



BEZMİÂLEM
VAKIF ÜNİVERSİTESİ

T.C.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASININ
PATOFİZYOLOJİSİNDE mikroRNA21'İN ROLÜ VE
METİLPREDNİZOLONE TEDAVİSİNİN PATOFİZYOLOJİYE VE
mikroRNA21'E ETKİSİ

Dr. Abdurrahim TEKİN
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Hakan SEYİTHANOĞLU
İSTANBUL
2019



TEŞEKKÜR

Nöroşirürji eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Doç. Dr. M. Namık Öztanır, Doç. Dr. M. Aziz Hatiboğlu, Prof. Dr. Saffet Tüzgen, Prof. Dr. Mehmet Erşahin, Doç. Dr. Nejat Işık, Doç. Dr. Naci Balak ve tez çalışmalarımın başlatılması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve eleştirileriyle katkı sağlayan, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. M. Hakan Seyithanoğlu'na çok teşekkür ederim.

Mesleki tecrübesiyle her zaman yanımda olan Op. Dr. Meliha Gündoğ Papaker'e; abilerim Op. Dr. Erdinç Özek, Op. Dr. Serkan Kitiş, Op. Dr. Tolga Turan Dündar, Op. Dr. Serdar Çevik, Op. Dr. Anas Abdallah, Op. Dr. Şevket Evran, Op. Dr. Fatih Çalış, Op. Dr. Enes Akkaya, Op. Dr. Mehmet Şenol, Op. Dr. Doğan Gündoğan'a ve acısıyla tatlısıyla bu zorlu eğitim sürecini omuz omuza geçirdiğimiz arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Selçuk Yapar, Arş. Gör. Dr. Engin Can, Arş. Gör. Dr. Güven Gönen ve Arş. Gör. Dr. Sadık Tokar'a çok teşekkür ederim.

Hastanemizin diğer bölümlerinde olan ve zor günlerde birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma; servis ve ameliyathanede birlikte çalıştığım tüm hemşire, sekreter ve personel arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Hepsinden öte beni şefkatle yetiştirip bu günlere gelmemde büyük emeği olan, sevgilerini her daim yanımda hissettiğim aileme, bu zorlu süreçte desteğini hep yanında hissettiğim eşim Ayça Tekin'e çok teşekkür ederim.

ÖZET

Tekin, A. Deneysel spinal kord yaralanmasının patofizyolojisinde mikroRNA21'in rolü ve metilprednisolone tedavisinin patofizyolojiye ve mikroRNA21'e etkisi. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilimdalı Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2019

Spinal kord yaralanması artan nüfus ile birlikte özellikle gençlerde ciddi sağlık sorunu haline gelmiştir. Çalışmamızda spinal kord yaralanmasını takiben miRNA21 ekspresyonunun 1. ve 7. Günlerdeki düzeyi ayrıca metilprednisolone tedavisinin miRNA21 düzeyine etkisini incelemek amacıyla altı deney grubu (n=6) oluşturulmuştur. İlk ve dördüncü grup hariç tüm hayvan gruplarına anevrizma klip yöntemi ile spinal travma modeli uygulandı. Tedavi gruplarına (üçüncü ve altıncı grup) SKY sonrası metilprednisolone tedavisi verildi. Tedavi sonrasında ilk üç grup 1.günde son üç grup 7.günde tekrar operasyona alınmış ve real-time PZR inceleme için laminektomi sahasındaki spinal kord dokusu çıkarılmıştır. Real-Time PCR ile miRNA21 düzeyi ve astrogliosis, apoptoz ve inflamasyon parametreleri olarak GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 düzeylerine bakıldı. Sonuçta; miRNA21 düzeyinin travma sonrası giderek arttığı ve metilprednisolone tedavisinin erken dönemde miRNA21 düzeyini azalttığı görüldü. Metilprednisolone tedavisinin astrogliosis, apoptoz ve inflamasyon parametrelerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü. miRNA21'in SKY'deki rolünün kesin açıklanması için ek çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Spinal kord hasarı, miRNA21, Metilprednisolon, real-time PCR

