındaki tüm hayvanlarda ise orta düzeydeydi. Buna karşın SKH grubundaki hayvanların tamamında belirgin olarak bulundu. Tedavi gruplarının hepsindeki hayvanlarda belirgin bir düzelme olmuştu.

Tablo 2. Radyolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre tanımlayıcı değerleri

			Kontrol		Sham		SKH		SKH+Dex		SKH+Mel		SKH+Dex+Mel		p*, **
			n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
21. gün sonuçları	T2A MR BULGUSU	Yok	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Var	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	
	HEMORAJİ	Yok	7 _a	100	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	7 _a	0	<0.001
		Var	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	0 _a	100	
	T2 SİNYAL ARTIŞI	Yok	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Hafif	0 _a	0	7 _b	100	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	
		Orta	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	
		Belirgin	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	
	SPİNAL KORDDA VOLÜM ARTIŞI	Yok	7 _a	100	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Orta	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	
		Belirgin	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	0 _a	0	
	42. gün sonuçları	T2A MR BULGUSU	Yok	7 _a	100	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0,0	0 _b	0	0 _b	0
Var			0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	
HEMORAJİ		Yok	7 _a	100	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Var	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	7 _b	100	
T2 SİNYAL ARTIŞI		Yok	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Hafif	7 _a	0	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	7 _a	100	
		Orta	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	0 _a	0	
		Belirgin	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	
SPİNAL KORDDA VOLÜM ARTIŞI		Yok	0 _a	100	7 _a	100	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	0 _b	0	<0.001
		Hafif	7 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	
		Orta	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	7 _b	100	0 _a	0	
		Belirgin	0 _a	0	0 _a	0	7 _b	100	0 _a	0	0 _a	0	0 _a	0	

*Fisher-Freeman-Halton exact test, **Her bir alt simge harfi, sütun oranları birbirinden 0.05 düzeyinde önemli ölçüde farklı olmayan grup kategorilerinin bir alt kümesini belirtir.

4.2. Nörolojik Muayene Bulguları

4.2.1 PAT Bulguları

Parmak açma testinde ilk ölçüm periyodunda 05.05.2021 tarihinde 6 grup arasında da anlamlı fark bulunmadı ve tüm gruplardaki hayvanların PAT skorunun ortanca değeri 2 bulundu (**Tablo 3**). Diğer ölçüm periyotlarında Kontrol ve Sham grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, bu iki gruptaki hayvanların PAT sonuçları diğer 4 gruptan anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Ayrıca ilk periyot dışındaki ölçümlerde de diğer 4 grupta gruplar arasında anlamlı farka rastlanmadı (**Tablo 3**). SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında PAT ölçümlerinin ortanca değeri 0 bulunurken, SKH+Dex+Mel grubunda son iki periyotta PAT skorunun ortanca değeri 1 bulundu.

Ayrıca PAT ölçümleri bakımından her bir grupta ayrı ayrı ölçüm periyotları karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda ve Sham grubunda periyotlar arasında anlamlı farka rastlanmadı. Bu sonuca göre farklı ölçüm periyotlarında parmakların ya tam açıldığı (Kontrol grubu) veya ilk ölçümde tam açıldığı sonraki periyotlarda ise hafif açıldığı (Sham grubu) gözlemlendi. SKH, SKH+Dex, SKH+Mel ve SKH+Dex+Mel gruplarının her birisinde 5.05.2021 tarihinde yapılan ölçümün ortanca değeri diğer periyotlardan anlamlı düzeyde yüksek çıktı (her birisi için $p<0.001$). Bu sonuca göre bu 4 grupta 05.05.2021 tarihinde parmaklar tam açılırken bundan sonraki tarihlerde parmaklar tam açılmamaktaydı.

Tablo 3. PAT ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri

Ölçüm Periyotları	Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Yüzelik			p*
					25th	Ortanca**	75th	
05.05.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2	2	1.000
	Sham	7	2.00	0	2	2	2	
	SKH	7	2.00	0	2	2	2	
	SKH+Dex	7	2.00	0	2	2	2	
	SKH+Mel	7	2.00	0	2	2	2	
	SKH+Dex+Mel	7	2.00	0	2	2	2	
12.05.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	<0.001
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
19.05.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	<0.001
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
26.05.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	<0.001
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	.14	.378	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	.29	.488	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.29	.488	0	0 ^b	1	
	SKH+Dex+Mel	7	.29	0	0	0 ^b	1	
02.06.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	<0.001
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	.29	.756	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Dex+Mel	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
09.06.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	<0.001
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	.29	.756	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Dex+Mel	7	.57	.535	0	1 ^{ab}	1	
14.06.2021	Kontrol	7	2.00	0	2	2 ^a	2	0.003
	Sham	7	1.57	.787	1	2 ^a	2	
	SKH	7	.29	.756	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.43	.535	0	0 ^b	1	
	SKH+Dex+Mel	7	.86	.900	0	1 ^{ab}	2	

*Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Dunn testi; ** Ortanca değerlerinin yanında tamamen farklı harf taşıyan gruplar arasında anlamlı fark vardır.

4.2.2. MTS Bulguları

İlk ölçüm periyodu olan 05.05.2021 tarihinde 6 grup arasında da anlamlı fark bulunmadı ve tüm gruplardaki hayvanların MTS skorunun ortanca değeri 5 bulundu (Tablo 4). Diğer ölçüm periyotlarında Kontrol ve Sham grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, bu iki gruptaki hayvanların MTS sonuçları diğer 4 gruptan anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Diğer 4 grupta ikinci, üçüncü ve dördüncü periyotlarda MTS değerlendirme sonuçlarının ortanca değeri 0 bulundu. Ayrıca sadece 14.06.2021 tarihinde yapılan ölçümlerde, SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel gruplarının ortanca skoru 2' ye yükselirken, SKH ve SKH+Mel gruplarının ortanca değeri 1 olarak belirlendi. Bu sonuçlara göre son periyotta en iyi grupların Kontrol ve Sham olduğu, bunu SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel gruplarının takip ettiği ve en kötü durumda olan grubun ise SKH ve SKH+Mel olduğu belirlendi. Ayrıca MTS ölçümleri bakımından her bir grupta ayrı ayrı ölçüm periyotları karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda ve Sham grubunda periyotlar arasında anlamlı farka rastlanmadı. SKH, SKH+Dex, SKH+Mel ve SKH+Dex+Mel gruplarının her birisinde 5.05.2021 tarihinde yapılan ölçümün ortanca değeri diğer periyotlardan anlamlı düzeyde yüksek çıktı (her birisi için $p<0.001$). Bunun yanı sıra SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel gruplarında 14.06.2021 tarihindeki sonuçlar 12.05.2021 ile 09.06.2021 tarihleri arasında elde edilen sonuçlara göre anlamlı düzeyde daha iyi bulundu.

Tablo 4. MTS ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri

Ölçüm Periyotları	Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Yüzdeler			p*
					25th	Ortanca**	75th	
05.05.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5	5	1.000
	Sham	7	5.00	0	5	5	5	
	SKH	7	5.00	0	5	5	5	
	SKH+Dex	7	5.00	0	5	5	5	
	SKH+Mel	7	5.00	0	5	5	5	
	SKH+Dex+Mel	7	5.00	0	5	5	5	
12.05.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.43	.976	3	5 ^a	5	
	SKH	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
19.05.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.43	.976	3	5 ^a	5	
	SKH	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex+Mel	7	0	0	0	0 ^b	0	
26.05.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.43	.976	3	5 ^a	5	
	SKH	7	.43	1.134	0	0 ^b	0	
	SKH+Dex	7	.43	.787	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.57	.976	0	0 ^b	2	
	SKH+Dex+Mel	7	.57	.787	0	0 ^b	1	
02.06.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.71	.488	4	5 ^a	5	
	SKH	7	.71	1.496	0	0 ^b	1	
	SKH+Dex	7	.43	.787	0	0 ^b	1	
	SKH+Mel	7	.86	.900	0	1 ^b	2	
	SKH+Dex+Mel	7	.71	.951	0	0 ^b	2	
09.06.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.86	.378	5	5 ^a	5	
	SKH	7	1.14	1.864	0	0 ^b	2	
	SKH+Dex	7	1.00	.816	0	1 ^b	2	
	SKH+Mel	7	1.00	.816	0	1 ^b	2	
	SKH+Dex+Mel	7	1.57	1.134	1	1 ^b	3	
14.06.2021	Kontrol	7	5.00	0	5	5 ^a	5	<0.001
	Sham	7	4.86	.378	5	5 ^a	5	
	SKH	7	1.29	1.799	0	1 ^c	2	
	SKH+Dex	7	2.00	1.155	1	2 ^b	3	
	SKH+Mel	7	1.00	.816	0	1 ^c	2	
	SKH+Dex+Mel	7	2.00	1.414	1	2 ^b	3	

*Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Dunn testi; **Ortanca değerlerinin yanında tamamen farklı harf taşıyan gruplar arasında anlamlı fark vardır.

4.2.3. ETZ Bulguları

İlk ölçüm periyodu olan 05.05.2021 tarihinde Kontrol ve Sham grubu ile SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel arasında anlamlı fark bulundu ancak diğer farklar anlamlı

çıkmadı. Diğer ölçüm periyotlarının hepsinde Kontrol ve Sham grubunun ortalama ETZ değeri diğer 4 gruptan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (**Tablo 5**).

Tablo 5. ETZ ölçüm sonuçlarının grup ve periyotlara göre tanımlayıcı istatistikleri

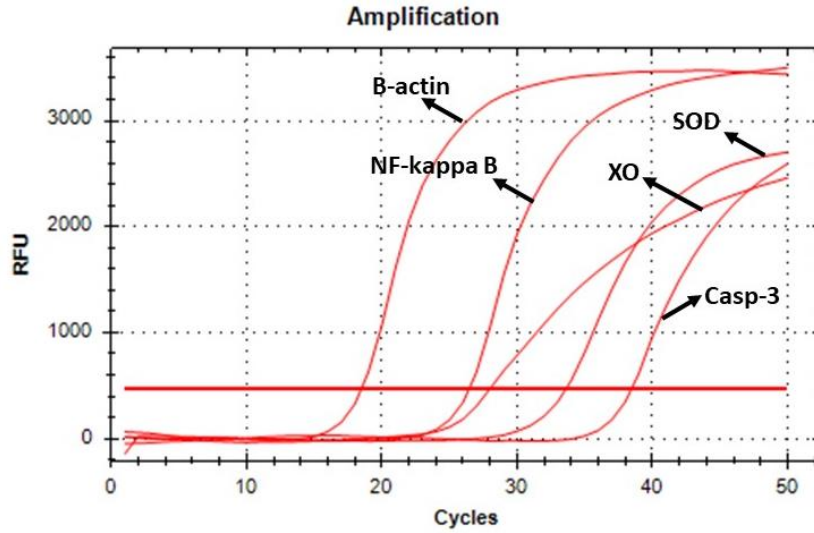
Ölçüm Periyotları	Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Yüzelik			p*
					25th	Ortanca**	75th	
05.05.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	0.025
	Sham	7	40.00	.816	39	40 ^a	41	
	SKH	7	41.14	.690	41	41 ^b	42	
	SKH+Dex	7	41.00	1.000	40	41 ^b	42	
	SKH+Mel	7	40.57	.535	40	41 ^b	41	
	SKH+Dex+Mel	7	41.43	.787	41	42 ^{ab}	42	
12.05.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.14	4.598	31	39 ^a	40	
	SKH	7	27.00	.816	26	27 ^b	28	
	SKH+Dex	7	26.29	1.113	25	26 ^b	27	
	SKH+Mel	7	27.14	.900	26	27 ^b	28	
	SKH+Dex+Mel	7	27.00	.816	26	27 ^b	28	
19.05.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.14	4.598	31	39 ^a	40	
	SKH	7	27.14	1.069	26	27 ^b	28	
	SKH+Dex	7	26.43	.976	26	26 ^b	27	
	SKH+Mel	7	27.29	1.113	26	27 ^b	28	
	SKH+Dex+Mel	7	27.14	.900	26	27 ^b	28	
26.05.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.43	4.117	32	39 ^a	40	
	SKH	7	27.86	1.952	26	27 ^b	30	
	SKH+Dex	7	26.86	1.215	26	26 ^b	28	
	SKH+Mel	7	28.14	1.574	27	28 ^b	30	
	SKH+Dex+Mel	7	27.71	1.380	27	27 ^b	29	
02.06.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.43	4.117	32	39 ^a	40	
	SKH	7	28.71	2.812	27	28 ^b	31	
	SKH+Dex	7	27.57	1.512	26	27 ^b	29	
	SKH+Mel	7	28.86	1.864	27	29 ^b	31	
	SKH+Dex+Mel	7	28.86	1.574	27	29 ^b	30	
09.06.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.57	3.910	33	39 ^a	40	
	SKH	7	29.43	2.992	27	28 ^b	32	
	SKH+Dex	7	28.00	1.414	27	28 ^b	29	
	SKH+Mel	7	29.14	2.268	27	29 ^b	32	
	SKH+Dex+Mel	7	30.43	1.718	29	30 ^b	32	
14.06.2021	Kontrol	7	40.14	.900	39	40 ^a	41	<0.001
	Sham	7	37.71	3.638	33	39 ^a	40	
	SKH	7	30.14	3.976	28	28 ^b	33	
	SKH+Dex	7	28.29	1.976	27	28 ^b	29	
	SKH+Mel	7	29.57	2.573	27	29 ^b	33	
	SKH+Dex+Mel	7	31.29	2.138	29	32 ^b	33	

*Kruskal-Wallis testi ve post-hoc Dunn testi; **Ortanca değerlerinin yanında tamamen farklı harf taşıyan gruplar arasında anlamlı fark vardır.

Ayrıca ETZ ölçümleri bakımından her bir grupta ayrı ayrı ölçüm periyotları karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda ve Sham grubunda periyotlar arasında anlamlı farka rastlanmadı. SKH grubunda anlamlı düzeyde en yüksek ortalama 05.05.2021 tarihli ölçümde elde edildi. Bunu 02.06.2021 tarihi ile 14.06.2021 tarihleri arasında yapılan ölçüm ortalamaları izledi. En düşük ortalama ise 12.05.2021 tarihi ile 26.05.2021 tarihleri arasında çıktı. Ortalama ETZ değerinde 02.06.2021 tarihinden itibaren anlamlı bir artış gözlemlense de ilk ölçümdeki düzeye ulaşamadı. SKH+Dex grubunda anlamlı düzeyde en yüksek ortalama 05.05.2021 tarihli ölçümde elde edildi. Bunun dışında 14.06.2021 tarihinde yapılan ölçüm ortalaması 26.05.2021, 19.05.2021 ve 12.05.2021 tarihli ölçüm ortalamalarından anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. Ayrıca 02.06.2021 tarihinde yapılan ölçüm ortalaması 12.05.2021 tarihli ölçüm ortalamasından anlamlı düzeyde daha yüksek çıktı. Bunun dışında anlamlı farka rastlanmadı. SKH+Mel grubunda anlamlı düzeyde en yüksek ortalama 05.05.2021 tarihli ölçümde elde edildi. Bunu 26.05.2021 tarihi ile 14.06.2021 tarihleri arasında yapılan ölçüm ortalamaları izledi. En düşük ortalama ise 12.05.2021 tarihi ile 19.05.2021 tarihleri arasında çıktı. Ortalama ETZ değerinde 26.05.2021 tarihinden itibaren anlamlı bir artış gözlemlense de ilk ölçümdeki düzeye ulaşamadı. SKH+Dex+Mel grubunda anlamlı düzeyde en yüksek ortalama 05.05.2021 tarihli ölçümde elde edildi. Bunu 09.06.2021 tarihi ile 14.06.2021 tarihleri arasında yapılan ölçüm ortalamaları izledi. Daha sonra 26.05.2021 ve 02.06.2021 tarihli ölçüm ortalamaları geldiği ve en düşük ortalamanın 12.05.2021 ve 19.05.2021 tarihlerinde olduğu belirlendi. Bu sonuca göre ortalama ETZ değeri artsada son periyotta ilk ölçüm düzeyine ulaşmadığı görüldü.

4.3. Moleküler Genetik Analiz Bulguları

Gen ifadesi moleküler analizlerinde “iTaQ™ Universal SYBR® Green One-Step Kit” kullanılarak β -Aktin, XO, NF- κ B, CASP3 ve SOD mRNA’ları GZ-PZT ile çoğaltıldı (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1. β -Aktin, XO, NF- κ B, CASP3 ve SOD mRNA’larının GZ-PZT ile çoğalım grafiği. β -Aktin, XO, NF- κ B, CASP3 ve SOD RNA’ları tek basamaklı yöntem ile GZ-PZT cihazında çoğaltıldı ve floresan çoğalım grafikleri elde edildi.

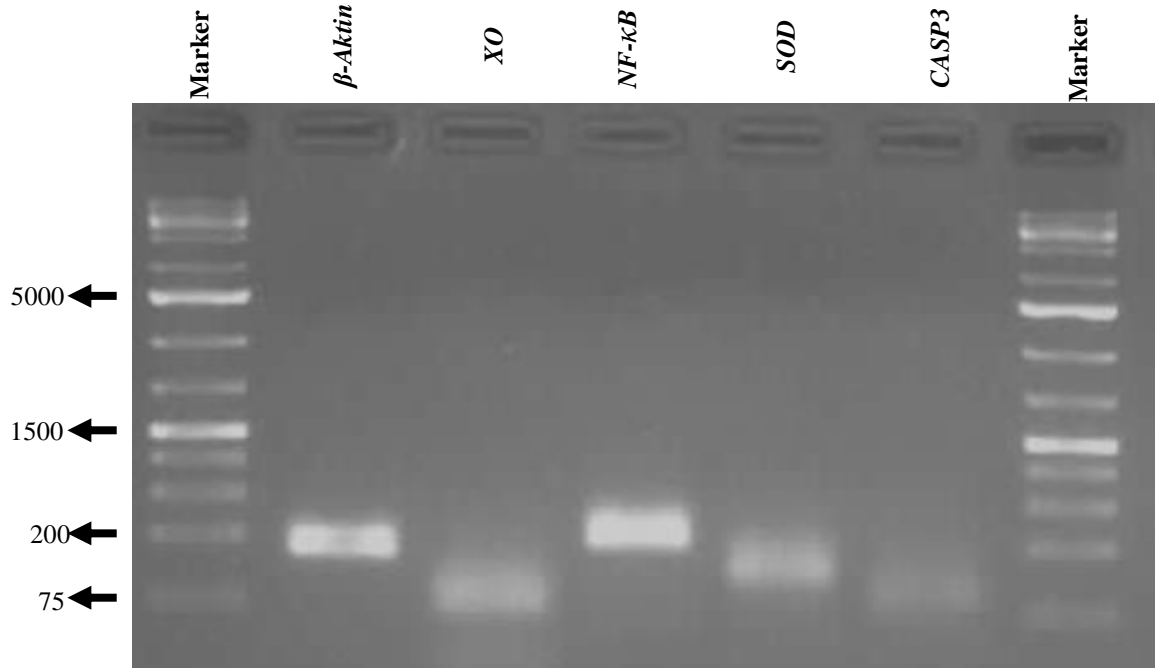
β -Aktin, XO, NF- κ B, CASP3 ve SOD RNA’ları kullanılarak yapılan tek basamaklı GZ-PZT sonrası DNA Agaroz jel elektroforezinde örnekler koşturularak primer bağlanmasının özgünlüğü kontrol edildi. Analiz sonucunda her gen için tek ve istenilen büyüklükte PZT ürünlerinin oluştuğu tespit edildi (Şekil 4.3.2).

GZ-PZT ile gen ifadesi analizi için CASP3, NF- κ B, SOD ve XO genlerinin Ct değerleri kendi grupları içerisinde β -Aktin değerlerine göre oranları hesaplandı. Kontrol grubunda yer alan genin β -Aktin genine oranı farklı gruplar ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Sinir dokusu kontrol ve uygulama grupları CASP3, NF- κ B, SOD ve XO gen ifadeleri karşılaştırıldığında, bütün gruplarda CASP3, NF- κ B, SOD ve XO gen ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Tablo 6).