ABSTRACT

Tekin, A. The role of microRNA21 in the pathophysiology of experimental spinal cord injury and the effect of methylprednisolone treatment on pathophysiology and microRNA21. Bezmialem Vakif University Faculty of Medicine Department of Neurosurgery Medical Speciality Thesis in Medicine, Istanbul, 2019

Spinal cord injury has become a serious health problem especially in young people with increasing population. In our study, six experimental groups (n = 6) were created in order to investigate the effect of miRNA21 expression on the 1st and 7th days after spinal cord injury and miRNA21 level of methylprednisolone treatment. Spinal trauma model was applied to all animal groups except the first and fourth groups by aneurysm clip method. Methylprednisolone was given to the treatment groups (third and sixth group) after SCI. After the treatment, the first three groups were reoperated in the first three groups on the 7th day and the spinal cord tissue in the laminectomy area was removed for real-time PCR. Levels of miRNA21 and astrogliosis, apoptosis and inflammation were measured with Real-Time PCR and GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 levels were measured. After all; It was observed that miRNA21 level increased after trauma and methylprednisolone treatment decreased miRNA21 level in early period. Methylprednisolone treatment did not have a significant effect on astrogliosis, apoptosis and inflammation parameters. Further studies are needed to clarify the role of miRNA21 in SCI.

Keywords: Spinal cord injury, miRNA21, Methylprednisolone, real-time PCR

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	3
ÖZET.....	4
ABSTRACT.....	5
İÇİNDEKİLER	6
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	8
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	9
TABLolar DİZİNİ	9
1.GİRİŞ	11
2.GENEL BİLGİLER	11
2.1.Spinal Kord Anatomisi	11
2.1.1.Spinal Kordun Zarları	13
2.1.2.Spinal Kordun Kanlanması.....	14
2.2.Spinal Kord Travmasının Patofizyolojisi	15
2.2.1.Primer Hasar	16
2.2.2.Sekonder Hasar	17
2.3.Apoptozis ve Nekroz.....	18
2.4.Spinal Kord Travmasının Histolojisi	18
3.SPİNAL KORD YARALANMALARI.....	19
3.1.Komplet (Tam) Spinal Kord Yaralanması.....	19
3.2.İnkomplet (Kısmi) Spinal Kord Yaralanması.....	19
4.SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASTA YÖNETİMİ	20
5.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TANI.....	21
6.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TEDAVİ.....	22
6.1.Spinal Kord Travmasında Cerrahi Tedavi.....	22
6.2.Spinal Kord Travmasında Rejenerasyon ve Kök Hücre Tedavisi..	23

6.3.Spinal Kord Travmasında Medikal Tedavi.....	23
6.3.1.Metilprednizolon.....	23
6.3.2.Naloksan.....	24
6.3.3.Gangliosidler.....	24
7.DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ	24
8.MikroRNA'LAR.....	24
8.1. mikroRNA yolağı.....	25
8.2. Spinal kord travmasının patofizyolojisi ve mikroRNA.....	26
8.2.1.Astroglıozis	26
8.2.2.Apopitozis.....	27
8.2.3.İnflamasyon.....	27
9.MATERYAL METHOD	28
9.1.Deney Grupları.....	29
9.2.Cerrahi İşlem ve Tedavi.....	30
9.3. Real-Time PCR Çalışmaları	31
9.3.1. RNA izolasyonu.....	31
9.3.1.1 Toplam Nükleik Asitlerin Çökeltilmesi.....	31
9.3.1.2 Kirlenici DNA'nın Toplam Nükleik Asit Preparatlarından Çıkarılması.....	31
9.3.2 cDNA dönüşümü.....	32
9.3.2.1 MikroRNA'dan Komplementer DNA Eldesi.....	32
9.3.2.2 Total RNA'dan Komplementer DNA Elde Edilmesi	33
9.3.3 Real-Time PCR.....	33
9.3.3.1 miRNA'larda Rölatif Gen İfadesi.....	33
9.3.3.2 Hedef Genin Rölatif Gen İfadesi.....	35
9.4.İstatistiksel Değerlendirme.....	36
10.BULGULAR	36
11.TARTIŞMA.....	41
12.SONUÇ	45
KAYNAKLAR	47