Tablo 6. Gruplarda ölçülen sinir dokusu *CASP3*, *NF-κB*, *SOD* ve *XO* genleri mRNA seviyelerinin/*β-Aktin* mRNA seviyesi oranı

	Kontrol	Sham	SKH	SKH+Dex	SKH+Mel	SKH+Dex+Mel
<i>CASP3</i>	19.6 ± 0.6	19.5 ± 0.7	18.0 ± 0.3	19.6 ± 0.7	19.9 ± 1.2	18.7 ± 1.0
<i>NF-κB</i>	7.7 ± 0.5	7.6 ± 0.5	7.2 ± 0.3	7.6 ± 0.4	8.1 ± 0.5	8.4 ± 1.0
<i>SOD</i>	14.9 ± 0.9	14.8 ± 0.7	14.9 ± 0.4	14.5 ± 0.6	14.8 ± 0.9	13.6 ± 1.0
<i>XO</i>	9.3 ± 0.5	9.4 ± 0.9	6.9 ± 1.1	8.8 ± 0.9	9.2 ± 1.3	9.1 ± 1.5

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verildi.



Şekil 4.3.2 *β-Aktin*, *XO*, *NF-κB*, *CASP3* ve *SOD* mRNA'larının PZT transkripti büyüklük analizi. Örnekler *β-Aktin*, *XO*, *NF-κB*, *CASP3* ve *SOD* primerleri ile GZ-PZT'de çoğaltıldı ve DNA agaroz jel (% 2) elektroforezinde ayrıştırılarak görüntüledi. DNA marker; GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Katalog no: SM1333).

4.4. Biyokimyasal Analiz Bulguları

GSH, SOD, MDA ve XO düzeylerinin SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu bulundu ($p<0.05$). Spinal kord hasarı ile birlikte yükselen GSH, SOD, MDA ve XO seviyelerinin Dex ve Mel'in birlikte uygulandığı SKH+Dex+Mel grubunda Kontrol grubu düzeylerine düştüğü tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. Sinir dokusu biyokimyasal parametreleri

	Kontrol (n=7)	Sham (n=7)	SKH (n=7)	SKH+ Dex (n=7)	SKH+Mel (n=7)	SKH+Dex+Mel (n=7)
GSH (mg/mg protein)	0.05 ± 0.01 ^a	0.15 ± 0.02 ^b	0.18 ± 0.03 ^b	0.18 ± 0.04 ^b	0.40 ± 0.04 ^c	0.07 ± 0.01 ^a
SOD (ng/mg protein)	0.40 ± 0.12 ^a	0.87 ± 0.05 ^b	0.98 ± 0.28 ^b	0.96 ± 0.04 ^b	1.20 ± 0.03 ^c	0.53 ± 0.09 ^a
MDA (nmol/mg protein)	2.32 ± 0.20 ^a	2.75 ± 0.22 ^a	4.04 ± 0.23 ^b	4.05 ± 0.56 ^b	7.85 ± 0.02 ^c	2.67 ± 0.18 ^a
XO (ng/mg protein)	9.56 ± 1.50 ^a	11.65 ± 0.86 ^{a,b}	30.83 ± 1.98 ^d	24.58 ± 3.14 ^{c,d}	82.17 ± 10.93 ^e	18.47 ± 4.85 ^{b,c}

Veriler, ortalama ± standart sapma olarak verildi. Satırlarda farklı olan harfler istatistik olarak birbirinden anlamlı bulundu ($p<0.05$)

4.5. Histopatolojik Analiz Bulguları

Histopatolojik incelemede Kontrol, Sham ve SKH+Dex+Mel grubu benzer morfolojik özelliklerde olup hafif derecede ödem dışında patolojik bulgu izlenmedi (Tablo 8). En belirgin değişiklikler SKH grubunda görüldü. Bu grupta ileri derecede ödem, hemoraji ve enflamasyon mevcuttu. İnflamasyonun büyük çoğunluğunu lenfositler ve makrofajlar oluşturmaktaydı. SKH+Mel grubunda ağır derecede ödem ve orta derecede hemorajiye hafif derecede enflamasyon eşlik ediyordu. SKH+Dex grubunda ise orta derecede ödem ve hemoraji izlenirken enflamasyon görülmedi. Bulgular istatistik açıdan incelendiğinde; SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında orta düzeyde gözlenen

hemoraji diğer 3 gruptan daha fazla idi ($p<0.001$). SKH grubunda diğer 5 gruba göre ağır düzeyde hemoraji görüldü ($p<0.001$). Orta düzeyde ödem görülme sıklığı SKH+Dex grubunda diğer 5 gruptan anlamlı düzeyde daha yüksek iken, ağır düzeyde ödem görülme sıklığı SKH ve SKH+Mel gruplarında diğer 4 gruptan fazla idi ($p<0.001$). Nöronal/Aksonal dejenerasyon görülme sıklığı SKH grubunda diğer 5 gruptan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0.001$). Hafif enflamasyon SKH+MEL grubunda diğer 5 gruba göre daha fazla idi. SKH grubunda diğer 5 gruba göre ağır enflamasyon tespit edildi ($p<0.001$) (Tablo 9).

Tablo 8. Histopatolojik inceleme bulguları

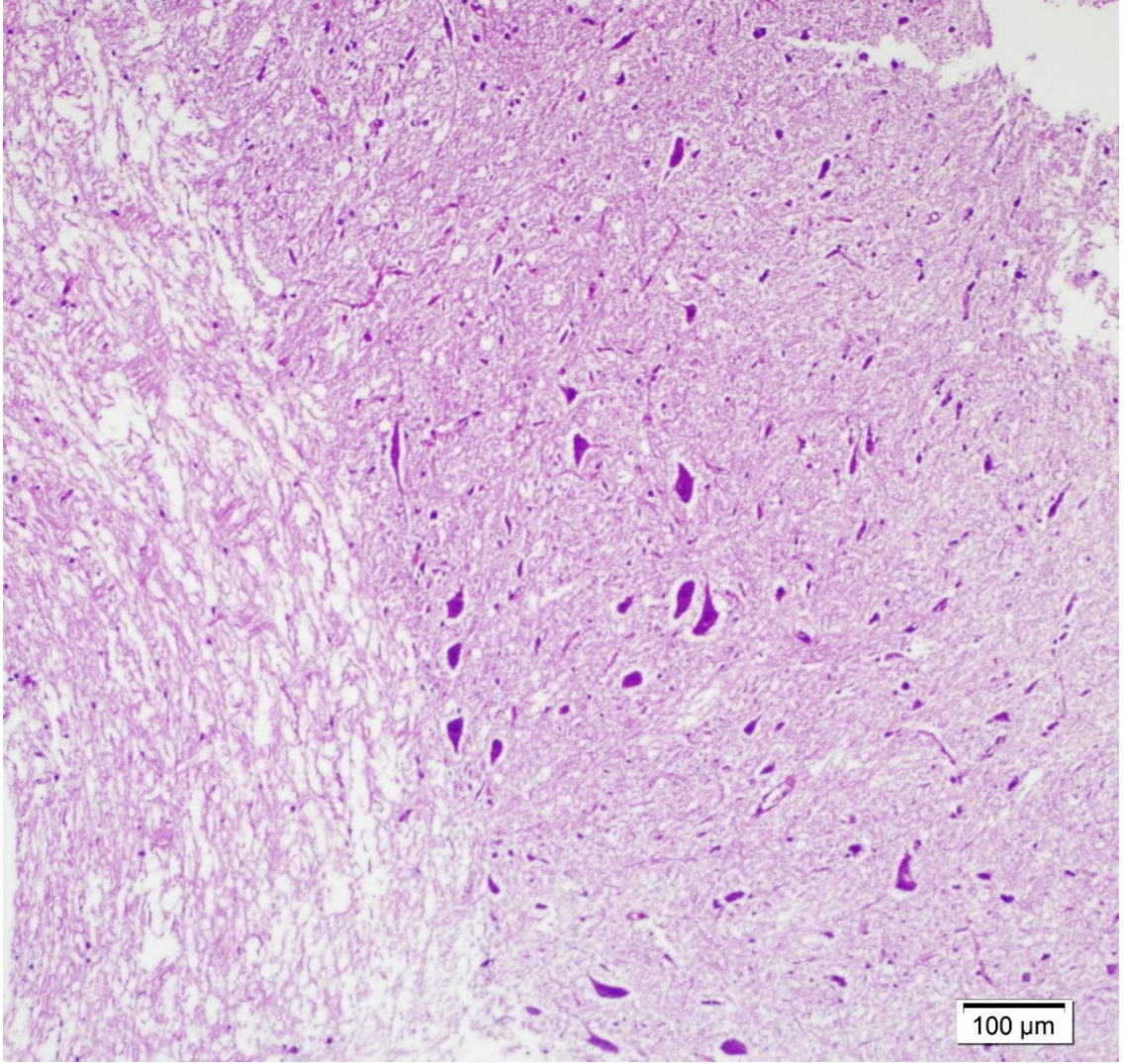
Gruplar	Hemoraji	Nekroz	Ödem	Nöronal/Aksonal Dejenerasyon	İnflamasyon	Laserasyon
Kontrol	0	0	1	0	0	0
Sham	0	0	1	0	0	0
SKH	3	0	3	1	3	0
SKH+Dex	2	0	2	0	0	0
SKH+Mel	2	0	3	0	1	0
SKH+Dex+Mel	0	0	1	0	0	0
YOK: 0, HAFİF: 1, ORTA : 2, AĞIR : 3						

Tablo 9. Histopatolojik değerlendirme sonuçlarının gruplara göre tanımlayıcı değerleri

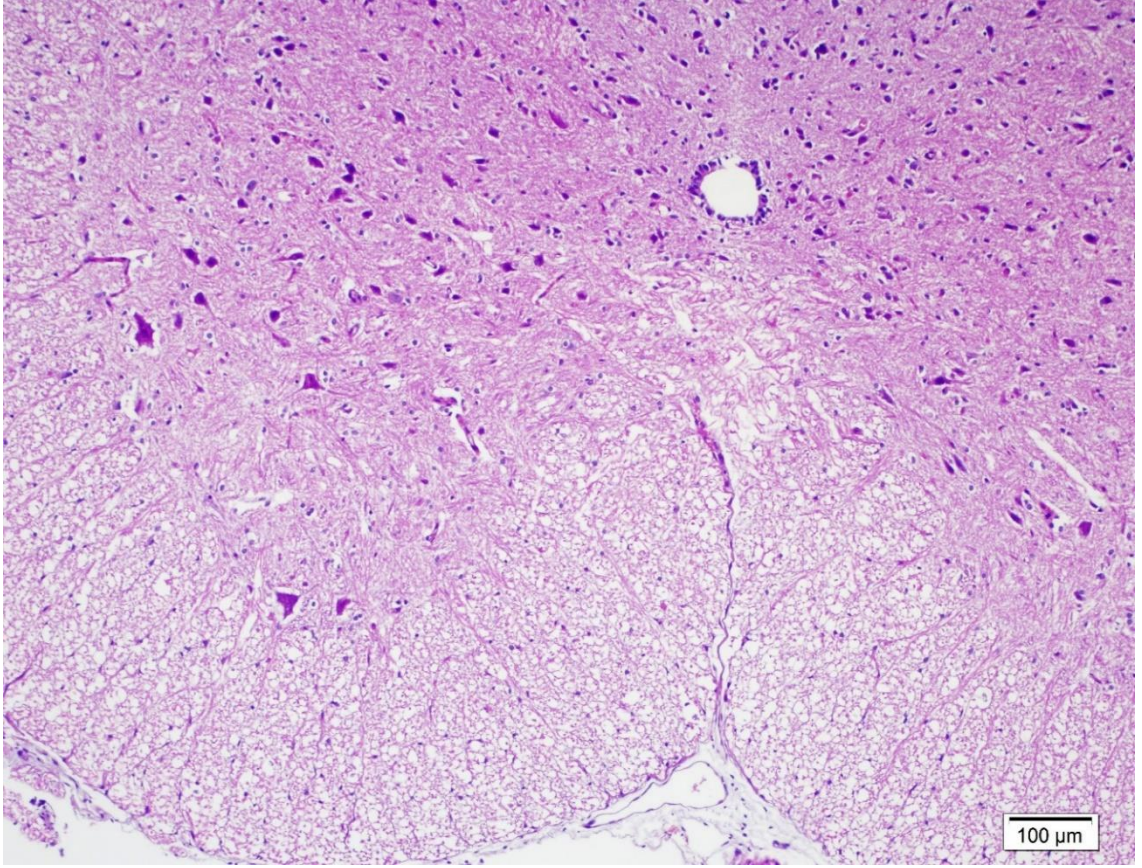
	Kontrol		Sham		SKH		SKH+Dex		SKH+Mel		SKH+Dex+Mel		p*, **	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
HEMORAJİ	0	6 _a	100.0	8 _a	100.0	0 _b	0.0	0 _b	0.0	0 _b	0.0	7 _a	100.0	<0.001
	2	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	
	3	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	
ÖDEM	1	6 _a	100.0	8 _a	100.0	0 _b	0.0	0 _b	0.0	0 _b	0.0	7 _a	100.0	<0.001
	2	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	
	3	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	
NÖRONAL / AKSONAL DEJ.	0	6 _a	100.0	8 _a	100.0	0 _b	0.0	7 _a	100.0	7 _a	100.0	7 _a	100.0	<0.001
	1	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	
İNFLAMASYON	0	6 _a	100.0	8 _a	100.0	0 _b	0.0	7 _a	100.0	0 _b	0.0	7 _a	100.0	<0.001
	1	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	
	3	0 _a	0.0	0 _a	0.0	7 _b	100.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	0 _a	0.0	

*Fisher-Freeman-Halton exact test, **Her bir alt simge harfi, sütun oranları birbirinden 0.05 düzeyinde önemli ölçüde farklı olmayan grup kategorilerinin bir alt kümesini belirtir.

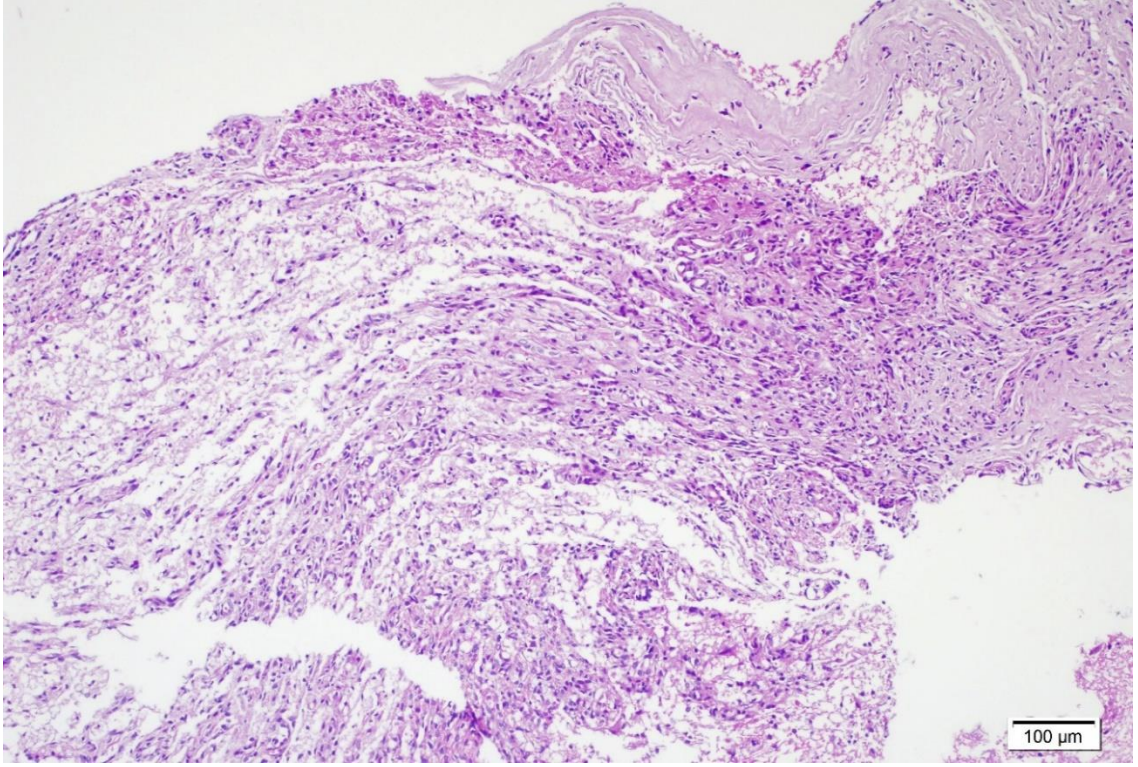
Her grubu temsilen seçilen preparatlar Olympus BX 53 immünflorasan mikroskopta Olympus DP2 BSW görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı (Şekil 4.5.1-9).



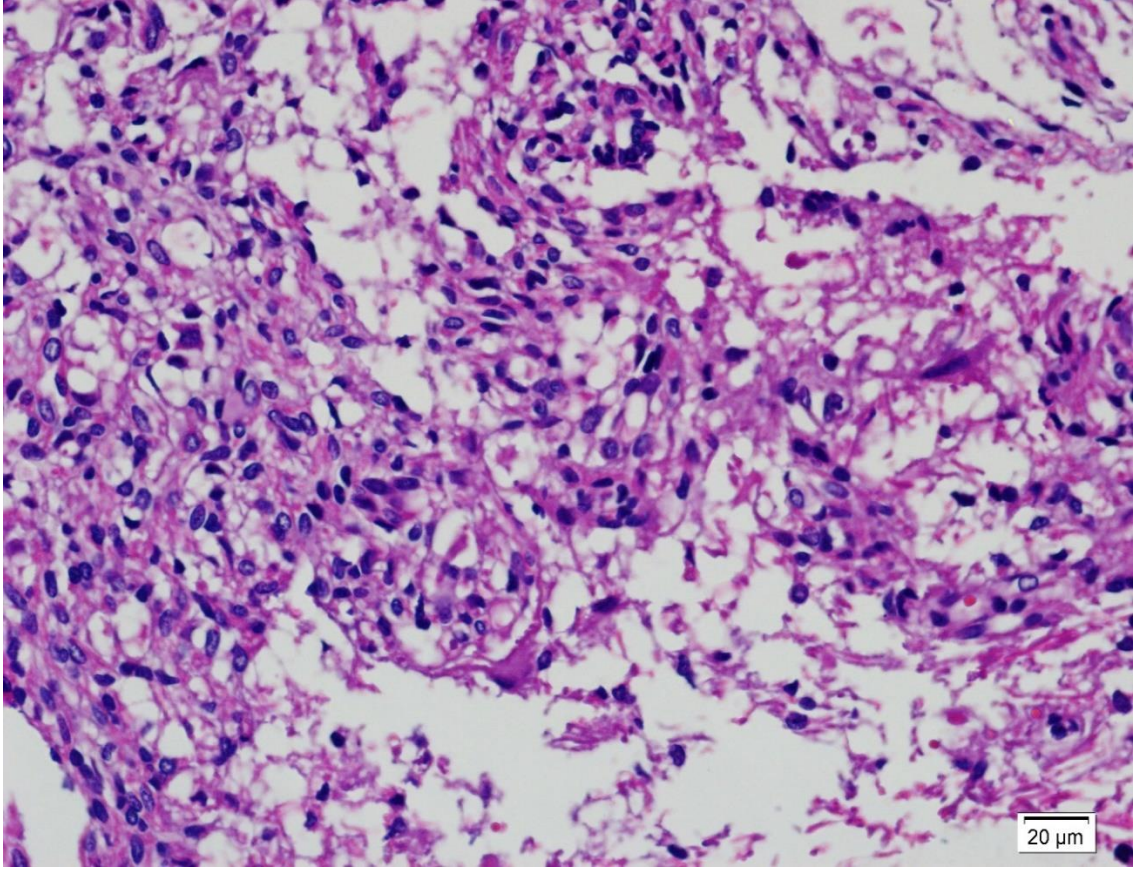
Şekil 4.5.1. Kontrol grubu, normal histopatolojik görünüm, HEX100



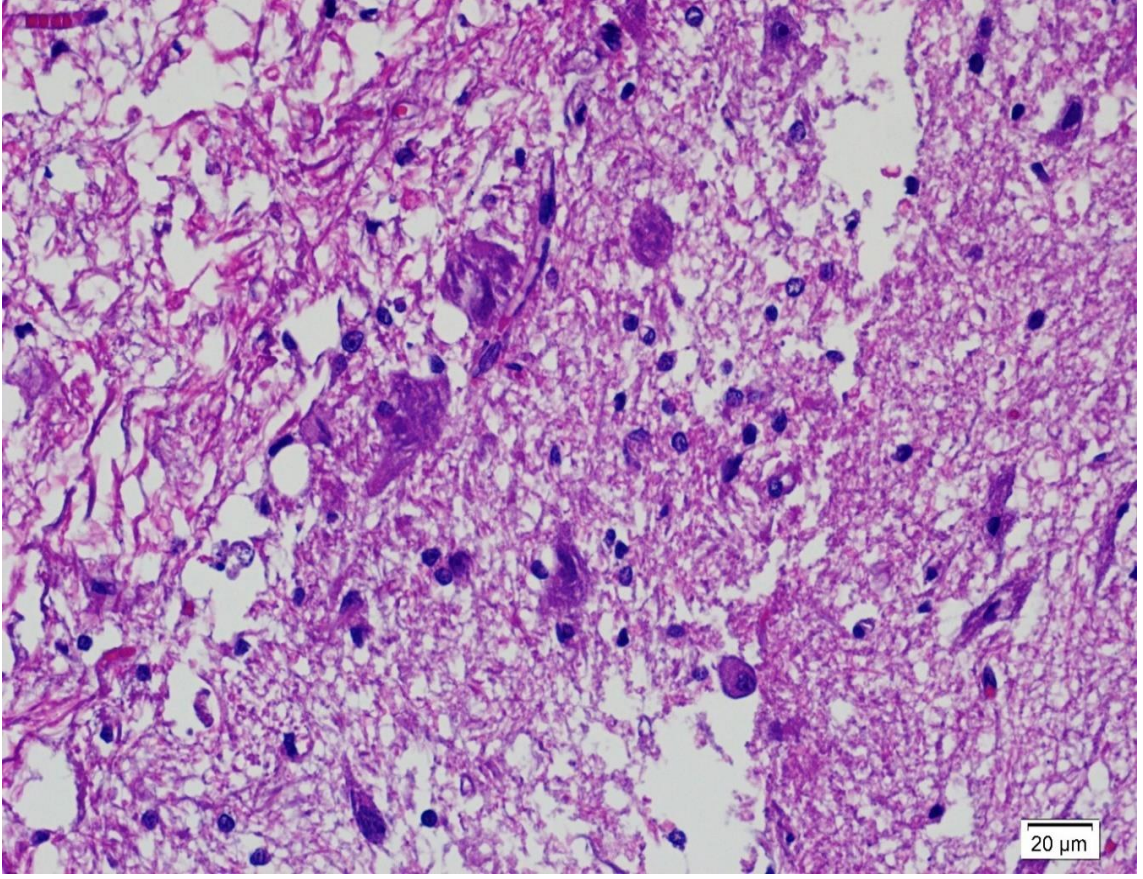
Şekil 4.5.2. Sham grubu, hafif derecede ödem, HEX100



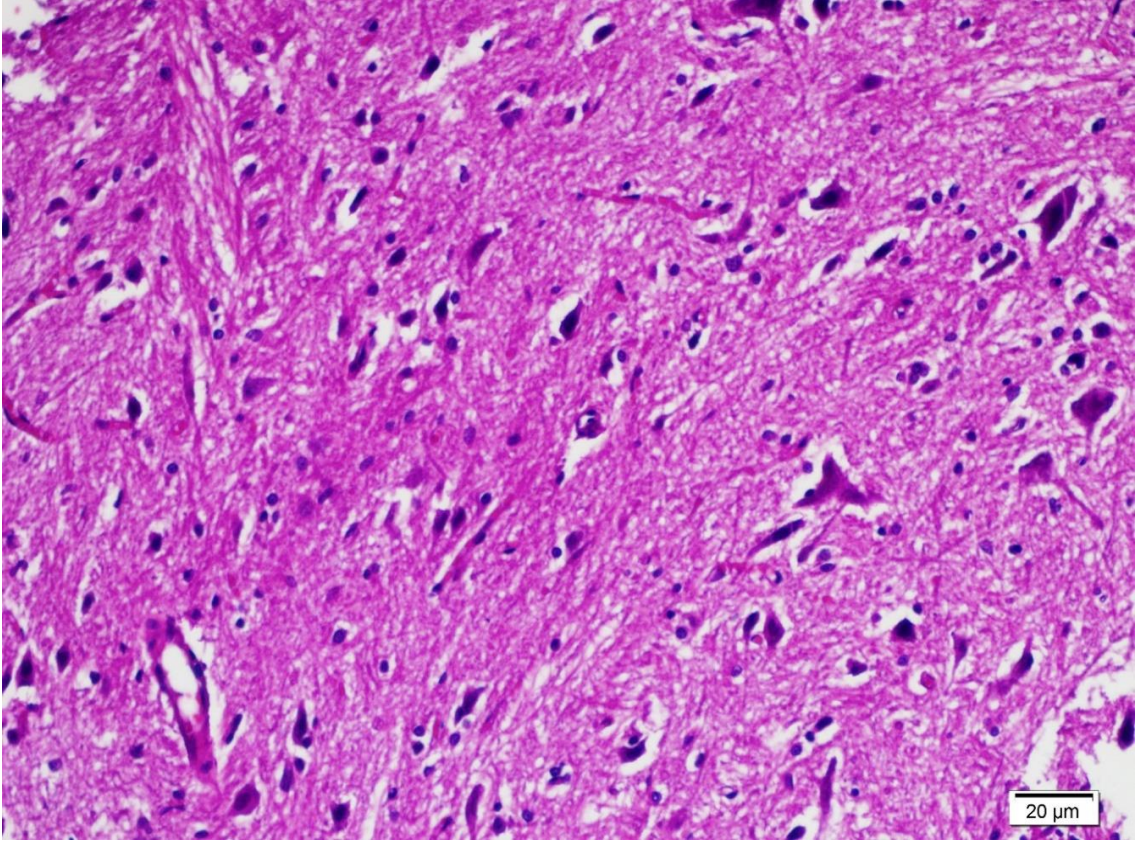
Şekil 4.5.3. SKH grubu, belirgin enflamasyon, HEX100



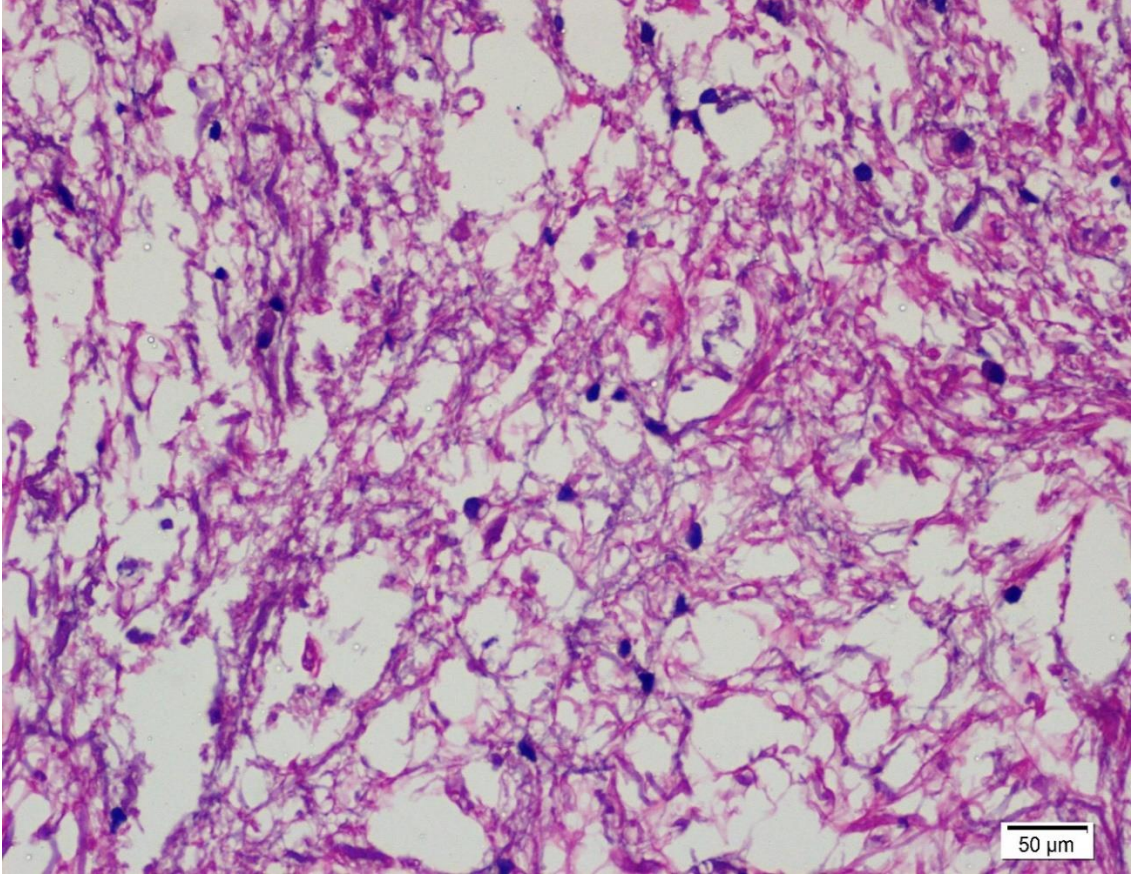
Şekil 4.5.4. SKH grubu, belirgin inflamasyon, HEX400



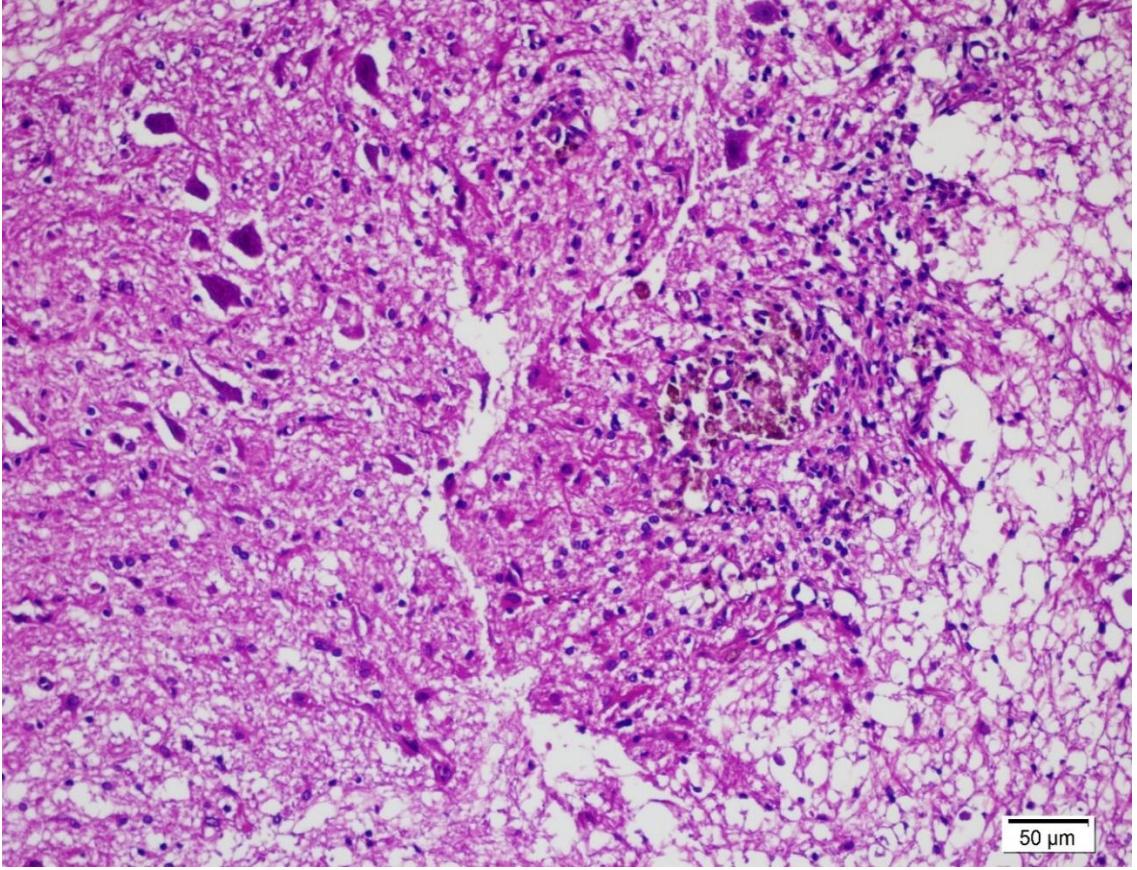
Şekil 4.5.5. SKH grubu, nöranal dejenerasyon, HEX400



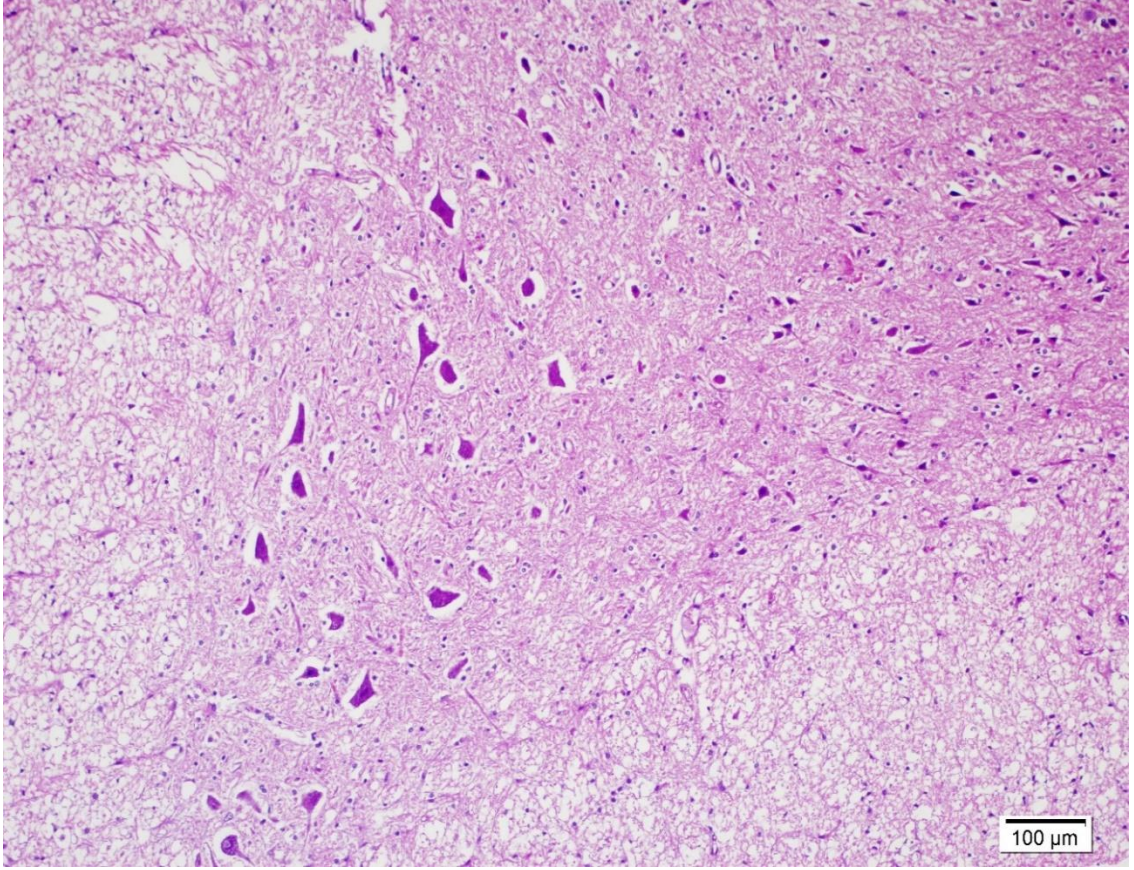
Şekil 4.5.6. SKH+Dex grubu normal alanlar, HEX400



Şekil 4.5.7. SKH+Dex grubu, hemoraji, HEX400



Şekil 4.5.8. SKH+Mel grubu, hemoraji, ödem ve enflamasyon, HEX200



Şekil 4.5.9 SKH+Dex+Mel grubu, normal histopatolojik görünüm, HEX100

5. TARTIŞMA

Bu tezin biyokimyasal bulgularında, kontrol grubuna göre SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında artan GSH, SOD, MDA ve XO düzeyleri tespit edildi. Spinal kord hasarı ile birlikte yükselen GSH, SOD, MDA ve XO seviyeleri SKH+Dex+Mel grubunda kontrol grubu düzeylerine kadar gerilemişti. Gen ifade analizlerinde gruplarda değişiklik tespit edilmedi. Spinal kord volüm artışı ilaç verilen tedavi gruplarında belirgin bir azalma gösterirken, T2 sinyal artışı sadece SKH+Dex+Mel grubunda anlamlı düzeyde azalmıştı. Ortalama MTS ölçümleri SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel gruplarında anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Histopatolojik incelemede SKH grubunda travmaya bağlı ciddi patolojik hasar tespit edilmişken Mel ve Dex'in ayrı uygulamasının bu hasarı iyileştirdiği, Mel ve Dex in birlikte kombine tedavisinin ise hasarı daha da iyileştirici etki yaptığı tespit edildi.

SKH insanın yaşam kalitesini oldukça etkileyen ve kişide uzun süreli fiziksel bozulmaya neden olan önemli bir travmadır. Spinal kord yaralanmaları sıklığı yıllık ortalama 7500- 10.000 kişi arasında değişmektedir. Görülme yaşı 16-30 yaş arasında fazla olmakla beraber genç popülasyonu hedef almaktadır (185). SKH sonrası hayatta kalanların çoğu normal yaşantısına dönememektedirler. Sekonder yaralanma mekanizmasının çok iyi anlaşılabilmesi bu kötü prognoza neden olmaktadır. Travma sonrası motor fonksiyonların korunmasına ve oluşan nöral doku hasarının azaltılması yönelik hücre bazda ve moleküler düzeyde klinik ve laboratuvar çalışmaları devam etmektedir (186). SKH'da mevcut tedaviler çoğunlukla destekleyici önlemler ile sınırlıdır. Etkilenen bireyler genellikle on yıllarca süregelen yatağa bağlı bir yaşam sürebilmektedirler (187).

SKH tedavisinde hücre bazda kök hücre aktarımı ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Omurilik hasarlı sıçanların oligodendrosit progenitör hücrelerin transplantasyonundan yedi gün sonra ayaklarını daha iyi hareket ettirebildikleri ve aksonlarının yeniden miyelinlendiği gösterilmiştir (188). Yetişkinlerin sinir sistemlerinin belli kısımlarından veya embriyolardan nöral kök hücreler çıkarılmaktadır. Bu hücreler astrositlere farklılaşarak yeni nöral hücrelerin büyümesine yardım edebilmektedirler

(189,190). Ancak hayvanlara kök hücrele transplantasyonu, tümör oluşumuna neden olabilmektedir. Bu nedenle bu kök hücreler, önce nöral progenitör hücrelere farklılaşmaları için muamele edilmekteler, daha sonra omurilik yaralanmasının etkili tedavisinde kullanılabilirler. Plasenta, yağ dokusu ve kemik iliği gibi çeşitli dokulardan nöral olmayan yetişkin kök hücreler çıkarılabilmektedir. Bu hücrelerin dolaylı olarak omurilik yaralanmasını tamirde yardımcı oldukları düşünülmektedir (191). Nöral ve embriyonik hücre kullanıldığında immün sistem yeni hücreleri reddedebilmektedir. Bu riski azaltmada kök hücrelerinin ilaç yardımı ile tedaviyi teşvik etmesi için alternatif bir yaklaşım olarak kullanılması önerilmiştir (192).