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ASIA	American Spinal Trauma Derneği
ATP	Adenozintrifosfat
BMP	Kemik Morfogenik Protein
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
COX	Siklooksijenaz
FASLG	Fas ligand geni
GFAP	Glial Fibriller Asidik Protein
IL	İnterlökin
KBB	Kan Beyin Bariyeri
LP	Lipid Peroksidasyonu
MP	Metilprednizolon
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
NASCIS	Ulusal Akut Spinal Kord Yaralanma Çalışmaları
PTEN	PTH fosfataz ve tensin homolog geni
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Ürünleri
SKY	Spinal Kord Yaralanması
SKT	Spinal Kord Travması
STAT3	Sinyal Transdüseri ve Aktivatörü Transkripsiyon 3
VIM	Vimentin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Spinal kord anatomisi (13)	12
Şekil 2: Spinal sinirler	13
Şekil 3: Spinal kord aksiyel kesit	13
Şekil 4: Spinal kord zarları	14
Şekil 5: Spinal kord arterleri (14)	15
Şekil 6: Primer ve Sekonder Hasar Mekanizması (20)	16
Şekil 7: Brown Sequart Sendromu (20)	19
Şekil 8: Santral Kord Sendromu	20
Şekil 9: C6 vertebra fraktürü (BT)	21
Şekil 10: Servikal fraktür MRI görüntüsü	22
Şekil 11: miRNA yolağı	25
Şekil 12: Medülla Spinalisin anevrizma klip ile kompresyonu	30

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1: Çalışma grupları
Tablo 2: miRNA'dan cDNA dönüşüm için kullanılan reaktifler ve miktarları
Tablo 0: Total RNA'dan cDNA dönüşüm için kullanılan reaktifler ve miktarları
Tablo 4: qPCR reaksiyonu için reaktifler ve miktarları
Tablo 5: RT-PCR'da kullanılan döngü parametreleri
Tablo 1: RT-PCR reaksiyon içeriği
Tablo 7: RT-PCR için uygulanan koşullar

Tablo 8: 1.gün sakrifiye edilen sıçanların miRNA21'e ait Δct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri

Tablo 9: 7.gün sakrifiye edilen sıçanların miRNA21'e ait Δct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.

Tablo 10: 1.gün sakrifiye edilen sıçanlara ait parametrelerin Δct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.

Tablo 11: 7.gün sakrifiye edilen sıçanlara ait parametrelerin Δct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.



1.GİRİŞ

Spinal kord yaralanmasında (SKY) travma sonrası oluşan nörolojik fonksiyon kaybı nedeniyle, bireyin ve ailesinin yaşam kalitesini olumsuz etkiler (1). SKY genç bireylerde daha yüksek oranda görüldüğünden iş gücü kaybı ve rehabilitasyon maliyeti nedeniyle ekonomik olarak da kayıplara sebep olmaktadır (2).

Spinal kord yaralanması sıklık sırasına göre; motorlu araç kazaları, iş kazası ve düşme, şiddet ve spor yaralanmaları sonrası görülmektedir (3).

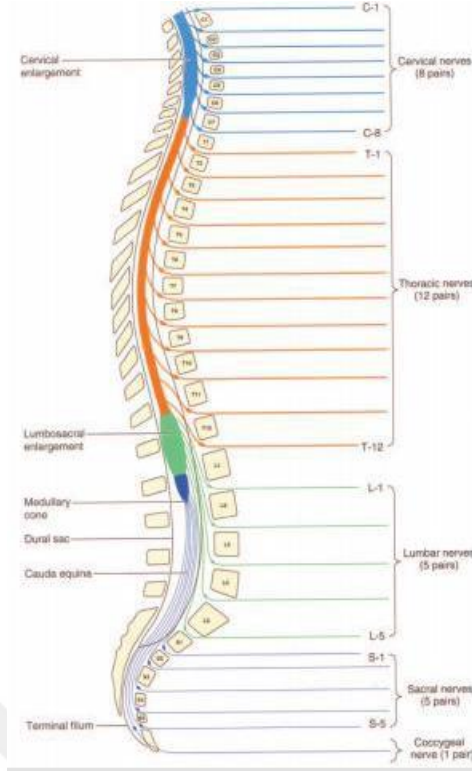
Dünyada SKY 15-45/1000000 oranında görülmektedir (4). Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda ortalama 11.000 bireyi etkiler. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılmış çalışmalar sonucu 90'lı yıllarda SKY oranı yılda 40/1.000.000 iken 2009 yılında SKY oranı yılda 87.7/1.000.000 olarak bulunmuştur (5). SKY'nin %64' ü torakolomberde görülür (6).

SKT sonrası oluşan hasar için şimdiye kadar etkili bir tedavi bulunamamıştır. Medikal tedaviden kısmen yarar tespit edilmiş ancak SKT sonrası oluşan hasar için nörolojik tam düzelme sağlanamamıştır (7). Bu çalışmadaki amacımız SKY'lerde miRNA21 düzey değişikliği, SKY'lerde miRNA21'in astrogliazis ve apoptoz ile ilişkisi ve etkinliği bilinen metilprednizolonenin (MP) miRNA 21 düzeyindeki değişiklikler saptanıp SKY ye bağlı mortalite ve morbititeyi azaltmak amaçlı miRNA'ların dahil edildiği yeni tedavi yöntemlerine katkıda bulunmaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Spinal Kord Anatomisi

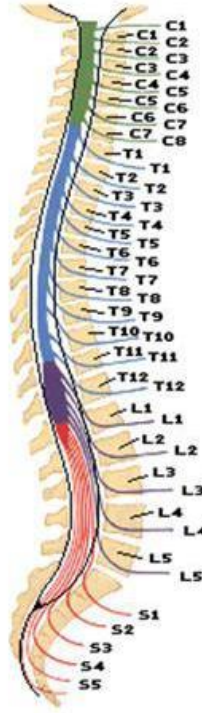
Medulla spinalis foramen magnumdan başlayıp birinci lomber vertebra alt kenarına kadar uzanır. (Şekil 1). Üzeri dura mater, araknoid mater ve pia mater olarak adlandırılan üç zar ile kaplıdır. Beyin omurilik sıvısı statium subaraknoideumda bulunur ve medulla spinalisi korur (8).



Şekil 1: Medulla spinalis anatomisi (9)

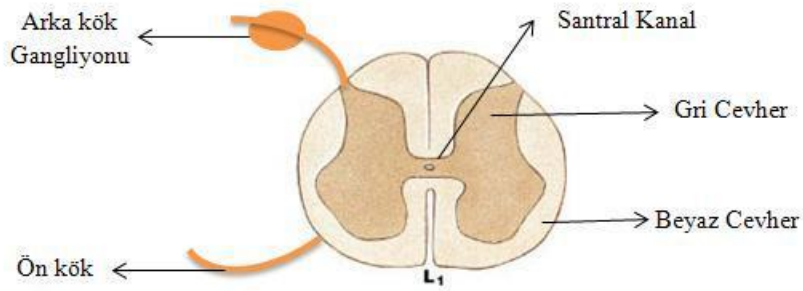
Medulla spinalis servikal intumescentia ve lumbosakral intumescentia adı verilen servikalde ve lomberde olmak üzere iki genişleme bulundurur. Medulla spinalis aşağıya doğru incelop conus medullarisini oluşturur. Coccyxin arka yüzüne yapışan Conus medullaris' in tepesindeki pia mater uzantısı aşağıya inerek filum terminaleyi oluşturur.