SKH, nöral dokunun direkt mekanik travmaya bağlı olarak zedelenmesi ile sonuçlanan primer yaralanma ve sonrasında tetiklenen sekonder hasar mekanizmalarını içermektedir (12,33). Primer mekanizma; travmatik olayın fiziksel gücü ve etkisinin bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Yaralanma şiddeti, ortaya çıkabilecek travmanın en önemli belirleyicilerindendir. Bu travmada sebep; sıkıştırma, kesme, yırtılma ve akut gerilme/distraksiyon olabilmektedir. Sekonder mekanizmada ise iskemi/reperfüzyon hasarı, enflamatuar süreçler, ödem, reaktif oksijen/azot türleri oluşumu, glutamat aracılı eksitotoksisite, hücre içi kalsiyum birikimi, proteazların aktivasyonu, Kaspazların yanı sıra, hücrel nekroz ve apoptoz yer almaktadır. SKH'dan sonra süperoksit, hidroksil radikali, singlet oksijen, hidrojen peroksit ve peroksinitrit gibi nitrojen ve reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir. Normal fizyolojik süreçler altında hücre sinyalleşmesine katılan bu serbest radikaller, SKH gibi patofizyolojik koşullar sırasında aşırı üretilerek, hücrel antioksidan savunmayı zorlayabilmekte ve sonuçta oksidatif stres ve ikincil yaralanma meydana gelebilmektedir (193). Bundan dolayıdır ki klinik çalışmalar daha çok sekonder yaralanmalar üzerine yoğunlaşmıştır (194). Spinal kord, iskemiye en duyarlı organdır (140). İskemik dokunun oksijenlenmesi dokuda, iskemiye göre daha ciddi bir hasara yol açmaktadır (195). Dokunun oksijenlenmesi ile gözlenen bu hasarın nedeni olarak hızla oluşan ROT türevleri ve diğer başka birçok mekanizmanın rol oynadığı bildirilmiştir. Fagositik inflamatuvar hücreler, DNA oksidatif hasarına, protein oksidasyonuna ve lipid peroksidasyonuna neden olan ROT'u oluşturmaktadırlar. Gecikmiş nekroz ve apoptoz bu süreç tarafından indüklenmektedir (75). Hücrede lipitler, proteinler, nükleik asitler bu hasara karşı oldukça duyarlıdırlar (196).

İskemi sonrası gelişen SKH'da pek çok faktör etkili olabilmektedir. En başta enerji eksikliği ihtiyacı,yanısıra glutamat artışı (eksitotoksisite), oksidatif stres ve gen ifadesindeki değişiklikler önem taşımaktadır (197). SKH sonrası bölgedeki astrosit ve

pericitler aktive olmaktadır ve bölgeye infiltratif fibroblastlar ve schwann hücreleri gelmektedir. Bu hücreler daha sonra hasarlı bölgede glial (cellüler) ve fibrotik (asellüler) hasar oluşturmaktadır. Daha sonra bölgede astrositler aktive olmakta ve bu astrositler TGF-B'leri arttırmakta ve de bölgede laminin ve fibronektinin miktarını da çoğaltarak hasarlı dokuda hücre içi iletişimi arttırmaktadır (198).

Apoptoz, SKH'ndan sonra gelişen sekonder hasarın önemli bir düzenleyicisidir (52). Apoptoz; sitokinler, inflamatuvar hasar, serbest oksijen radikalleri ve eksitotoksisite gibi sebeplerden dolayı gelişebilmektedir. Travmatik spinal kord hasarlar araştırmalarında apoptoz varlığı ve ilişkisi gösterilmiştir (199). Gliya hücrelerinde, miyelinli sinir liflerinde ve nöronlarda yapısal dejenerasyonların meydana geldiği ve 72 saat sonra alınan doku kesitlerinde bu hücrel değişikliklerin daha belirgin olduğu gözlenmiştir (152). Düşük oksijen, kanser ilaçları, gamma ve ultraviyole ışınlar, radyasyon gibi etkenler DNA hasarı oluşturarak apoptozis meydana getirebilmektedirler (94,200).

Apoptoz, etkisini başlangıç ve geç faz olarak iki fazda göstermektedir, başlangıç fazına genellikle nekroz da eşlik etmektedir. Geç faz ise en çok beyaz cevherde görülmekte, daha çok oligodendrosit ve mikrogliaları içermektedir (57). Apoptoz lezyon bölgesinde, yaralanmadan sonraki ilk 6 saat içinde başlamakta ve birkaç gün sonra da bu alanda çok sayıda apoptotik hücre görülmektedir. İzleyen günlerde, merkez bölgesinde apoptotik hücreler azalmakta, buna karşın primer yaralanma alanından uzakta apoptotik hücre ölümü artmaktadır. Bu yeni apoptotik dalga, daha çok beyaz cevherde lokalizedir ve yayılımı lezyon merkezinden oldukça uzak alanlara da ulaşabilmektedir (59).

Apoptozun tetiklenmesinde azalmış glutatyon düzeyleri etkindir (201). Glutatyon apoptozun kontrolünde önem arz etmektedir (202). Dex ve onun hücre içindeki alt molekülü PA, etkisini glutatyon düzeylerini arttırarak gerçekleştirmektedir. Apoptoz üzerine belirgin blokaj özelliği olan glutatyonun seviyelerini artıran Dex ve pantotenik asit, antiapoptotik etkinlik sağlamış olmaktadır (201).

SKH'nı takiben gelişen iskemi ve eksitotoksisite gibi hallerde, apoptoz, dominant dejeneratif süreç olan nekroz gibi akut hücre ölüm mekanizması haline de gelebilmektedir (48). Apoptoz, hücre popülasyonunun gelişimi ve bakımı için gerekli olan biyolojik bir süreçtir. Bu süreçte, pro apoptotik moleküllerin (Fas, Fas-L, Bax, Kaspazlar 2, 3, 6, 7, 8 ve 9) katılımını içeren bir hücre ölüm programının aktivasyonundan sonra yaşlanmış veya hasar görmüş hücreler elimine edilmektedir (56). Aşırı oksidatif stres oluşumu apoptoz ve programlı hücre ölümünü indükleyebilmektedir.

Nekrozda hücrenin şişmesi, mitokondri genişlemesi, organel yıkımı ve plazma membranında dağınıklar olduğu bildirilmektedir. Dağılan hücre bütünlüğü ile açığa çıkan sitoplazma materyali enflamasyona neden olabilmektedir. Apoptozisde plazma membranı dağılmamakta bununla birlikte yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre içi ATP seviyesi, hücrenin apoptozise mi veya nekroza mı yönleneceğinde belirleyici olabilmektedir (153). Bu durum apoptozisin erken safhasında mitokondrinin önemini ortaya koyabilmektedir. Eğer hücre ciddi olarak hasar görürse apoptotik yol için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak bu durumda nekroz ile ölecektir (203).

Yangısal süreç sırasında, yangı ile ilişkili genlerin uyarılması, nükleer transkripsiyon NF- κ B aktivasyonu ile oluşabilmektedir. NF- κ B yangı, doğal bağışıklık, hücre büyümesi ve hücre ölümü de dahil olmak üzere hücresel cevaplarda önemli olan çeşitli genlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan ve oksidatif strese oldukça duyarlı olan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- κ B temel olarak tüm hücrelerde hemen hemen ifade edilebilmektedir. Aktivasyonundan sonra NF- κ B çekirdeğe geçmekte ve proinflatuar genlerin transkripsiyonunu düzenleyecek olan spesifik elementlere bağlanmaktadır (204). NF- κ B aktivasyonu için iki ayrı yol tarif edilmiştir. TNF α ve IL-1 gibi mikrobiyal ürünler ve proinflatuar sitokinler tarafından tetiklenmekte ve genellikle RelA- veya cRel-içeren komplekslerin aktivasyonuna yol açmakta olup buna "Kanonik" yol denmektedir. Diğer bir yol, TNF-ailesi sitokinler - lenfotoksin β (TNFSF3) , CD40 ligandı (CD40L ve TNFSF5), B hücresi aktive edici faktör (BAFF ve TNFSF13B) ve NF- κ B ligandının reseptör aktivatörü (RANKL) tarafından aktive edilmektedir, buna da "Alternatif" bir NF- κ B aktivasyon yolu denmektedir (125). Mel'in NF- κ B aktivitesini inhibe ettiğini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar, Mel'in bir proteazom inhibitör olduğu görüşü ile tutarlıdır, aynı zamanda doğal bir NF- κ B inhibitörü olduğuna dair kanıt olarak da yorumlanabilmektedir. Mel'in NF- κ B üzerindeki bu inhibe edici etkileri, dokuda anti-enflatuar ve pro-apoptotik etkiye katkıda bulunabilmektedir (205). Baydaş ve ark., beyin iskemisi yaptıkları sıçanlarda homosistein verilerek nöronal hücre ölümünün gözlemlendiği, Mel uygulaması ile Kaspaz-9 ve Kaspaz-3 aktivitesinde düşüş olduğunu, mitokondriden sitokrom-c' nin salınımının azaldığını bildirmişlerdir (206). Kaspaz-1 ve özellikle Kaspaz-3 proteinlerinde hasar sonrası artış olmaktadır. NF- κ B merkezi sinir sisteminde enflamasyon ve sekonder hasar süreçlerinde önemli bir

düzenleyici transkripsiyon faktörüdür ve travma sonrası NF-κB bağlı genler yüksek oranda aktive olarak sinir sisteminde iyileşme etkilerine öncülük edebilmektedirler (207).

Artan XO aktivitesi ROT üretimini artırabilmektedir. Özellikle hasarlı dokularda bu enzimin arttığı gözlenmiştir. Dolayısıyla XO'nun pro-oksidatif bir enzim olduğu kabul edilmiştir (168). Mel'in, XO aktivitesini inhibe ettiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. Ancak bununla ilgili çalışmalar henüz net değildir ve Mel'in bu inhibisyonu doğrudan baskılamak yerine ksantin oksidaz kaynaklı reaksiyon ürünlerini nötralize ederek sağladığı düşünülmektedir (208). Sainz ve ark., Mel'in, mitokondriden serbest radikal oluşumunu önleyerek apoptozis oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir (144). Kavaklı ve ark., beyin iskemisi oluşturulan sıçanlara dışarıdan verilen Mel'in fizyolojik Mel kadar etkili koruyucu olduğunu belirtmişlerdir (209). Bir başka çalışmada Kunduzova ve ark., sıçanlarda renal iskemi-reperfüzyon hasarında uygulanan Mel'in Kaspaz-3 aktivasyonunu bloke ederek apoptozis oluşumunu engelleyerek, hasarın oluşmasında önleyici rolü olabileceği bildirilmiştir (146).

SOD hücredeki ilk detoksifikasyon enzimi ve en güçlü antioksidandır. ROT'a karşı ilk sırada yer alan savunma sisteminin bir parçası olarak görev alan endojen bir antioksidan olarak belirtilmiştir (210). Birçok araştırma Mel'in SOD gen ifadesini ve aktivitesini arttırdığını bildirmiştir (211). Erten ve ark., tavşanlarda tedavi amaçlı verilen Mel'in spinal kord iskemisinde artan MDA seviyelerini düşürdüğü, azalan GSH seviyelerini arttırdığını göstermişlerdir (212). Mel'in kan-beyin bariyerini kolay bir şekilde geçmesi nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Olakowska ve ark., yapmış oldukları çalışmada Mel'in özellikle kanser tedavisinde ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu rol oynadığını gözlemlemişlerdir (149). Mel ve Dex'ün literatürde MDA ve XO aktivitesini azalttığını SOD ve GSH'ı arttırdığına dair çalışmalar mevcuttur (201,205,213–216). Dobsak ve ark., iskemi-reperfüzyon hasarına karşı Mel'in antioksidan olarak koruyucu etkisinin olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca oksidatif strese bağlı oluşan apoptozis olayını Mel'in radikal süpürücü olarak engellediğini açıklamışlardır (151). Onur ve ark., testiküler dokularda Mel'in antioksidan etkisine bağlı olarak Bax ve Bcl-2 proteinlerini etkileyerek apoptozisi inhibe ettiğini bildirmişlerdir (147).

SKH patofizyolojisinde ROT ve oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Makrofajlar, erken evre (proinflamatuvar) M1 makrofajlar ve daha sonraki evre M2 makrofajlar olarak iki sınıfa ayrılmaktadırlar. Travmaya akut

yanıt sırasında gözlenen M1 makrofajlardır ve yüksek seviyelerde ROT üretmektedirler. M1-makrofajlar, yabancı mikropları ve yara kalıntılarını çıkarmak için fagositoz ve proinflatuar sitokinlerin salınımı ile hasar bölgesinde konjenital bağışıklığı kolaylaştırmaktadırlar (193). Serbest oksijen radikallerinin çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmesi ve lipidlerin oksidatif bozulması ile lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Oksijen radikalleri, fosfolipidlerin doymamış yağ asitlerinin çift bağlarını oksitleyerek toksik fosfolipid yan ürünleri olan oksitlenmiş fosfatidilkolin, akrolein ve 4-hidroksinonenal oluşumuna neden olmaktadır. Yüksek derecede reaktif hidroksil radikalleri, zar çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girmektedir. Süperoksit anyonları nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturmaktadır. Peroksinitritte lipid peroksidasyonunu başlatan radikalik moleküllerden biridir. Lipidlerin peroksidasyonu, hücrel membran akışkanlığını ve geçirgenliğini bozmakta, metabolik süreci kesintiye uğratmakta ve iyon taşıma sistemlerini değiştirmektedir (217). Oksidatif stresin hafifletilmesi, SKH'nin terapötik müdahalesi için etkili bir strateji olabilmektedir. Dex ve Mel gibi biyoaktif bileşiklerin, ROT'u temizleme, redoks-aktif metal iyonlarını şelatlama ve ksantin oksidazı inhibe etme gibi antioksidan özelliklerinden dolayı lipid peroksidasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, bu doğal biyoaktif ajanlar tarafından aktive edilen hücre sinyal yolları hala net değildir (218). Serbest radikal hasarına karşı hücrelerin koruyucu antioksidan mekanizmaları vardır. Endojen antioksidan olan GSH-Px ve SOD bu defans mekanizmalarının başında gelmektedirler (16,219).

SKH tedavisinde kullanılan metilprednizolon ile yapılan çalışmalarda hasarlı spinal kord dokusunda MDA seviyesinin yükseldiği, CAT, SOD ve GSH-Px seviyelerinin azaldığı, metilprednizolon uygulanan gruplarda ise MDA seviyesi azalırken, SOD, CAT ve GSH-Px enzim seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (213–215). Etensel ve ark., sıçanlarda testis iskemi modeli oluşturdukları bir modelde Dex'in lipid peroksidasyonunu azaltarak serum MDA düzeylerini azalttığını ve antinflatuar etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir (220). Bir başka çalışmada, Dex'in deneysel olarak sıçanlarda oluşturulan testis iskemi hasarında lipid peroksidasyonunu ve testiste oluşan hasarı hem erken dönemde hem de geç dönemde azalttığı bildirilmiştir (221).

Dex hücre içinde pantotenik aside çevrilmektedir (222). Dex'in uzun süredir antiinflatuar ve antiapoptotik etkileri bilinmektedir (201). Dex'in antioksidan özelliği ile ilgili fizyolojik mekanizmalar net olmasada, endojen antioksidan mekanizmaların rol aldığı gösterilmiştir (223). Glutatyon, serbest oksijen radikallerinin hücre içinde

etkinliğini yok eder. Bununla beraber DNA onarımında, kalsiyum dengesini sağlamakta, hücre siklusu düzenlemede rolü vardır (224). Bizim çalışmamızda Dex ve Mel'in tek başına kullanımlarının ROT göstergesi olan MDA ve XO enzimlerinde artış oluşturduğu ancak Dex ve Mel kombine kullanımlarının MDA ve XO seviyelerini düşürdüğünü tespit ettik. Genelde çalışmalarda Dex ve Mel ile tedavi neticesinde SOD ve GSH değerlerinin yükseldiği bulunmuş ve kullanılan bu maddelerin SKH'ın tedavisinde faydalı olduğu iddia edilmiştir (225–227). Biz de çalışmamızda aynı şekilde hem Mel verilen hem de Dex verilen gruplarda SOD ve GSH düzeylerini kontrol grubuna göre artmış bulduk. Bu artış, ortamda oluşan oksidatif stresi bastırmak için meydana gelmiş olabilir. Omurgalılarda Mel epifiz bezinde, sirkadiyen bir şekilde sentezlenmektedir. Gece karanlığında üretimi maksimum seviyelere ulaşmaktadır. Mel, reaktif oksijen türlerini ve reaktif azot türlerini reseptör aracılı olmayan yollarla doğrudan detoksifiye edebilmektedir. Ayrıca serbest radikallerden kaynaklanan moleküler hasarları Mel azaltabilmektedir. Bazal koşullar altında Mel tarafından uyarılan majör antioksidan enzimler arasında hücre içi süperoksit dismutazlar, selenyum içeren glutatyon peroksidazlar ve katalaz bulunmaktadır. Mel ayrıca, GSH seviyelerini arttıran enzimlerin aktivitelerini de artırabilmektedir. Mel tarafından inhibe edilen pro-oksidatif enzimler arasında nitrik oksit sentaz, miyeloperoksidaz ve eozinofil peroksidaz bulunmaktadır (228). Mel, serbest radikal hasarını önleme kabiliyeti ile apoptoz ve programlı hücre ölümünü de azaltabilmektedir (229). Mel, triptofan aminoasitinden sentezlenmekte, sirkadiyen ritmin sağlanmasında rol oynar ve plazmada proteinlere (albumin vb.) bağlanmaktadır (88). Yaşlanmayla artan hasarlanmış, disfonksiyonel hücrelere karşı dışarıdan verilen Mel'in oldukça etkili olduğu yapılan son çalışmalarda gösterilmiştir (144). Mel, hücrelerde gen ifadelerinde değişimlere neden olarak antioksidan savunma sistemini uyarabilmekte ve oksidasyona neden olabilecek enzim miktarlarının azalmasını da sağlayabilmektedir (230). Güçlü bir antioksidan olan Mel (138), beyin hücrelerinde ve diğer dokularda apoptozisi inhibe edebilmektedir (206). Mel'in ayrıca nöronal dokulardaki koruyucu etkisi hem in-vitro hemde in-vivo çalışmalarda gösterilmiştir (208). Ayrıca deneysel çalışmalar lipid peroksidasyonunu da azalttığını göstermiştir. Calpain eksspresyonunu azaltarak sitoskeletal proteinlerin yıkımını azalttığı gösterilmiştir (231). Mel'in ayrıca SKH da kan damarlarının kaybını da önlediği görülmüştür (232). Mel'in nöroprotektif etkisi tek ve kombine olarak pekçok çalışmada gösterilmiştir. Dexamethazone ile birlikte nöronal iyileşme üzerine farklı dozlarda pekçok çalışma yapılmıştır (233). Ayrıca Mel oligodentrosit yıkımını önlemede de etkilidir. SKH da

cistein proteaz oligodendrositlerin yıkımına sebep olmaktadır. Mel cistein proteazları inhibe ederek oligodendrositlerin yıkımını önlemekte ve myelin kaybını azaltarak nöroprotektif etki sağlamaktadır (233).

SKH'da artan ROT'lerinin biyolojik membranlarda hasar oluşturan lipid peroksidasyonuna yol açtığı pek çok çalışmada ortaya konulmuştur. Biz de çalışmamızda SKH grubunda MDA ve XO da artış gözlemledik. Mel ve Dex kombine kullanımı artan değerleri kontrol grubu değerlerine yaklaştırmıştı. Birçok araştırma hasarlı spinal kord dokusunda Mel verilmesinin oksidatif hasarı azalttığını bildirmiştir. Gül ve ark., spinal kord hasarında 50mg/kg dozda uygulanan Mel'in yeterli olduğunu bildirmişlerdir (137).