Medulla spinalis boyunca 31 tane spinal sinir tutunur (Şekil 2).



Şekil 2: Spinal sinirler

Medulla spinalis gri maddeden oluşmuş iç kısım olan substantia grisea ve dış tabaka olan substansia alba tarafından oluşmuştur. Sinir hücreleri ve uzantıları, nöroglia ve kan damarları substantia griseada bulunur. Miyelinli sinir liflerinin çok görüldüğü substansia alba beyaz olarak görülür (6,8) (Şekil 3).



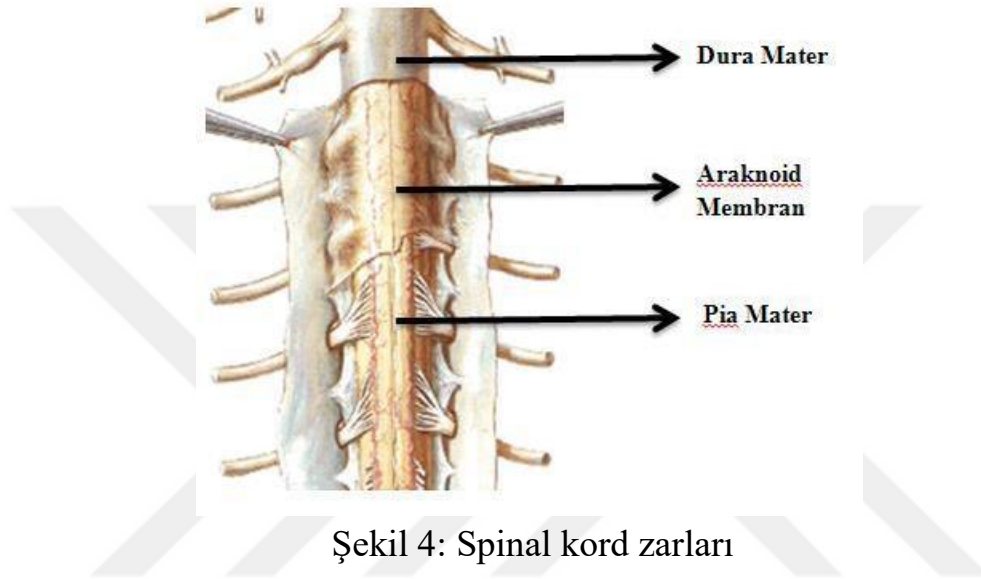
Şekil 3: Medulla spinalisin aksiyel kesiti

2.1.1. Spinal Kordun Zarları

Dura mater medulla spinalisi saran fibröz güçlü bir zardır. Foramen magnumdan başlayıp ikinci sakral omura kadar uzanıp filum terminalede biter.

Araknoid mater medulla spinalis saran pia materden BOS ile dolu spatium subaraknoideum ile ayrılan geçirgen olmayan ince bir zardır. Filum terminalede sona erer.

Pia mater sinir kökleri arasında kalınlaşıp ligamentum denticulatumu oluşturan medulla spinalis saran vasküler bir zardır. Pia mater lateralde dura mater ve araknoid matere yapışır. Bu yapışma medulla spinalisin duranın ortasında asılı kalmasına yardımcı olur (6,8) (Şekil 4).



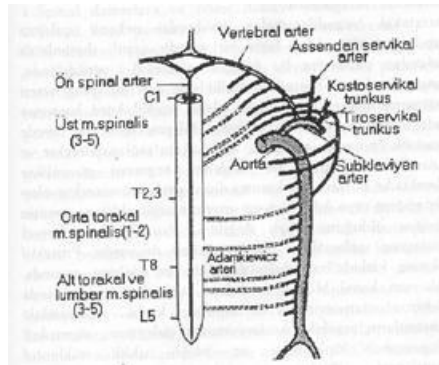
Şekil 4: Spinal kord zarları

2.1.2. Spinal Kordun Kanlanması

Medulla spinalis arteria spinalis anterior ve iki tane arteria spinalis posteriordan beslenir. Arteria inferior posterior cerebelli ya da arteria vertebralislerden çıkan posterior spinal arterler medulla spinalisin arka 1/3 ünün beslenmesinden sorumludur. Arteria vertebralislerden çıkan arterlerin birleşmesinden oluşan anterior spinal arter medulla spinalisin ön 2/3 ünün beslenmesinden sorumludur. Anterior ve posterior spinal arterler longitudinal olarak uzanır. Foramen intervertebraliste segmental arterlerle desteklenir.

Medulla spinalise daha çok sol tarafan giren alt torakal ya da üst lomber düzeydeki aortadan tek taraflı çıkan arteria radicularis anterior magna (Adamkiewicz arteri) medulla spinalisin T8 ve konus medullaris arasındaki alt 2/3 ünü besleyen önemli bir arterdir. Vasküler hasara daha yatkın olan sadece T4 ve T5 düzeyindeki radiküler arterler ile beslendiği için beslenmesi daha az olan orta torakal bölge 'watershed zone' olarak adlandırılır (6).

Medulla spinalisin venleri 6 adet kıvrımlı longitudinal kanala drene olan venlerdir. Bu venler dural sinüslere ve serebral venlere drene olur (8) .

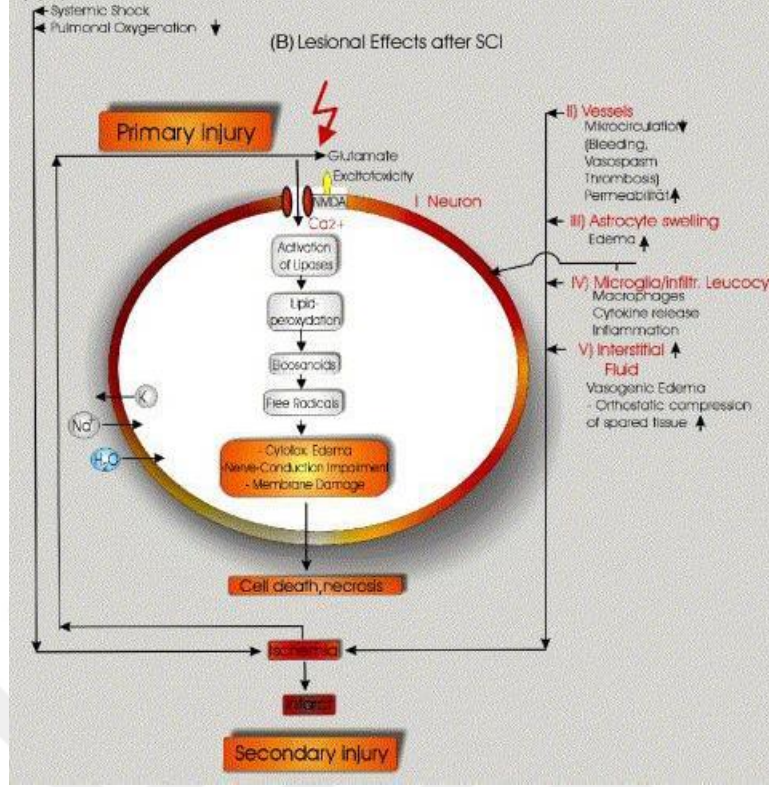


Şekil 5: Spinal kord arterleri (10)

2.2.Spinal Kord Travmasının Patofizyolojisi

İlk çalışmalarda spinal kord travmasında nörolojik defisit uzun yolaklardaki hasarlanmaya bağlı olduğu düşünülmekteydi. Daha sonra 1950’li yıllardaki çalışmalarda hasarın kan akımı azalmasının sonucu olduğu belirlenmiştir. Günümüzde ise iskeminin doku yıkımına sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır (11). Medulla spinalis hasarının fizyopatolojisinin açıklanması tedaviye katkı sağlayacaktır (2).