Dex, pantotenik asidin (PA) biyolojik olarak aktif bir alkol şeklidir ve dokudaki pantotenik aside dönüştürülmektedir. Pantotenik asit, GSH, koenzim A ve ATP sentezini arttırabilmektedir (170). GSH ve GSH-Px öncelikle oksidatif strese karşı savunma sistemleridir (74,234,235). Dex'in iskemi reperfüzyon hayvan modellerinde glutasyonu azaltarak, lipid peroksidasyonunu (MDA seviyesini düşürerek) önleyerek koruyucu rol gösterdiği ortaya konmuştur (180). Klinik uygulamalarda Dex'in topikal kullanımı yaygın olup, insan dermal fibroblast hücrelerinde gen ifadesi değişimine (*IL-6*, *IL-1 β* , *CYP1B1*, *CXCL1*, *CCL18* ve *KAP4-2*) neden olduğu ortaya konmuştur (168). Biz araştırmamızın biyokimyasal analizlerinde GSH, SOD, MDA ve XO düzeylerinin SKH, SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarında Kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit ettik. Spinal kord hasarı ile birlikte yükselen GSH, SOD, MDA ve XO seviyelerinin Dex ve Mel'in birlikte uygulandığı SKH+Dex+Mel grubunda Kontrol grubu düzeylerine kadar gerilediği görüldü. ROT göstergeleri olan MDA ve XO düzeyleri Mel uygulanmış hasarlı kord dokuda yüksekti. Aynı zamanda Dex ve Mel gibi iki tedavi edicinin aynı anda kullanılmasıyla ROT göstergesi olan MDA ve XO seviyeleri düşmüştü.

İlaç etkileşimleri değerlendirilirken asetilkolinesterazların kolin esterlerini potansiyalize ettiği bilinmektedir. Nitekim iki ilaç bir arada verildiklerinde oluşturdukları kombine etkinin miktarı, tek tek etkilerinin toplamında beklenen etkiden fazla ise supraaditif etkileşme veya potansiyalizasyon denilmektedir (236, 237). Mel veya Dex'in tek başına kullanımlarından ziyade birlikte kullanımlarının doku hasarını önlemede daha etken rol oynadığını, bunda birbirlerinin etkisini indükleyerek yani potansiyelize ederek yaptıklarını düşünmekteyiz.

Spinal kord hasarında oluşan aksonal zedelenme ve iskemik değişimlerin boyutu konvansiyonel MR sekanslarına ek olarak yapılan difüzyon MR ve Difüzyon Tensör

Görüntüleme ile ADC ve difüzyon anizotropi değerleri saptanarak hasar şiddeti, evreleri ve tedaviye verilen yanıtlar daha detaylı olarak saptanabilmektedir (238,239).

Araştırmamızda SKH oluşturduktan 3 hafta sonra T2A MR bulgusu sadece Kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı düzeyde değişmiş bulundu. 3 haftalık tedavi sonrasında bulgularda herhangi bir değişiklik tespit edilmedi. Benzer şekilde spinal kordda hemoraji bulgusu Kontrol ve Sham gruplarında 3 haftadaki çekimlerde hiç gözlenmezken diğer 4 grupta belirgin şekilde görüldü. SKH oluşturduktan 3 hafta sonra T2 sinyal artışı sadece Kontrol grubunda hiç gözlenmedi. Sham grubunda ise tüm hayvanlarda hafif düzeyde idi. 3 haftalık tedavi sonrasında yapılan çekimlerde halen hafif düzeyde olduğu, benzer şekilde SKH grubundaki hayvanların tamamında belirgin idi. T2 sinyal artışı, 3 haftalık tedavi sonrasında SKH+Dex ve SKH+Mel gruplarındaki tüm hayvanlarda halen orta düzeydeydi. Sadece SKH+Dex+Mel gruplarındaki tüm hayvanlarda belirgin bir düzelme tespit edildi.

En belirgin değişiklik spinal kordda volüm artışı parametresinde gözlemlendi. SKH oluşturduktan 3 hafta sonraki çekimlerde SKH+Dex+Mel grubunda orta şiddette volüm artışı gözlenirken, diğer 3 grupta ise belirgin bir volüm artışı tespit edildi. MR görüntüleri ile ortaya konan hasarın tedavi sonrasında makro düzeyde belirgin bir iyileşme gösterdiği tespit edildi.

Sakrifiye edilen sıçanlardan alınan sinir dokularında yapılan histopatolojik incelemede SKH grubunda ileri derecede ödem, hemoraji ve enflamasyon mevcuttu. İnflamasyonun büyük çoğunluğunu lenfositler ve makrofajlar oluşturmaktaydı. Nöranal/Aksonal dejenerasyon görülme sıklığı SKH grubunda diğer 5 gruptan anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu. SKH+Mel grubunda ağır düzeyde ödem görüldü. SKH+Mel ve SKH+Dex grubunda orta derecede hemoraji izlendi. SKH+Mel grubunda hafif derecede enflamasyon eşlik ederken SKH+Dex grubunda enflamasyon görülmedi. Kontrol grubu ve Sham grubu ve SKH+Dex+Mel grubu benzer morfolojik özelliklerde olup hafif derecede ödem dışında patolojik bulgu izlenmedi.

Araştırmada klinik bir değerlendirme olarak nörolojik parametreler de kullanıldı. Parmak açma testinde SKH oluşturmadan önce 6 grup arasında da anlamlı fark bulunmadı. Diğer zamanlarda da Kontrol ve Sham grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, bu iki gruptaki hayvanların PAT sonuçları diğer 4 gruptan anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Her ne kadar SKH oluşturmadan önceki tam parmak açılma düzeyine ulaşılmamış olsada SKH+DEX+MEL grubunda 3 haftalık tedaviye başladıktan 2 hafta sonrasında itibaren düzelme olmaya başladığı son iki ölçümde belirgin bir iyileşme

farkedildi. Modifiye Tarlov Skalası ile değerlendirmede SKH oluşturmadan önce 6 grup arasında da anlamlı fark bulunmadı. Diğer zamanlarda da Kontrol ve Sham grubu arasında anlamlı fark bulunmazken, bu iki gruptaki hayvanların PAT sonuçları diğer 4 gruptan anlamlı düzeyde daha iyi bulundu. Diğer 4 grupta 3 haftalık tedavi sonrasında SKH ve SKH+Mel gruplarında belirgin bir iyileşme olmazken, bunu SKH+Dex ve SKH+Dex+Mel çok belirgin bir iyileşme gözlemledik. Ayrıca ETZ ölçümleri bakımından her bir grupta ayrı ayrı ölçüm periyotları karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda ve Sham grubunda periyotlar arasında anlamlı farka rastlanmadı. SKH grubunda ortalama ETZ değerinde son 2 haftadan itibaren artış gözlemlendi. SKH+Mel ve SKH+Dex grubunda tedavi başlangıcında 1 hafta sonra belirgin bir iyileşme gözlenmeye başlandı ve tedavi bitiminde en iyi noktaya gelmişti ancak SKH oluşturmadan önceki düzeyi yakalayamadı. SKH+Dex+Mel grubunda da ortalama ETZ değeri son periyotta ilk ölçüm düzeyine ulaşmasa da diğer iki tedavi grubundan daha iyi bir iyileşme gösterdiği görüldü. Bu bulgular histopatolojik ve radyolojik parametrelerle de uyumlu idi.

Araştırmamızda biyokimyasal testlerde ölçülen GSH, MDA, SOD ve XO seviyelerine ek olarak sekonder hasarın sinir dokusunda *CASP3*, *NF-κB*, *SOD* ve *XO* gen ifadelerine etkileri de incelendi. Kontrol grubu ile diğer grupların sinir dokusu *CASP3*, *NF-κB*, *SOD* ve *XO* gen ifadeleri karşılaştırıldığında, *CASP3*, *NF-κB*, *SOD* ve *XO* gen ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Yapılan farklı çalışmalarda da, gen ifadesi ile genlerin son ürünü olan enzim aktiviteleri ve protein seviyeleri arasında doğrusal bir ilişki olmadığı, kontrol grubuna göre enzim aktivitelerinin veya protein seviyelerinin değişmesine rağmen gen ifadesinin aynı kaldığı gözlenmiştir (240, 241). Bunun sebebi mRNA ekspresyonu sonrası üretilen mRNAların çok kısa sürede yıkıma uğraması sonucu olabilir. Ayrıca, translasyon basamağının mRNA seviyesinden bağımsız olarak farklı mekanizmalarla protein üretimi kontrol etmesi de enzim/protein seviyelerindeki değişikliği açıklayabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Spinal kord yaralanmalarında birincil yaralanmayı önlemek imkânsız olduğundan tedavi stratejileri sekonder hasarın önlenmesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Araştırmamızda SKH'nın geç döneminde bu hasarın, Dex, Mel veya Mel+Dex birlikte tedavisiyle ne ölçüde önlenebileceği ve klinik anlamda ne kadar fayda sağlayabileceği incelendi. Omurilik de dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi, yüksek lipid içeriği ve aktif oksijen metabolizması nedeniyle serbest radikal aracılı hasara karşı oldukça hassastır. ROT ve oksidatif stresin, SKH patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğu ve hayvan modellerinde SKH'nın altında yatan ikincil hasarın bir özelliği olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, ikincil yaralanma sürecinin oksidatif stresini hafifletmek, SKH'nın terapötik müdahalesi için etkili bir stratejiyi temsil edebilir. Bu bağlamda, ROT temizleme kapasitesine sahip biyoaktif bileşikler üzerinde devam eden çalışmalar, insan deneklerde SKH tedavisi için etkili antioksidan bazlı modalitelerin geliştirilmesine yol açabilir.

Araştırmamız sonucunda; klinik anlamda MR görüntüleme, nörolojik muayene bulguları ve histopatolojik bulguları ile biyokimyasal analiz sonuçları bütünsel olarak değerlendirildiğinde Dex ve Mel birlikte uygulanması ile doku hasarının iyileşmesinde daha etkili olabileceği kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKLAR

1. Hanci V, Kerimoğlu A, Koca K, Başkesen A, Kiliç K, Taştekin D. The biochemical effectiveness of N-acetylcysteine in experimental spinal cord injury in rats. *Turk J Trauma Emerg Surg* 2010,16(1):15-21.
2. Sahin Kavaklı H, Koca C, Alici O. Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Turk J Trauma Emerg Surg* 2011,17(1):14-8.
3. Cristante AF, Barros Filho TEP de, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clin Sao Paulo Braz* 2012,67(10):1219-24.
4. İstan GK, Erbayraktar Z, Gökmen N, Bağrıyanık A, Kıray M. Deneysel Omurilik Yaralanmasında Gabapentinin Nöroprotektif Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg* 2014, 4(4):169-84.
5. Kermani HR, Nakhaee N, Fatahian R, Najar AG. Effect of Aspirin on Spinal Cord Injury: An Experimental Study. *Iran J Med Sci* 2016, 41(3):217-22.
6. Aydın HE, Ozkara E, Ozbek Z, Vural M, Burukoglu D, Arslantas A. Histopathological Evaluation of the Effects of CAPE in Experimental Spinal Cord Injury. *Turk Neurosurg* 2016, 26(3):437-44.
7. Kim Y-H, Ha K-Y, Kim S-I. Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clin Orthop Surg* 2017, 9(1):1-9.
8. Can P, Beşalti Ö. Omurilik Hasarında Güncel Tedavi Yöntemleri. *Türkiye Klin Vet Bilim-Cerrahi - Özel Konular* 2016, 2(3):45-9.
9. Yu S, Yao S, Wen Y, Wang Y, Wang H, Xu Q. Angiogenic microspheres promote neural regeneration and motor function recovery after spinal cord injury in rats. *Sci Rep* 2016, 6:33428.
10. Zhang D, Ma G, Hou M, Zhang T, Chen L, Zhao C. The Neuroprotective Effect of Puerarin in Acute Spinal Cord Injury Rats. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2016, 39(3):1152-64.

11. Gurcan O, Gurcay AG, Kazanci A, Senturk S, Bodur E, Karaca EU. Effect of Asiatic Acid on the Treatment of Spinal Cord Injury: An Experimental Study in Rats. *Turk Neurosurg* 2017, 27(2):259-64.
12. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg* 1991, 75(1):15-26.
13. Sun L, Pan J, Peng Y, Wu Y, Li J, Liu X. Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling. *J Spinal Cord Med* 2013, 36(6):616-22.
14. Ditor DS, John SM, Roy J, Marx JC, Kittmer C, Weaver LC. Effects of polyethylene glycol and magnesium sulfate administration on clinically relevant neurological outcomes after spinal cord injury in the rat. *J Neurosci Res* 2007, 85(7):1458-67.
15. Sirin Y, Keles H, Besalti O, Vural S. Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimentally Induced Spinal Cord Trauma. *J Clin Anal Med* 2012, 3:442-7.
16. Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci* 1993, 76(9):2812-23.
17. Çelik H, Mutevelizade S, Harman F, Yılmaz G, Berkman MZ. Therapeutic effects of vitamin D₃ on motor functions following experimental spinal cord injury. *Türk Nöroloji Derg* 2015, 21(2):55-61.
18. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q, Coleman T, Kreilgaard M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100(11):6741-6.
19. Korkmaz HA, Maltepe F, Erbayraktar S, Yılmaz O, Güray M, Canda MŞ. Antinociceptive and neurotoxicologic screening of chronic intrathecal administration of ketorolac tromethamine in the rat. *Anesth Analg* 2004, 98(1):148-52.

20. Varejão AS, Meek MF, Ferreira AJ, Patrício JA, Cabrita AM. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods* 2001, 108(1):1-9.
21. Hou Q-X, Yu L, Tian S-Q, Jiang C-J, Yang W-J, Wang Z-J. Neuroprotective effects of atomoxetine against traumatic spinal cord injury in rats. *Iran J Basic Med Sci* 2016, 19(3):272-80.
22. Sencer A, Aydoseli A, Aras Y, Akçakaya MO, Gömleksiz C, Can H. Effects of combined and individual use of N-methyl-D aspartate receptor antagonist magnesium sulphate and caspase-9 inhibitor z-LEDH-fmk in experimental spinal cord injury. *Turk J Trauma Emerg Surg* 2013, 19(4):313-9.
23. Kerimoğlu A, Paşaoğlu O, Kanbak G, Hanci V, Ozdemir F, Atasoy MA. Efficiency of coenzyme Q(10) at experimental spinal cord injury. *Turk J Trauma Emerg Surg* 2007, 13(2):85-93.
24. Tortora, Derrickson: Principles of Anatomy and Physiology, 13th Edition. <https://bcs.wiley.com/hebcs/Books%20?action=index&bcsId=6205&itemId=0470565101> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.
25. Kahle werner. *Color Atlas And Textbook Of Human Anatomy*. Stuttgart, 1986.
26. Spinal Cord Sectional Anatomy In Detail. <https://www.anatomynote.com/human-anatomy/vertebrae-anatomy/spinal-cord-sectional-anatomy-in-detail-2/> Son Erişim Tarihi 07 Kasım 2021.
27. Önyay T, İnal KS, Özbakır BD. Spinal Nöroanatomi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics* 2016, 2(3):1-5.
28. Dursun N. *Veteriner Anatomi III. Medisan yayınevi*, Türkiye, 2000, 47. Baskı, sayfa 15-23.
29. KÖNİĞ, VETERİNER ANATOMİ (Evcil Memeli Hayvanlar -Metin ve Renkli Atlas-) (2. Türkçe Baskı). <https://www.medipres.com.tr/konig-veteriner-anatomi-evcil-memeli-hayvanlar-metin-ve-renkli-atlas-2-turkce-baski-pmu52> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.

30. Sobotta J, Putz R, Pabst R, Putz R. *Atlas of human anatomy: Sobotta*. München: Urban & Fischer, 2006.
31. Amato ACM, Stolf NAG. Anatomia da circulação medular. *J Vasc Bras* 2015;14(3):248-52.
32. Cramer GD, Darby SA, Cramer GD. *Clinical anatomy of the spine, spinal cord, and ANS*. St. Louis: Elsevier Health Sciences; 2014. <http://site.ebrary.com/id/10723514> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.
33. Taoka Y, Okajima K. Spinal cord injury in the rat. *Prog Neurobiol* 1998, 56(3):341-58.
34. Venkatochalam M. Robbins. *Pathologic Basis of Disease*, 6th edition. Philadelphia: WB. Saunders Company, 2010.
35. McIntosh TK, Juhler M, Wieloch T. Novel pharmacologic strategies in the treatment of experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1998, 15(10):731-69.
36. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature* 1999, 399(6738 Suppl):A7-14.
37. McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet Lond Engl* 2002, 359(9304):417-25.
38. Aki T, Toya S. Experimental study on changes of the spinal-evoked potential and circulatory dynamics following spinal cord compression and decompression. *Spine* 1984, 9(8):800-9.
39. Agrawal SK, Fehlings MG. Role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1997, 17(3):1055-63.
40. Anderson DK, Hall ED. Pathophysiology of spinal cord trauma. *Ann Emerg Med* 1993, 22(6):987-92.

41. Faden AI, Jacobs TP, Holaday JW. Comparison of early and late naloxone treatment in experimental spinal injury. *Neurology* 1982, 32(6):677-81.
42. Wagner FC, Stewart WB. Effect of trauma dose on spinal cord edema. *J Neurosurg* 1981, 54(6):802-6.
43. Dietrich WD, Chatzipanteli K, Vitarbo E, Wada K, Kinoshita K. The role of inflammatory processes in the pathophysiology and treatment of brain and spinal cord trauma. *Acta Neurochir Suppl* 2004, 89:69-74.
44. Anderson DK, Means ED, Waters TR, Spears CJ. Spinal cord energy metabolism following compression trauma to the feline spinal cord. *J Neurosurg* 1980, 53(3):375-80.
45. Casha S, Yu WR, Fehlings MG. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience* 2001, 103(1):203-18.
46. de Rivero Vaccari JP, Marcillo A, Nonner D, Dietrich WD, Keane RW. Neuroprotective effects of bone morphogenetic protein 7 (BMP7) treatment after spinal cord injury. *Neurosci Lett* 2009, 465(3):226-9.
47. Blight A. Mechanical factors in experimental spinal cord injury. *J Am Paraplegia Soc* 1988, 11(2):26-34.
48. Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Dis* 2004, 15(3):415-36.
49. Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 2008, 453(7194):544-7.
50. Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, Doty K, Dossett L. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. *Exp Neurol* 1998, 151(1):77-88.
51. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol Zurich Switz* 1995, 5(4):407-13.

52. Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC. Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 2002, 137:37-47.
53. Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg* 1998, 89(6):911-20.
54. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med* 1999, 5(8):943-6.
55. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J Off J North Am Spine Soc* 2004, 4(4):451-64.
56. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999, 15:269-90.
57. Ferreira PMP, Santos AG, Tininis AG, Costa PM, Cavalheiro AJ, Bolzani VS. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. *Chem Biol Interact* 2010, 188(3):497-504.
58. Atlas of plant and animal histology. Apoptosis, <https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/ampliaciones/8-apoptosis.php> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.
59. Crowe MJ, Bresnahan JC, Shuman SL, Masters JN, Beattie MS. Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 1997, 3(1):73-6.
60. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1997, 17(14):5395-406.
61. Shuman SL, Bresnahan JC, Beattie MS. Apoptosis of microglia and oligodendrocytes after spinal cord contusion in rats. *J Neurosci Res* 1997, 50(5):798-808.
62. McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 1998, 4(3):291-7.

63. Koopmans GC, Deumens R, Buss A, Geoghegan L, Myint AM, Honig WHH. Acute rolipram/thalidomide treatment improves tissue sparing and locomotion after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 2009, 216(2):490-8.
64. Farooque M, Hillered L, Holtz A, Olsson Y. Changes of extracellular levels of amino acids after graded compression trauma to the spinal cord: an experimental study in the rat using microdialysis. *J Neurotrauma* 1996, 13(9):537-48.
65. Liu D, Thangnipon W, McAdoo DJ. Excitatory amino acids rise to toxic levels upon impact injury to the rat spinal cord. *Brain Res* 1991, 547(2):344-8.
66. McAdoo DJ, Xu GY, Robak G, Hughes MG. Changes in amino acid concentrations over time and space around an impact injury and their diffusion through the rat spinal cord. *Exp Neurol* 1999, 159(2):538-44.
67. Weil ZM, Norman GJ, DeVries AC, Nelson RJ. The injured nervous system: a Darwinian perspective. *Prog Neurobiol* 2008, 86(1):48-59.
68. Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 1996, 19(8):339-45.
69. Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol* 1996, 6(5):667-72.
70. Sakamoto A, Ohnishi ST, Ohnishi T, Ogawa R. Relationship between free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res* 1991, 554(1-2):186-92.
71. Kurihara M. Role of monoamines in experimental spinal cord injury in rats. Relationship between Na⁺-K⁺-ATPase and lipid peroxidation. *J Neurosurg* 1985, 62(5):743-9.
72. Free Radical Damage and its Control, Volume 28 - 1st Edition. <https://www.elsevier.com/books/free-radical-damage-and-its-control/rice-evans/978-0-444-89716-9> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.

73. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001, 53(1):135-59.
74. Badhiwala JH, Ahuja CS, Fehlings MG. Time is spine: a review of translational advances in spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2018, 30(1):1-18.
75. Ahuja CS, Wilson JR, Nori S, Kotter MRN, Druschel C, Curt A. Traumatic spinal cord injury. *Nat Rev Dis Primer* 2017, 3:17018.
76. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993, 75(4):641-52.
77. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004, 101(3):227-57.
78. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000, 6(5):513-9.
79. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000, 102(1):33-42.
80. Criollo A, Galluzzi L, Maiuri MC, Tasdemir E, Lavandro S, Kroemer G. Mitochondrial control of cell death induced by hyperosmotic stress. *Apoptosis Int J Program Cell Death* 2007, 12(1):3-18.
81. Solary E, Droin N, Bettaieb A, Corcos L, Dimanche-Boitrel MT, Garrido C. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia* 2000, 14(10):1833-49.
82. Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu Z-G, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ* 2005, 12(5):473-81.

83. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004, 119(7):941-53.
84. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002, 2(8):594-604.
85. Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2007, 9(1):49-89.
86. Antar V. Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan QVD-OPH'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. TEAH Beyin ve sinir Cerrahisi Kliniği, Doktora tezi, İstanbul: Sağlık Bakanlığı, 2005.
87. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997, 53(3):478-90.
88. Role of caspases in neuronal apoptosis - Ventimiglia - 2001 - Drug Development Research - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ddr.1155> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.
89. Ma H, Shieh K, Chen G. Apoptosis. *Nature and Science* 2005, 3(2):1-4
90. Nicotera P. Molecular switches deciding the death of injured neurons. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2003, 74(1):4-9.
91. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003, 348(14):1365-75.
92. Sainz RM, Mayo JC, Rodriguez C, Tan DX, Lopez-Burillo S, Reiter RJ. Melatonin and cell death: differential actions on apoptosis in normal and cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60(7):1407-26.
93. Han Y, Zhang S, Wang X, Wu J. Inhibition of mitochondria responsible for the anti-apoptotic effects of melatonin during ischemia-reperfusion. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006, 7(2):142-7.

94. Matsushita K, Wu Y, Qiu J, Lang-Lazdunski L, Hirt L, Waeber C. Fas receptor and neuronal cell death after spinal cord ischemia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2000, 20(18):6879-87.
95. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001, 60(5):422-9.
96. Glutathione: Systemic protectant against oxidative and free radical damage. https://www.researchgate.net/publication/279550514_Glutathione_Systemic_protectant_against_oxidative_and_free_radical_damage Son Erişim Tarihi 07 Kasım 2021.
97. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003, 57(3):145-55.
98. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005, 16(10):577-86.
99. Ulusal Tez Merkezi. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=w3kFisS9EfSGj3K6GNfYSQ&no=YDtQcRBzWIBAPWE48194Tg> Son Erişim Tarihi 07 Kasım 2021.
100. Aktaş M, De U, Ercan SK, Tamer L. Redükte Glutatyon Ölçümünde HPLC ve Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2005, 3(3): 95-9.
101. Wang J, Wang K, Wang Y, Lin S, Zhao P, Jones G. A novel application of pulsed electric field (PEF) processing for improving glutathione (GSH) antioxidant activity. *Food Chem* 2014, 161:361-6.
102. Lucas JH, Wheeler DG, Guan Z, Suntres Z, Stokes BT. Effect of glutathione augmentation on lipid peroxidation after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2002, 19(6):763-75.
103. Onat T, Emerk K, Sözmen EY. *İnsan biyokimyası*. Palme Yayın, 2002: 666.

104. Cobanoglu U, Demir H, Cebi A, Sayir F, Alp HH, Akan Z, Gur T, Bakan E. Lipid peroxidation, DNA damage and coenzyme Q10 in lung cancer patients--markers for risk assessment? *Asian Pac J Cancer Prev* 2011, 12(6):1399-403.
105. Oxidative stress in viral hepatitis and AIDS - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014480004000413> Son Erişim Tarihi 07 Kasım 2021.
106. Hodgson PD, Aich P, Stookey J, Popowych Y, Potter A, Babiuk L. Stress significantly increases mortality following a secondary bacterial respiratory infection. *Vet Res* 2012, 43(1):21.
107. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S. Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed Res Int* 2014, 2014:761264.
108. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986, 548:87-99.
109. Sutcuoglu O, Deric MK, Pasaoglu OT, Dumludag B, Helvacı O, Ogut B. Is it possible to prevent contrast-induced nephropathy with dexpanthenol? *Int Urol Nephrol* 2019, 51(8):1387-94.
110. Sari İ, Bakir S, Çelik VK, Erşan S, Anakli D. Grafen Oksitin Ksantin Oksidaz Aktivitesi Üzerine İn Vitro Etkisinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Derg* 2017, 21(2):401-7.
111. Koçoğullari CU, Becit N, Erkut B, Keleş MS, Ceviz M, Ates A. Prevention of reperfusion injury of the spinal cord in aortic surgery: an experimental study. *Surg Today* 2008, 38(3):237-44.
112. Kale A, Gün EG, Gül Ş, Kalayci M. Yetişkinde Nörojenik Kladykasyo ile Tanısı Konulan Bir Diastematomyeli Olgusu. *Türk Nöroşir Derg* 2016, 26(1):93-6.
113. Rosety-Rodriguez M, Camacho A, Rosety I, Fornieles G, Rosety MA, Diaz AJ. Low-grade systemic inflammation and leptin levels were improved by arm cranking exercise in adults with chronic spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2014, 95(2):297-302.

114. McCord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 1968, 243(21):5753-60.
115. Granger DN, Rutili G, McCord JM. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology* 1981, 81(1):22-9.
116. Mendez C, Garcia I, Maier RV. Oxidants augment endotoxin-induced activation of alveolar macrophages. *Shock Augusta Ga* 1996, 6(3):157-63.
117. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978, 201(4359):875-80.
118. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(3):337-49.
119. Grabitz K, Freye E, Prior R, Kolvenbach R, Sandmann W. The role of superoxide dismutase (SOD) in preventing postischemic spinal cord injury. *Adv Exp Med Biol* 1990, 264:13-6.
120. Figure 1: Pathway of antioxidant defense system and oxidative stress. https://www.researchgate.net/figure/Pathway-of-antioxidant-defense-system-and-oxidative-stress-mechanisms-Superoxide_fig4_307955116 Son Erişim Tarihi 21 Kasım 2021.
121. Vriend C, Rajmakers P, Veltman DJ, van Dijk KD, van der Werf YD, Foncke EMJ. Depressive symptoms in Parkinson's disease are related to reduced [123I]FP-CIT binding in the caudate nucleus. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014, 85(2):159-64.
122. Nikmehr B, Bazrafkan M, Hassanzadeh G, Shahverdi A, Sadighi Gilani MA, Kiani S. The Correlation of Gene Expression of Inflammasome Indicators and Impaired Fertility in Rat Model of Spinal Cord Injury: A Time Course Study. *Urol J* 2017, 14(6):5057-63.
123. Tehli O, Temiz N, Ozer M, Secer H, Gonul E, Pusat S. The Investigation of Neuroprotective Effects of Aminoguanidin and N-Acetylcysteinadministration

- alone and combination in Spinal Cord Trauma model. *Gulhane Med J* 2015, 57(2):91-7.
124. Engelman A, Cherepanov P. Retroviral Integrase Structure and DNA Recombination Mechanism. *Microbiol Spectr* 2014, 2(6):1-22.
125. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009, 1(6):a001651.
126. Chen L-F, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5(5):392-401.
127. Lee Y-S, Cho D-C, Kim CH, Han I, Gil EY, Kim K-T. Effect of curcumin on the inflammatory reaction and functional recovery after spinal cord injury in a hyperglycemic rat model. *Spine J Off J North Am Spine Soc* 2019, 19(12):2025-39.
128. Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu W-H, Frydel B, Bramwell A, Karmally S. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med* 2005, 202(1):145-56.
129. Brambilla R, Hurtado A, Persaud T, Esham K, Pearse DD, Oudega M. Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. *J Neurochem* 2009, 110(2):765-78.
130. Gupta SC, Kim JH, Prasad S, Aggarwal BB. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals. *Cancer Metastasis Rev* 2010, 29(3):405-34.
131. Ekinci Ö, Memiş L. Kiçük hücreli dışı akciğer karsinomlarında nükleer faktör kappa B İmmünohistokimyasal ekspresyonunun prognozla ilişkisi. *Gazi Med J* 2008, 19(1):1-5.
132. Baldwin AS. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996, 14:649-83.

133. 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(5):1007-12.
134. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 1998, 18(13):4914-28.
135. Harma MI, Harma M, Dilsiz N. Western blot determination of caspase-3 apoptotic activity in complete hydatidiform mole and persistent trophoblastic disease. *J Turk Ger Gynecol Assoc* 2005, 6:226-8.
136. Kim S-H, Lee S-M. Cytoprotective effects of melatonin against necrosis and apoptosis induced by ischemia/reperfusion injury in rat liver. *J Pineal Res* 2008, 44(2):165-71.
137. Gül S, Celik SE, Kalayci M, Taşyürekli M, Cokar N, Bilge T. Dose-dependent neuroprotective effects of melatonin on experimental spinal cord injury in rats. *Surg Neurol* 2005, 64(4):355-61.
138. H Parlakpınar, M Koç, A Acet, The Effects of Apoptosis and Melatonin Levels on Aging, *T. Klin. J. Med. Sci* 2004, 24:1 62-7.
139. A Çam, MF Erdoğan. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası* 2003, 56:2 103-12.
140. Tetik Ö, Gürbüz A. Spinal Cord Protection. *TGKDÇD* 2000, 8:2:587-92.
141. Choi S-I, Joo S-S, Yoo Y-M. Melatonin prevents nitric oxide-induced apoptosis by increasing the interaction between 14-3-3beta and p-Bad in SK-N-MC cells. *J Pineal Res* 2008, 44(1):95-100.
142. Meki A-RMA, Esmail EE-DF, Hussein AA, Hassanein HM. Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. *Toxicol Off J Int Soc Toxinology* 2004, 43(1):93-100.

143. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004, 36(1):1-9.
144. Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz RM, Mayo JC, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sci* 2004, 75(7):765-90.
145. Le Prell CG, Hughes LF, Miller JM. Free radical scavengers vitamins A, C, and E plus magnesium reduce noise trauma. *Free Radic Biol Med* 2007, 42(9):1454-63.
146. Kunduzova OR, Escourrou G, Seguelas M-H, Delagrangé P, De La Farge F, Cambon C. Prevention of apoptotic and necrotic cell death, caspase-3 activation, and renal dysfunction by melatonin after ischemia/reperfusion. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2003, 17(8):872-4.
147. Onur R, Semerciöz A, Orhan I, Yekeler H. The effects of melatonin and the antioxidant defence system on apoptosis regulator proteins (Bax and Bcl-2) in experimentally induced varicocele. *Urol Res* 2004, 32(3):204-8.
148. Beşkonaklı ÖSP. Pineal Gland and Aging. *Turk J Geriatr* . 01 Aralık 1997, 1(1). <https://geriatri.dergisi.org/abstract.php?lang=en&id=102> Son Erişim Tarihi 24 Ekm 2021.
149. Olakowska E, Marcol W, Kotulska K, Lewin-Kowalik J. The role of melatonin in the neurodegenerative diseases. *Bratisl Lek Listy* 2005, 106(4-5):171-4.
150. Duan Q, Wang Z, Lu T, Chen J, Wang X. Comparison of 6-hydroxymelatonin or melatonin in protecting neurons against ischemia/reperfusion-mediated injury. *J Pineal Res* 2006, 41(4):351-7.
151. Dobsak P, Siegelova J, Eicher JC, Jancik J, Svacinova H, Vasku. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. *Pathophysiol Off J Int Soc Pathophysiol* 2003, 9(3):179-87.
152. Kim HS, Jeong SY, Lee JH, Kim BE, Kim JW, Jeong SW. Induction of apoptosis in human leukemia cells by 3-deazaadenosine is mediated by caspase-3-like activity. *Exp Mol Med* 2000, 32(4):197-203.

153. Orrenius S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol Lett* 2004, 149(1-3):19-23.
154. Esteban-Zubero E, López-Pingarrón L, Alatorre-Jiménez MA, Ochoa-Moneo P, Buisac-Ramón C, Rivas-Jiménez M. Melatonin's role as a co-adjutant treatment in colonic diseases: A review. *Life Sci* 2017, 170:72-81.
155. Therapeutic potential of melatonin related to its role as an autophagy regulator: A review - Boga - 2019 - Journal of Pineal Research - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jpi.12534> Son Erişim Tarihi 19 Kasım 2021.
156. Li J, Liu L, Zhou X, Lu X, Liu X, Li G. Melatonin Attenuates Sepsis-Induced Acute Lung Injury Through Improvement of Epithelial Sodium Channel-Mediated Alveolar Fluid Clearance Via Activation of SIRT1/SGK1/Nedd4-2 Signaling Pathway. *Front Pharmacol* 2020, 11:590652.
157. Guerrero HY, Gauer F, Schuster C, Pévet P, Masson-Pévet M. Melatonin regulates the mRNA expression of the mt(1) melatonin receptor in the rat Pars tuberalis. *Neuroendocrinology* 2000, 71(3):163-9.
158. Bi J, Shen J, Chen C, Li Z, Tan H, Sun P. Role of melatonin in the dynamics of acute spinal cord injury in rats. *J Cell Mol Med* 2021, 25(6):2909-17.
159. Liu J-B, Tang T-S, Yang H-L, Xiao D-S. Antioxidation of melatonin against spinal cord injury in rats. *Chin Med J (Engl)* 2004, 117(4):571-5.
160. Samantaray S, Sribnick EA, Das A, Knaryan VH, Matzelle DD, Yallapragada AV. Melatonin attenuates calpain upregulation, axonal damage and neuronal death in spinal cord injury in rats. *J Pineal Res* 2008, 44(4):348-57.
161. Canpolat H. Postoperatif Boğaz Ağrısına Benzidamin Hidroklorür ve Dekspantenolün Etkisi. Tıp Fakültesi, Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2006.

162. Xu H, Rösler TW, Carlsson T, de Andrade A, Bruch J, Höllerhage M. Memory deficits correlate with tau and spine pathology in P301S MAPT transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014, 40(7):833-43.
163. Favero G, Franceschetti L, Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Melatonin as an Anti-Inflammatory Agent Modulating Inflammation Activation. *Int J Endocrinol* 2017, 2017:1835195.
164. Loren P, Sánchez R, Arias M-E, Felmer R, Risopatrón J, Cheuquemán C. Melatonin Scavenger Properties against Oxidative and Nitrosative Stress: Impact on Gamete Handling and In Vitro Embryo Production in Humans and Other Mammals. *Int J Mol Sci* 2017, 18(6):1119.
165. Yang L, Yao M, Lan Y, Mo W, Sun Y-L, Wang J. Melatonin for Spinal Cord Injury in Animal Models: A Systematic Review and Network Meta-Analysis. *J Neurotrauma* 2016, 33(3):290-300.
166. Solakhan M. İntersitisyel Sistit Hayvan Modelinde, İntravezikal Dekspantenol Tedavisinin Lipid Peroksidasyonu ve Mesane Histolojisi Üzerine Etkileri. Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi, 2008.
167. Sachs M, Asskali F, Lanaras C, Förster H, Bockhorn H. The metabolism of panthenol in patients with postoperative intestinal atony. *Z Ernährungswiss* 1990, 29(4):270-83.
168. Ebner F, Heller A, Rippke F, Tausch I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. *Am J Clin Dermatol* 2002, 3(6):427-33.
169. Biro K, Thaçi D, Ochsendorf FR, Kaufmann R, Boehncke W-H. Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis* 2003, 49(2):80-4.
170. Kayaalp SO. *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Yayıncılık, 2009.

171. Barton-Wright EC, Elliott WA. The pantothenic acid metabolism of rheumatoid arthritis. *Lancet Lond Engl* 1963, 2(7313):862-3.
172. Aprahamian M, Dentinger A, Stock-Damgé C, Kouassi JC, Grenier JF. Effects of supplemental pantothenic acid on wound healing: experimental study in rabbit. *Am J Clin Nutr* 1985, 41(3):578-89.
173. Studies on wound healing: effects of calcium D-pantothenate on the migration, proliferation and protein synthesis of human dermal fibroblasts in culture - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10218148/> Son Erişim Tarihi 24 Ekim 2021.
174. Slyshenkov VS, Dymkowska D, Wojtczak L. Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. *FEBS Lett* 2004, 569(1-3):169-72.
175. Slyshenkov VS, Omelyanchik SN, Moiseenok AG, Trebukhina RV, Wojtczak L. Pantothenol protects rats against some deleterious effects of gamma radiation. *Free Radic Biol Med* 1998, 24(6):894-9.
176. Slyshenkov VS, Piwocka K, Sikora E, Wojtczak L. Pantothenic acid protects jurkat cells against ultraviolet light-induced apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2001, 30(11):1303-10.
177. Zakaria MMH, Hajipour B, Khodadadi A, Afshari F. Ameliorating effects of dexpanthenol in cerebral ischaemia reperfusion induced injury in rat brain. *JPMA J Pak Med Assoc* 2011, 61(9):889-92.
178. Yardimci I, Karakan T, Resorlu B, Doluoglu OG, Ozcan S, Aydın A. The effect of intraurethral dexpanthenol on healing and fibrosis in rats with experimentally induced urethral trauma. *Urology* 2015, 85(1):274.e9-13.
179. Ermis H, Parlakpınar H, Gulbas G, Vardi N, Polat A, Cetin A. Protective effect of dexpanthenol on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2013, 386(12):1103-10.

180. Korkmaz MF, Parlakpınar H, Erdem MN, Ceylan MF, Ediz L, Samdancı E. The therapeutic efficacy of dexpanthenol on sciatic nerve injury in a rat model. *Br J Neurosurg* 2020, 34(4):397-401.
181. Mihara M, Uchiyama M, Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. *Biochem Med* 1980, 23(3):302-11.
182. Sun Y, Elwell JH, Oberley LW. A simultaneous visualization of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase on polyacrylamide gels. *Free Radic Res Commun* 1988, 5(2):67-75.
185. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS Lett* 1975, 59(2):245-9.
184. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976, 72:248-54.
185. Agrawal SK, Nashmi R, Fehlings MG. Role of L- and N-type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury. *Neuroscience* 2000, 99(1):179-88.
186. Keleş I. Spinal Kord Yaralanmalarında Epidemiyolojik Bilgiler, Seyir ve Nihai Sonuçlar. *Türkiye Klin Fiz Tıp Rehabil Derg* 2001, 1(2):58-66.
187. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992, 72(1):65-83.
188. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 2005, 25(19):4694-705.
189. Enzmann G, Benton R, Talbott J, Cao Q, Whittemore S. Functional Considerations of Stem Cell Transplantation Therapy for Spinal Cord Repair. *J Neurotrauma* 2006, 23:479-95.