Medulla spinalis hasarının fizyopatolojisi direkt (primer) ve indirekt (sekonder) yaralanma olmak üzere bifazik yaralanma olarak açıklanmıştır (12). Direkt yaralanma birincil mekanik yaralanmaya bağlı oluşurken, birincil yaralanmaya sekonder gelişen nekroz ve apoptoz ise indirekt yaralanma olarak tanımlanmıştır (13). Direkt yaralanma mekanik etki sonucu oluşurken, indirekt yaralanma direkt yaralanma üzerine eklenen biyokimyasal ve hücre sel reaksiyonlar sonucu oluşur (14) (şekil 6).



Şekil 6: Primer ve Sekonder Hasar Mekanizması (15)

2.2.1. Primer Hasar

Primer hasar birincil yaralanma sonucu oluşan kemik, intervertebral disk ve kompresyonun medulla spinaliste oluşturduğu mekanik hasar olarak tanımlanır. Mekanik etki sonrası kan damarları, akson ve hücre zarları hasar görür. Travma sonrası aksonlarda yaralanma, mikroglial aktivasyon ve hemorajik nekroz görülür ve akut faz reaktanlarının salınımı meydana gelir (4).

Travma sonrası meydana gelen primer hasar aksiyel yüklenme, fleksiyon, ekstansiyon, distraksiyon ve rotasyon sonrası gelişir (4). Primer hasar sonrası medulla spinaliste meydana gelen biyokimyasal ve histopatolojik bir dizi olaylar sekonder hasar olarak tanımlanır ve bu dizi olaylar sonrası hücre ölümünün devam etmesine bu da medulla spinalisin daha çok zarar görmesine neden olmaktadır.(16,17,18). Primer hasarın tedavisi olmadığı için çalışmalar sekonder hasarı azaltmak amaçlıdır.

Yaralanmaya sebep olan kuvvetin genliği, etki süresi ve medulla spinalis tarafından absorpsiyonu primer yaralanmanın derecesini belirler (19). Medulla

spinalise basının uzun sürmesi nörolojik durumun kötüleşmesine ve kötü prognozlu olmasına sebep olur.

2.2.2.Sekonder Hasar

İlk defa Allen tarafından 1911 de tanımlanmıştır. Sekonder hasarda çok yönlü mekanizma olduğundan deneysel çalışmalarda başarı sınırlıdır ve sıklıkla prelinik çalışmada kalmıştır (7,20).

Sekonder hasar primer hasardan sonraki 2 haftadan 6 aya kadar görülür. Sekonder hasarda histopatolojik olarak; başlangıçta makrofaj infiltrasyonu, astroglial skar ve kan beyin bariyeri (KBB) tamiri, kronik süreçte ise Wallerian dejenerasyon ve plastisite meydana gelir (4,21).

Ödemli ve hasarlı bölgeye lökosit akışının artması sekonder hasarda inflamasyonda kısır döngü meydana gelir. Ayrıca iskemi sonrası artan serbest radikallerin de etkisiyle lipid peroksidasyonu gelişir. Bu da hasarı daha da şiddetlendirir (22,23).

Yapılan çalışmalarda sekonder hasar glutamat ve aspartatın fazla salınımı, hücre içinde kalsiyum birikimi, serbest oksijen radikalleri, apoptoz ya da nekroza bağlı hücre ölümü sonucu olduğu belirtilmiştir (24).

Farmakolojik ajanların (metilprednizolon, Nimodipin vs) laboratuvarında gösterdiği başarısını klinik çalışmalarda gösterilememiştir. Sekonder hasarı engellemek şimdilik deneysel olarak mümkün görünmektedir (24,25).