190. Pfeifer K, Vroemen M, Caioni M, Aigner L, Bogdahn U, Weidner N. Autologous adult rodent neural progenitor cell transplantation represents a feasible strategy to promote structural repair in the chronically injured spinal cord. *Regen Med* 2006, 1(2):255-66.
191. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the repair of central nervous system injury | Bone Marrow Transplantation. <https://www.nature.com/articles/1705757> Son Erişim Tarihi 28 Kasım 2021.
192. Barnabé-Heider F, Frisé J. Stem cells for spinal cord repair. *Cell Stem Cell* 2008, 3(1):16-24.
193. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res* 2015, 1619:1-11.
194. Experimental Observations of Concussion and Contusion of the Spinal Cord. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1802525/> Son Erişim Tarihi 25 Kasım 2021.
195. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990, 137:1-53.
196. U. Kızıltepe, N.N. Turan, Ü. Han, T. Ulus, F. Akar, Spinal Cord Protection With Resveratrol: Neurological and Histopathological Findings, *Turkish J Vasc Surg* 2003, 12(2):17-23.
197. Galano A, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin: A Versatile Protector against Oxidative DNA Damage. *Mol Basel Switz* 2018, 23(3):E530.
198. Orr MB, Gensel JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurother J Am Soc Exp Neurother* 2018, 15(3):541-53.
199. Leskovar A, Moriarty LJ, Turek JJ, Schoenlein IA, Borgens RB. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol* 2000, 203(12):1783-95.

200. Vriend J, Reiter RJ. Melatonin as a proteasome inhibitor. Is there any clinical evidence? *Life Sci* 2014, 115(1-2):8-14.
201. Wojtczak L, Slyshenkov VS. Protection by pantothenic acid against apoptosis and cell damage by oxygen free radicals--the role of glutathione. *BioFactors Oxf Engl* 2003, 17(1-4):61-73.
202. Umansky V, Rocha M, Breitzkreutz R, Hehner S, Bucur M, Erbe N. Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Cell Biochem* 2000, 78:578-87.
203. Leman Sencar. Deneysel spinal kord yaralanmasında tümör nekroz faktör alfa ve interlökin-6 ekspresyonuna minosiklin ve metilprednizolon kombine tedavisinin etkileri. Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri. Doktora tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2013.
204. Engelmann C, Weih F, Haenold R. Role of nuclear factor kappa B in central nervous system regeneration. *Neural Regen Res* 2014, 9(7):707-11.
205. Slyshenkov VS, Rakowska M, Moiseenok AG, Wojtczak L. Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich ascites tumor cells against lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1995, 19(6):767-72.
206. Baydas G, Reiter RJ, Akbulut M, Tuzcu M, Tamer S. Melatonin inhibits neural apoptosis induced by homocysteine in hippocampus of rats via inhibition of cytochrome c translocation and caspase-3 activation and by regulating pro- and anti-apoptotic protein levels. *Neuroscience* 2005, 135(3):879-86.
207. Kostić DA, Dimitrijević DS, Stojanović GS, Palić IR, Đorđević AS, Ickovski JD. Xanthine Oxidase: Isolation, Assays of Activity, and Inhibition. *J Chem* 2015, 2015:e294858.
208. Turgut B, Demir T, Celiker Ü. Oftalmolojide Apoptoz. *Firat Tıp Derg* 2006, 11(1):6-11.

209. Kavaklı A, Acet A, Parlakpınar H, Akpolat N, Şahna A. Ratlarda beyin İskemi-reperfüzyonu sonucu oluşan morfolojik değişikliklere melatonin ve pinealektominin etkisi. *FÜ Sağ Bil Derg* 2007, 21(2):63-6.
210. Allen KR. Studies on the Biology of the Early Stages of the Salmon (*Salmo salar*). *J Anim Ecol* 1941, 10(1):47-76.
211. Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. *Exp Neurol* 1985, 88(1):123-34.
212. Erten SF, Kocak A, Ozdemir I, Aydemir S, Colak A, Reeder BS. Protective effect of melatonin on experimental spinal cord ischemia. *Spinal Cord* 2003, 41(10):533-8.
213. Kanter M, Coskun O, Kalayci M, Buyukbas S, Cagavi F. Neuroprotective effects of *Nigella sativa* on experimental spinal cord injury in rats. *Hum Exp Toxicol* 2006, 25(3):127-33.
214. Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S. Neuroprotective Effects of Ebselen on Experimental Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res* 2005, 30(3):403-10.
215. Eroğlu A, Topuz AK, Şimşek H, Dinç C, Demirel D, İpçioğlu O. Bir antiepileptik ajan olan topiramatin nöroprotektif etkilerinin deneysel spinal kord travma modelinde incelenmesi. *Turk J Phys Med Rehab* 2016, 62(4):355-64.
216. Ersahin M, Toklu HZ, Cetinel S, Yüksel M, Yeğen BC, Sener G. Melatonin reduces experimental subarachnoid hemorrhage-induced oxidative brain damage and neurological symptoms. *J Pineal Res* 2009, 46(3):324-32.
217. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Basis Dis* 2012, 1822(5):675-84.
218. Jia Z, Zhu H, Li J, Wang X, Misra H, Li Y. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord* 2012, 50(4):264-74.

219. Guemeun L, Artur Y, Herbeth B, Je C, Cuny G, Siest G. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood. *Clin Chem* 1991, 37/11: 1932-37 e.
220. Etensel B, Ozkisacik S, Ozkara E, Karul A, Oztan O, Yazici M. Dexpanthenol attenuates lipid peroxidation and testicular damage at experimental ischemia and reperfusion injury. *Pediatr Surg Int* 2007, 23(2):177-81.
221. Yildirim S, Tok H, Köksal H, Erdem L, Baykan A. Allopurinol plus pentoxifilline in hepatic ischaemia/reperfusion injury. *Asian J Surg* 2002, 25(2):149-53.
222. Karapinar OS, Pinar N, Özcan O, Doğan EA, Bayraktar S, Şahin H. The effect of dexpanthenol on experimentally induced ovarian ischaemia/reperfusion injury: a biochemical and histopathological evaluation. *Arch Gynecol Obstet* 2017, 295(3):777-84.
223. Saeed SA, Shad KF, Saleem T, Javed F, Khan MU. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. *Exp Brain Res* 2007, 182(1):1-10.
224. Slyshenkov VS, Moiseenok AG, Wojtczak L. Noxious effects of oxygen reactive species on energy-coupling processes in Ehrlich ascites tumor mitochondria and the protection by pantothenic acid. *Free Radic Biol Med* 1996, 20(6):793-800.
225. Topsakal C, Kilic N, Ozveren F, Akdemir I, Kaplan M, Tiftikci M, vd. Effects of Prostaglandin E1, Melatonin, and Oxytetracycline on Lipid Peroxidation, Antioxidant Defense System, Paraoxonase (PON1) Activities, and Homocysteine Levels in an Animal Model of Spinal Cord Injury. *Spine* 2003, 28(15):1643-52.
226. Korkmaz A, Oyar EO, Kardeş O, Omeroğlu S. Effects of melatonin on ischemic spinal cord injury caused by aortic cross clamping in rabbits. *Curr Neurovasc Res* 2008, 5(1):46-51.
227. Morsy MD, Bashir SO, Al-Agamy DF, Diao HA. Protective Effect of Combined Melatonin and α -Tocopherol Administration in Spinal Cord Ischemia-Reperfusion Injury in Rat. *Int J Morphol* 2019, 37(2):428-37.

228. Pike BR, Flint J, Dave JR, Lu X-CM, Wang KKK, Tortella FC. Accumulation of calpain and caspase-3 proteolytic fragments of brain-derived alphaII-spectrin in cerebral spinal fluid after middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2004, 24(1):98-106.
229. Mehier-Humbert S, Guy RH. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2005, 57(5):733-53.
230. Genovese T, Mazzon E, Muià C, Bramanti P, De Sarro A, Cuzzocrea S. Attenuation in the evolution of experimental spinal cord trauma by treatment with melatonin. *J Pineal Res* 2005, 38(3):198-208.
231. Fan B, Wei Z, Yao X, Shi G, Cheng X, Zhou X. Microenvironment imbalance of spinal cord injury. *Cell Transplant* 2018, 27(6):853-66.
232. Jing Y, Bai F, Chen H, Dong H. Melatonin prevents blood vessel loss and neurological impairment induced by spinal cord injury in rats. *J Spinal Cord Med* 2017, 40(2):222-9.
233. Zhang Y, Zhang W-X, Zhang Y-J, Liu Y-D, Liu Z-J, Wu Q-C. Melatonin for the treatment of spinal cord injury. *Neural Regen Res* 2018, 13(10):1685-92.
234. Chuah MKL, Collen D, VandenDriessche T. Biosafety of adenoviral vectors. *Curr Gene Ther* 2003, 3(6):527-43.
235. Heise R, Skazik C, Marquardt Y, Czaja K, Sebastian K, Kurschat P. Dexpanthenol modulates gene expression in skin wound healing in vivo. *Skin Pharmacol Physiol* 2012, 25(5):241-8.
236. Nicholson KE, Rogers JE. Cocaine and adrenaline paste: a fatal combination? *BMJ* 1995, 311(6999):250-1.
237. Williamson P, Slack R. Dangers of cocaine and adrenaline paste. Accurate measurement of dose and patience are important. *BMJ* 1995, 311(7012):1089.

238. Ellingson BM, Kurpad SN, Schmit BD. Ex vivo diffusion tensor imaging and quantitative tractography of the rat spinal cord during long-term recovery from moderate spinal contusion. *J Magn Reson Imaging* 2008, 28(5):1068-79.
239. Ellingson BM, Kurpad SN, Li S-J, Schmit BD. In vivo diffusion tensor imaging of the rat spinal cord at 9.4T. *J Magn Reson Imaging* 2008, 27(3):634-42.
240. Cigremis Y, Akgoz M, Ozen H, Karaman M, Kart A, Gecer M, Atalan G. Resveratrol ameliorates cisplatin-induced oxidative injury in New Zealand rabbits. *Can J Physiol Pharmacol* 2014, 93(8): 727-735.
241. Jayaraj R, Anand T, Rao PV. Activity and gene expression profile of certain antioxidant enzymes to microcystin-LR induced oxidative stress in mice. *Toxicology* 2006, 220 (2-3):136-46

EKLER

EK 3. Oxidase (XO)

AGAGCTCAGTACTCCAGCAGCCACGATGACTGCGGATGAGTTGGTCTTCTTTGTGAATGGCAAAAAGGT
GGTGAGAAAAATGCGGACCCGAAACAACACTTCTGGTCTACCTGAGAAGAAAGTTGGGGCTATGTGGG
ACCAAGCTTGGCTGTGGAGAAGGTGGCTGTGGGGCATGCACCGTGATGATCTCCAAGTATGACCGTCTTC
AGAACAAGATTGTTTCATTTTTCTGTCAATGCCTGCTTGGCTCCCATCTGCTCCTTGACCATGTTGCTGT
GACCACCGTGGAAAGGCATAGGAAACACCCAGAAGTGCATCCTGTACAGGAGAGAATTGCCAGAAGCCAT
GGTCCCAGTGTGGTCTGCACCTCCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
AGCCTACTGTTGAGGAGATCGAGAATGCCTTCCAGGAAACCTCTGTGCTGTACAGGCTACAGACCCAT
CCTCCAGGGATTCCGGACCTTTGCCAAGGATGGTGGGTGCTGTGGAGGGAGTGGAAACAACCCAACTGC
TGATGAACCAGACGAAAGACCAACGGTTTTCTCTCACCTTCTTATTCAACCCAGAGGATTTCAAAC
CTTTAGATCCCACGCAAGAGCCCATCTTCCCCCAGAGTTGCTGAGGCTGAAAGACTCCCCAGAAGAA
GCTGCGTTTTGAAGGGGAACGTGTGACCTGGATCCAGGCTTCAACTATGGAGGAGCTGCTTGACCTGAAA
GCTCAGCACCTGATGCCAAGCTGGTGGTGGGAAACACAGAGATAGGCATTGAAATGAAATTTAAGAATA
TGCTATTTCTCTGATCGTCTGCCAGCCTGGATCCCTGAACGTAAATTCAGTGGTGCATGGGCCGTGAGG
AATCTCCTTCGGAGCTTCTTGCCCCCTTAGCTTGGTGGAAAGTGTCTGGCGGAGGAGATTGCTAACTT
CCAGAGCAAAGACAGAGGTGTTAGAGGCGTGTGAGCAGCTGCGCTGGTTTTGCCGCAAGCAGGTCA
AGTCCGTGGCGTCCATCGGAGGGAACATCATCACTGCCAGCCCCATCTCTGACCTCAACCTGTGTTCAT
GGCCAGTGGAGCCAAGCTGACTCTGGTGTCTAGAGGTACCAGGAGAAGTGTTCGGATGGATCATACTTCT
TTCCCTGGCTACAGAAAGACTCTGCTCAGACCAGAGGAGATATGCTGTCCATCGAGATCCCCTATAGCA
AGGAGGAGAGTTTTTCTCAGCTTCAAGCAGGCTCCAGGAGGGAAGATGACATTGCCAAGGTACTAG
TGGCATGAGAGTCTGTTCAAACCGGGGACCATTGAAAGTGCAGGAAGTGTCCCTTTGCTTCGGAGGATG
GCCGACAGAATCTCAGCCCTCAAGACCCTCCGAAGCAGCTATCGAAGTCCGGAATGAGGAGCTGC
TGAGAGCGTGTGTGCCGGCTTGGCAGAGGAGCTGCACCTGGCCCCGATGCCCTGGTGGTATGGTGA
ATTCGGCGCACCTCACCTCAGCTTCTTCTTCAAGTCTACCTGACAGTGCTCCAGAAGCTGGGCGA
GCGGACCTTGAGGATATGTGTGGTAAACTGGACCCACCTTTGCCAGTGCCACCTGCTCTTTCAGAAGG
ACCTCCAGCTAATGTCCAGCTTTTCCAAGAGGTGCCAAGGATCAGTCTGAGGAGGACATGGTGGGCCG
GCCCTGCCTCACCTGGCGGCAACATGCAGGCATCGGGAGAGGCGCTGTACTGTGATGACATTTCCCGC
TATGAGAATGAGCTCTCTCAGGCTGGTCACCAGCACCCGGGCGCATGCTAAAAACACGTCCATCGACA
CTTCAGAAGCCAAGAAGGTGCCAGGGTTGTTTGTCTCCTCACCGCAGAGGATGTCCCTAATAGTAATGC
AACCGGCCTTTTTCAATGATGAAACTGTCTTTGCGAAGGATGAGGTTACTTGTGTGGGCACATCATTGGT
GCTGTGGTTCGCTGACACCCAGAACACGCACAGAGAGCTGCGAGAGGGGTGAAAAACACCTATGAAGATC
TTCCAGCATTTATCACAATCCAGGATGCTATAAACAACAACCTCTTTTATGGCTCTGAGATAAAAAATTGA
GAAAGGAGATCTCAAGAAAGGCTTTTCAAGAGCTGACAATGTTGTCTCAGGAGAGTTGTATATCGGTGGC
CAGGAGACTTCTACCTGGAGACCACTGCACCAATGCGCGTGCACAAAAGGCGAGGAGGCGAGATGGAGC
TGTTCTGTGAGCACACAGAACACCATGAAAACCCAGAGCTTTGTTGCAAAAATGTTGGGCGTTCCGGACAA
CAGAATCGTAGTCCGAGTGAAGAGGATGGGTGGAGCTTTGGAGGGAAGGAGACCCGGAGCACTGTGGTG
TCCACAGCAGTGGCTTGGCTGCACACAAGACTGGCCGGCCGTACGTTGCATGTTGGACCGAGATGAGG
ACATGCTGATAACTGGTGGCAGACATCCCTTCTCGCTAAATACAAGGTTGGCTTTCATGAAGACTGGGAC
TGATGTTGCTCAGAGGTGGCTCACTTCAAGCAATGGTGGTAACACTGAGGATCTCTCTCGGAGTATAATG
GAACGAGCTTTGTTCCACATGGATAACGCCTATAAGATCCCAACATTCGAGGCACTGGGAGGATTTGCA
AGACTAATCTGCCCTCCAACACAGCCTTCAAGAGTTTTGGGGTCTCAGGGGATGCTAATCGCAGAATA
CTGGATGAGCGAGGTGCCATAACCTGTGGCTGCCTGCAGAGGAGGTACGGAGGAAAAACATGTACAAA
GAAGGGGACCTGACTCACTTCAACCAGAAGCTGGAGGGGTTACCTTGCCAGGTGCTGGGATGAATGCA
TCGCCAGCTCTCAGTATCTTGCTCGCAAGAGGGAAGTGGAGAAATCAACAGGGAGAATTGTTGGAAAAA
GAGAGGGCTGTGATAATCCCAACTAAGTTTGGAAATAAGCTTTACACTTCTTTTCTGAACCAGGGAGGC
GCTCTGGTTCCAGTGTACACTGATGGTTCGGTGTGTTGACCCATGGAGGGACTGAGATGGGCCAAGGCC
TTCACACCAAGATGGTTCAGGTGGCCAGCAGAGCTGTAAGTCCCAACCTCCAAGATTATATAAGTGA
GACAAGCACTAACACCGTCCCCAACACTTCTCCACAGCTGCCTCTGCCAGTGTGACCTCAATGGACAG
GCTGTTTATGAAGCATGCCAGACCATACTGAAAAGGCTGGAACCTTTCAAGAAGAAGAAACCCAACGGCC
CCTGGGAGGCATGGGTGATGGACGCTATACGAGCGCAGTGAGTTGTCCGCGACTGGATTTTATAAGAC
ACCCAACCTTGGCTACAGCTTTGAGACAAACTCCGAAATCCCTTCCACTATTTTCAAGTATGGGGTGGCT
TGCTCTGAAGTAGAAATTGACTGCTTAAACAGGGGATCATAAGAATCTCCGTACGGATATCGTCATGGATG
TTGGTTCCAGCTTGAATCTGCCATTGATATTGGACAAGTAGAGGGGCAATTTGTCCAGGGCCTTGGTCT
CTTCACTATGGAGGAGCTGCACTACTCCCTGAGGGGAGCCTGCATACTCGTGGCCCCAGTACCTACAAA
ATCCCTGCGTTTTGGTAGCATCCCCATTGAGTTCAGAGTATCCCTACTCCGGGACTGCCCCAACAGAGGG
CCATCTATGCATCAAGGCTGTTGGGGAGCCACCTTTTTCTGGCTTCTCTATCTCTTTGCCATCAA
AGATGCCATTCGTGCAGCTCGAGCTCAGCAGGAGATAACGCAAAACAACCTTTTCCAGCTAGACAGCCCT
GCCACTCCGGAGAAGATCCGAAACGCCTGTGTGGACCAGTTCCACCAGCCTGTGTGTCAGTGGAGTACCAG
AAAACGTGAAATCCTGGTCTGTGAGGATCTGAAGAGAGGTTCCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
ATTCCTTGGAGCCACAAGCACATCTGTAGTATCCAGATTTCCGATGCCCGCTGGGACTCAGCAGGATG
ACATTTTCAAGAAGATGGACAATTTTGTATCCAAATAAGAGCTGCAAAACAACCAATAAGCAATGGGGAG
Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu: 77bp

EK 4. *Rattus norvegicus* Superoxide Dismutase (SOD)

CGGGCGGACGCCGAGAGCAGACGCGCGGCTGCTAGCGAACGGCCGTGTTCTGAGGAGAGCAGCGGTTCGT
GGGCGCCTCAGCAATGTTGTGTGTCGGGCGGGCGTGCAGCGCGGGCAGAAGACTGGGCCCCGCGCCAGTACC
GCGGGCTCCCGGCACAAGCACAGCCTCCCTGACCTGCCTTACGACTATGGCGCGCTGGAGCCGCACATTA
ACGCGCAGATCATGCAGCTGCACCACAGCAAGCACCACGCGACCTACGTGAACAATCTGAACGTCACCGA
GGAGAAGTACCACGAGGCGCTGGCCAAGGGAGATGTTACAACCTCAGGTTGCTCTTCAGCCTGCACTGAAG
TTCAATGGCGGGGGCCATATCAATCACAGCATTTTCTGGACAAACCTGAGCCCTAAGGGTGGTGGAGAAC
CCAAGGAGAGTTGCTGGAGGCTATCAAGCGTGACTTTGGGTCTTTTGAGAAGTTTAAGGAGAAACTGAC
AGCTGTGTCTGTGGGAGTCCAAGGTTCAAGGCTGGGGCTGGCTTGGCTTCAATAAGGAGCAAGGTCGCTTA
CAGATTGCCGCCTGCTCTAATCAGGACCCACTGCAAGGAACCACAGGCCTTATTCCACTGCTGGGGATTG
ATGTGTGGGAGCAGCTTACTATCTTCAGTATAAAAAAGTCAGACCTGACTATCTGAAAGCCATTTGGAA
TGTAATCAACTGGGAGAATGTTAGCCAAAGATACATAGTTTGAAGAAGTGAAGCCCTCCGCCAGGCTG
TGTGTGAGGCCCGTGGTGGGTGTTTTGTAGTAGTGTAGAGCATTGCAGCACTGTGGCTGAGCTGTTGTAA
TCTTCATTGATGCCTATCCACATATGTGTAAGCATAACAGTTATGATAATTTCTTAATTAATGATTGTT
AGGCAACTGTTTGGAGAACAGTACATACTTGGTGTGAGCTGCTCTTGATTGAACATTTTCATTAGAGGCTT
GAATTGCTTGGACGCTGTCACTGTATCATAAGGCCATCAAAGATATTCCATCTCTGTGTTGGGGCCTGT
GGGGAGGCTGTAATCCTGTTCTACTGCAGTTAGGAAAAAAAAATGAGTTACCCCCCCCCCAGAATTGTTG
AATAATAAAATAGAGAAGTGAATAGTTCTCTTTTCTGTTAAAAAATTGCTATTTTTCATAAGTAATCCTTT
GTTTAGCGGATATCACCTAGTGGTCTTTATTTATGGCCACAGTTTTCATAGAAACATCATTTTTTCACTTG
AAACGTGTAAGTGGCTAAGGATGGATGGAGTGGTAGAGCCTTTGCCTGTCTTATGTGAGGCCCTGGGCT
CTACCTCACTACTGAACAAATCAACAGACCCAAGCTAGGCTCCTGACTGACAACCTGTTAATTCGGAGAGG
AGTGACATTGTGCCTCTGGGTTTTTTTTATAGGCTGAGATGCAAAAAGTGTACCTTGTCTATTAACACCG
ACTGTGTATTGTATGAAAGTGCTCAAGATGGACAAAGTATGCAGGGCCTGTCCCATGATGTCAACATGGG
GACTAGGCCACAGGGCATTCAAGGAAGCCATTCAAGCACCATTAATTGTGTATCTCAGGAGAACTGGACCC
TGGGTGAGGTGGCACCTTTTTTCAGTAGAGGCAAACGGGTTTCTGAGTGAGGTGAGTAGGGTGTCTTGAGA
ACATCAGTTTTTCAGAGACATGTATTTTCATTTTTTCTGCAGTCTCAAGAAGTATACTCACAAGAGGGCC
TTTGTATTGTTATTCAATAGAAGGACACCCTTTCCCTGACAAGGTACACAGTGTCTGATTGTATTCCCT
GTGCAGCATTGGGTGTAGAGCTGTGCAGTGTGAAATGCCTTTGTGAATTTGCCTTTTCACATTTTCGTC
TCACCATCTTCCTTGTCTTTTACTGACTATGTAATGTTTTATCAGTTGGATATTACTGAATAGTTTGT
TTGTGTTTAATTGCCTTTTATTACCAAAAAGGCTGTGGTCAGCAACCCAGGCATGCACATTACTTCTTA
ATGGAGTATTTTTTAAAGGTTTATTTTAATTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu:146bp

EK 5. Rattus norvegicus Nuclear Factor Kappa B (NF-κB)

GGCTGCGCGCTGACGGCTTCCCGTGCCCTGCGCGCCCCGGCCTGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCTCGG
CCTGCTCGCGGGCCGGCTCCAGCAGCGCAGGCCGGAGCTCAGGGCCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCCGG
CTTCTCCGCCCGCGCCGCGAGCCATGGCGCGCCGCTGAGCCGCCGGCCGGCGCCAGGACCTTACTCGGGCT
CCCCCGGTCCACGCTGCCCGCAGCGGGAGCCCGCAGGCGCGGAAAGGCCGCGCCTCACCTCCAGGGTA
CCCTCAGAGGCCAGAAGAGGGTGTGGCCCCCTGTAACCTGGAGCTTGACCGTCTGTGAGCTGCCCCATCTT
CAACATGGCAGACGACGATCCTTTCCGAACTGGGCAAATGTTTCATTTGAATACTGCTTTGACTCACTCC
ATATTTAATGCAGAATTATATTCAACAGATATACCACTGTCAACAGATGGCCCATACTTCAAATACTAG
AGCAACCGAAACAGAGAGGATTTTCGATTCCGCTACGTGTGCGAAGGCCCGTCCCACGGAGGGCTTCCCGG
TGCTCCAGTGAGAAGAACAAGAAATCTTACCCGCAAGTCAAATTTGCAACTATGTGGGGCCTGCAAAG
GTTATCGTTCAGTTGGTTCACAAATGGAAAAAATATTACCTGCACGCCCCACAGCCTGGTGGGCAAGCAT
GTGAGGACGGCATATGCACCGTGACAGCAGGACCCCAAGGACATGGTGGTTGGCTTTGCAAACCTGGGAAT
ACTTCACGTGACTAAGAAAAAGGTATTCGAAACACTGGAAGCACGGATGACAGAGGCGTGTATAAGGGGC
TATAACCCTGGACTTCTGGTGCATTCTGACCTTGCTTATCTACAGGCAGAAGGCCGAGGAGACCGGCAAC
TCACAGACAGAGAGAAGGAGATCATCCGCCAGGCAGCTCTGCAGCAGACCAAGGAGATGGACCTGAGTGT
GGTGCGCCTCATGTTACAGCCTTCCCTCCCCGACAGCAGGGCAGCTTCACTCGGAGACTGGAACCTGTG
GTGTCAGACGCCATCTATGACAGCAAAGCCCCAACGCGTCCAACCTGAAGATCGTAAGAATGGACAGAA
CAGCAGGCTGCGTGACGGGAGGGGAAGAAATCTATCTTCTGTGACAAGGTCCAGAAAGATGACATCCA
GATTCGGTTTTATGAAGAGGAAGAAATGGTGGAGTTTGGGAAGGATTTGGGGACTTTTCCCCACGGAT
GTTACAGACAGTTTGCATTGTCTTCAAACACCCGAAGTATAAGGATGTCAACATTACAAAGCCAGCTT
CCGTGTTTGTTCAGCTTCGGAGAAAATCGGATTTGGAACTAGTGAACCGAAACCTTTCTCTACTACCC
CGAAATCAAAGACAAGGAGGAAGTACAGAGGAAACGCCAGAAGCTCATGCCAACTTCTCCGACAGTTTC
GGCGCGGCAGTGGAGCGGGAGCGGGTGGCGGAGGCATGTTCCGGTAGTGGCGGTGGCGGTGGAGGGAGTA
CCGGAAGTCTGGCCCAGGGTATGGCTTCCCGCACTATGGATTTCCCTGCTTACGGTGGGATTGCATTCCA
TCCCGGAGCCACTAAATCCAACACAGGCATCACCCATGGCACCATAAACACCAAATTTAAAAACGAGCCT
AGAGATTGTCCAAGAGTGACGACAGGGAGATTCTGAATCCCCCTGAGAAAGAAACACAAGGTGAGGGGC
CCAGCCTGTTTATGGCCAGCACCAAGACCGAAGCAATTGCCCGGCATCCACCATGGAAGACAAGGAAGA
GGATGTGGGGTTTTCAGGATAACCTCTTTCTTGAAGGCGCTGCAGCTCGCCAAGCGGCATGCCAACGCC
CTTTCGACTACCGGTTACGGGAGATGTGAAGATGCTGCTGGCGGTACAGCCCATCTCACCGCGGTGC
AGGATGAGAAGCGGGGACAGTGTCTTACACTTAGCCATCATCCACCTTCATGCTCAGCTCGTGAGGGATCT
GCTAGAAGTGACATCTGGTTCGATCTCTGATGACATCATCAACATGAGAAACGATCTGTATCAGACACCT
TTGCACCTGGCCGTGATCACCAAGCAGGAAGATGTGGTGGAGGACTTGCTGAGGGTTGGGGCTGACCTGA
GTCTTCTGGACCGCTGGGGCAACTCTGTCTGCACCTAGCTGCCAAAGAAGGACATGATAAAATCCTCGG
GGTCTACTCAAGAACAGCAAGGCAGCACTCCTTATCAACCACCCCAACGGGAAGGTCTGAATGCCATT
CACATAGCTGTGATGAGCAACAGCCTGTCTGTCTGCAGCTGCTTGTGGCTGCTGGGGCAGAAGTCAACG
CTCAGGAGCAGAAGTCTGGGCGCACGGCACTGCACCTGGCCGTGGAGTACGACAACATCTCGTTGGCCGG
CTGCCCTGCTCCTGGAGGGTGACGCCCTCGTGGACAGCACCACCTACGATGGGACGACACCTCTACACATA
GCAGCTGGAAGAGGGTCCACCAGGCTGGCAGCTCTTCTCAAAGCAGCAGGAGCAGACCCCTGGTGGAGA
ACTTTGAGCCTCTCTATGACCTGGACGACTCTTGGGAGAAGGCTGGAGAAGATGAGGGAGTAGTGCCAGG
CACCACACCCCTGGACATGGCTGCCAACTGGCAGGATTTGACATACTAAATGGGAAACCATATGAGCCA
GTGTTACATCTGATGACATACTCCCAAGGGGACATTAAGCAGCTGACAGAAGACACGAGGCTGCAAC
TCTGCAAGCTCTTGGAAATTCCTGATCCCACAAAGAACTGGGCCACTCTGGCGCAGAAGTTAGGTCTGGG
GATATTGAACAATGCCTTCCGGCTGAGTCCCGCCCTTCTAAAACCTTATGGACAACATGAGGTCTCT
GGGGGGACCATCAAAGAGCTGGTGGAGGCCCTGCGACAGATGGGCTACACAGAGGCCATTGAAGTGATCC
AGGCAGCCTTCCGCACCCCGGAAACCACAGCCTCCAGCCCCGTGACCACTGCTCAGGCCCACTTGCTGCC
TCTCTGCTCCTCCACAAGACAGCACATAGATGAGCTCCGAGATAATGACAGCGTGTGTGACAGTGGT
GTGGAGACATCCTTCCGCAAACTCAGCTTCTCGGAGTCCCTCACTGGAGATGGCCCACTGCTATCTCTGA
ACAAAATGCCTCACAATTATGGGCAGGATGGACCTATAGAAGGCAAAATTTAGCCTGCTGGCGGTTCCCC
ACACTGTAAACCAAAGCCCTGAAAGGCCATCATATCGTTCGGAAGGAGAAGGCAAAAAACGCATCCCAAG
GTGCTGGAAGGTCACCGCCTGCAGGGTCAATCTTGATGTCATTTCGAGGCCTTCCGAATTTGGCTTCCCTT
TCTTGGCTCTGAAATGAAATTTAGTTGTTCATATACAGATGGTGTCTAGCAATCACGGCTGCACTCGGTGT
GGCTTGGGGTATGGTGGCTTGGCTTTTCCAGCTGCTATTGGATTACACTTGTCTTGTGTTGTCACTGCT
GTCCCTCTGCTGGGTCCCCGCTGTCATTAAGGTATCGCAGTCCCCACCTGGTGTCTTTCTAGCCATCTA
CAGTACAGTCATGCACTCAAATTAAGATTAAGGAAAAAGATATTTTAAAGTGAGTAACCTCATGCGCAAT
AAAAAAAAGACATGGCTTTTTCTAATGTGGTTTATCTGTGATTTAAAAAAAAGACATGAACTTAAC
AATATTTAAACCTGCTATAATCAGTGCTGAAAATAGTATTTTCCCCCTTTTCTGCATTTTACTATTGTA
AATATGTTTTCTAAATCAAATACTTTAAAAGAAGAAATGTTGGATTTATAAATGCTATTTTTTATTTTAC
TTTTATAATAAAAGTACAAGCACACTGTTGACCTCA

Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu:200bp

EK 6. *Rattus norvegicus* Caspase 3 (Casp3)

GGGGGCGGGCGTGGGCGGGCGTGGGCGGGACCGGCGGTAGGCTGCTGATGCAGTGTTGGTGTGGTGG
GATCAAAGCTTAGTGTCTGAGGTGCGGAGCTTGGAAACGGTACGCGAAGAAAAGTGACCATGGACAACAA
CGAAACCTCCGTGGATTCAAATCCATTAATAATTTTGAACAAAGACTATCCATGGAAGCAAGTCGATG
GACTCTGGAATATATCTGGACAGCAGTTACAAAATGGATTACCCTGAAATGGGCTTGTGTATAATAATTA
ATAATAAGAACTTCCATAAAAGCACTGGAATGTGAGCTCGCAATGGTACCGATGTGATGCAGCTAACCT
CAGAGAGACATTCATGGCCCTGAAATACGAAGTCAGGAATAAAAATGACCTTACTCGTGAAGAAAATTATG
GAATTGATGGATAGTGTCTTAAGGAAGATCACAGCAAAGGAGCAGTTTTGTGTGTGTGATTCTAAGTC
ATGGAGATGAAGGAGTAATTTTGGAAACGAACGGACCTGTGGACCTGAAAAACTAAGTTTCTTCAG
AGGCGACTACTGCCGGAGTCTGACTGGAAAGCCGAAACTCTTCATCATTTCAGGCCTGCCGAGGTACAGAG
CTGGACTCCGGTATTGAGACAGACAGTGGAACTGACGATGATATGGCATGCCAGAAGATACCAGTGGAGG
CCGACTTCCGTATGCTTACTCTACCGCACCCGGTTACTATTCTGGAGAAATTCAGGGACGGGTACATG
GTTTCATCCAGTCACTTTGCGCCATGCTGAAACTGTACGCGCACAAGCTGGAATTCATGCACATCCTCACT
CGTGTAAACCGGAAGGTGGCCACGGAATTTGAGTCCTTCTCCCTGGACGCCACTTTCATGCAAAGAAAC
AGATCCCCTGTATTGTGTCAATGCTCACAAAAGAAGTGTACTTTTTATCACTAAAGGAATGACTGGGAGTG
GGGTAGGGGCATGTTTCTGTTTTGGTTTTTTTTTTTTGGTTTTTGTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTATTTGA
ATGCCAAATGAGAAAAGTGTGAGGAGACTTTTTTTTTCCCTCTCATTTAAATCAAATCCGATGTTCCA
GGTCGTCAATGAACAATACCACTGCCTGCAATGCAGCCACAATACAATACCTCAGCTTTGATATCAGGTA
GTTGAAATGAAATTTAATTAGGAACAAATAAATGTCAATAATGGTACAACCATCATAGAAGAAATGGAA
AGTCACACTTTGGTAATTAGAGAGATTTGGTGCCACTATGAATTTGAAATTACGAAGCAGTGATGATCTT
ATACCCCTCCTCACATCTAGAATGTCATTTAGTTTTCGTTAAGCATAGGAACGATAATGTCAAGTGGT
ATGTCTTAGAAGTTGAATCCACGAGCAGAGTCAAAGGCTGGTTTTGGAAGTGTGTTGGAAGTGAAGAG
TTGGAGCACTGTAGCACACATTATAGCTACTGGTTTTGTGACAGTTGACCAGGTCACATATTTATTTATTT
AAGACAAAAGTCGTGTTTTATTATTGGAACAAAATAACTTTATATGAGAGGAAAACCATGTGTGAACTT
GGTTGGCTTGTGGAAGGCTACCATCCTCAGTGGTGGACATGACGACAGGGTGCTACGATCCACCAGCAT
TTGTTTCTTACTTATCTTATGCAAATCAGCCTAATTTTACAGACCAGCAAAATATCTAAAGAGCGATTA
TGCAGCAGCCTCAAATGTTGACTATTAGAATGGAATAAAGGAATCTACAGGAACAGACCATAATACCA
GCTGTCAGTCAGAGCGTAAGGAAAGGAGAGGTGGCATCTCCTGTGATTGGAGAGAAGATGGTTTGAGCCG
GAGCAGAGCCATGGGCACGTCTTCAGAAAAGGCCTGCTAGTTGGACCCACCTTGTGAGCACTGGTCTGTG
TGGATGATGTCCAAGTTACCACATGAGACTGAACCAGATCAGAAGCTCCTGCAAAAAGGCTTTCCAGAG
TGCTGAGCATCTCAAGAAAGTTCACTGGACTCCATGTACAGAGTCTGTAGCATGCTGACTTTTTCTGTTGA
AGTTTACAATGAAAGGAAAATGATGGTGATATTTGTACCGTCACTAGAAATGAAGGGCCCTGGCACACGG
GACTTGGAAAGCATCCAGCAATAGGCCCTGCAGCCCATGTGGAGGAGCTGCAGACTGGAGTCCACCCCTC
CTCCCCATCAGGGCGTCTGTGCTCCAGGCTTCTTAATCATGGAGGTGCTGAGTCATCGCTGGCTCTCCC
TGTGGGTCCAGCATTTCCATAAGCCTCCTTATTGCACAAAAGGAAGGAAGGAACTCACATTATAACTGAT
AGTAGGTTCTTGTTTAGACTGGATTTACTGTTAACTCTTTTCTAAGTAAATACAGCATGTGGTGGTATTT
TAAAATGTGTTCCCATGTGACAATTTTATAAAAGTCAGATATCTTGCATTTTTTATTTCAAACATAAATT
CAGATTTAAATTA

Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu:163bp

EK 7. *Rattus norvegicus* Actin Beta (Actb)

GTCGAGTCCGCGTCCACCCGCGAGTACAACCTTCTTGAGCTCCTCCGTCGCCGGTCCACACCCGCCACC
AGTTCCGCCATGGATGACGATATCGCTGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCGGCTT
CGCGGGCGACGATGCTCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGCCGCCCTAGGCACCAGGGTGTGATG
GTGGGTATGGGTCAGAAGGACTCCTACGTGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTGACCCTGA
AGTACGCATTGAACACGGCATTGTCACCAACTGGGACGATATGGAGAAGATTTGGCACCACACTTTCTA
CAATGAGCTGCGTGTGGCCCCTGAGGAGCACCTGTGCTGCTCACCGAGGCCCTCTGAACCTAAGGCC
AACCGTGAAAAGATGACCCAGATCATGTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTAGCCATCCAGG
CTGTGTTGTCCCTGTATGCCTCTGGTCGTACCACTGGCATTGTGATGGACTCCGGAGACGGGGTCACCCA
CACTGTGCCATCTATGAGGGTTACGCGCTCCCTCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGAC
CTGACAGACTACCTCATGAAGATCCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTACCACCACAGCTGAGAGGGAAA
TCGTGCGTGACATTAAGAGAAGCTGTGCTATGTTGCCCTAGACTTCGAGCAAGAGATGGCCACTGCCGC
ATCCTCTTCCCTCCCTGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTGACGGTCAGGTCATCACTATCGGCAATGAGCGG
TTCCGATGCCCCGAGGCTCTCTTCCAGCCTTCTTCCCTGGGTATGGAATCCTGTGGCATCCATGAAACTA
CATTCAATTCCATCATGAAGTGTGACGTTGACATCCGTAAAGACCTCTATGCCAACACAGTGCTGTCTGG
TGGCACCACCATGTACCCAGGCATTGCTGACAGGATGCAGAAGGAGATTACTGCCCTGGCTCCTAGCACC
ATGAAGATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCTGTGTGGATTGGTGGCTCTATCCTGGCCT
CACTGTCCACCTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTACGATGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTGCA
CCGAAATGCTTCTAGGCGGACTGTTACTGAGCTGCGTTTTACACCCTTTCTTTGACAAAACCTAACTTG
CGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Çoğaltılan gen bölgesinin uzunluğu:178bp