Santral sinir sisteminde yaygın olarak bulunan eksitatuar nörotransmitter olan glutamat sekonder hasar oluşumunda önemli rol oynar. SKT sonrası hızlı bir şekilde ortama salınır. Bu da hücre içinde depolardan Kalsiyum (Ca) salınmasına sebep olur. Kalsiyumda (Ca) artış Fosfolipaz A2 ve lipooksijenaz gibi enzimlerinde salınmasına sebep olmakta ve serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (4,21).

Yapılan son çalışmalarda SKT'deki doku hasarı sebebinin SKT sonrası apoptozun da önemli bir mekanizma olduğu belirtilmiştir. Sekonder hasarı önlemeye yönelik apoptozun inhibe edildiği çalışmalar yapılmıştır (26).

Yapılan çalışmalarda sekonder hasarı engellemek için kullanılan farmakolojik ajanların klinikte en yararlı bulunanı SKT sonrası ilk 8 saat içerisinde verilen metilprednizolon tedavisinin olduğu gösterilmiştir (1).

2.3.Apoptozis ve Nekroz

Otofaji, nekroz ve apopitoz gibi hücre ölümleri spinal kord sonrası iskemiye bağlı olarak görülür (27). Apopitoz ve nekroz olmak üzere iki tip nöron ölümü vardır. Programlanmış hücre ölümü olan apopitoz zararlı hücrelerin yok edilmesinde rol oynar (28).

Sekonder hasarda apopitoz ana mekanizma olarak rol oynar (29). Apopitoz spinal kordta hem nöronları hem de glial hücreleri hedef alır. Apopitozun oluşumunda ortama salınan glutamat, Ca ve serbest radikaller rol oynar (28).

Nekrozda morfolojik değişiklik olarak hücrede şişme, mitokondriyal genişleme ve hücre membranında yırtılma meydana gelir. Apopitozda hücre membranında yırtılma olmaz. Apopitozda hücre içi ATP gereklidir bundan dolayı hücre içi ATP düzeyi hücrenin nasıl öleceğini belirler. Apopitozda hücre kendi kendini aktif bir şekilde yok eder (4,28).

Apopitoz ve nekroz arasında morfolojik olarak ciddi fark vardır. Apopitozda membran ve organel yapısı korunurken nekrozda kromatin kümeleşmesi, nükleusta büzülme ve DNA fragmantasyonu görülür (28). Apopitoz inflamasyon başlatmadan hücreyi yok ettiğinden dolayı sinir sisteminin sürekliliği sağlamada önemli rol oynar (28).

2.4.Spinal Kord Travmasının Histolojisi

Spinal kord yaralanmasında travma sonrası patolojik olaylar başlamasına rağmen histolojik değişiklikler ilk 2 saatte net görülmeyebilir (4). Santral gri madde yumuşak ve vasküler yapıda olduğundan mekanik hasar santral gri maddeye daha fazla zarar verir. Periferde beyaz cevher daha az zarar görür. Kan akımının bozulmasına bağlı iskemi ve lokal enfarkt meydana gelir (30).

İlk başta histolojik olarak ödem, kanama, belirgin aksonal şişme ve yolakların bozulması görülür. Ödem ve kanamadan dolayı sinir iletimi bozulur. Nöral disfonksiyonun temel nedeni santral kanama alanlarıdır (4). Spinal kord hasarının 2.gününde sonra monositler ve mikroglia hasarlı bölgede çoğalmaya başlar. Santral kanal çevresinde bulunan ependimal hücrelerin hipertrofik olduğu görülür. Hasarın 3.gününde vaskülarizasyon başlar (30).

Travmanın 14. Gününden sonra makrofajlar ölü hücreleri temizlemek için lezyon bölgesine göç eder. Travma bölgesindeki gri cevher nekrotiktir ve kavitasyon görülür. Zaman geçtikçe fibroblast ve fibronojen infiltrasyonu ortaya çıkar (30).

3.SPİNAL KORD YARALANMALARI

Konplet keside lezyonun alt seviyelerinde duyu ya da motor fonksiyon hiç yoktur. İnkomples keside az da olsa duyu ya da motor fonksiyon vardır.

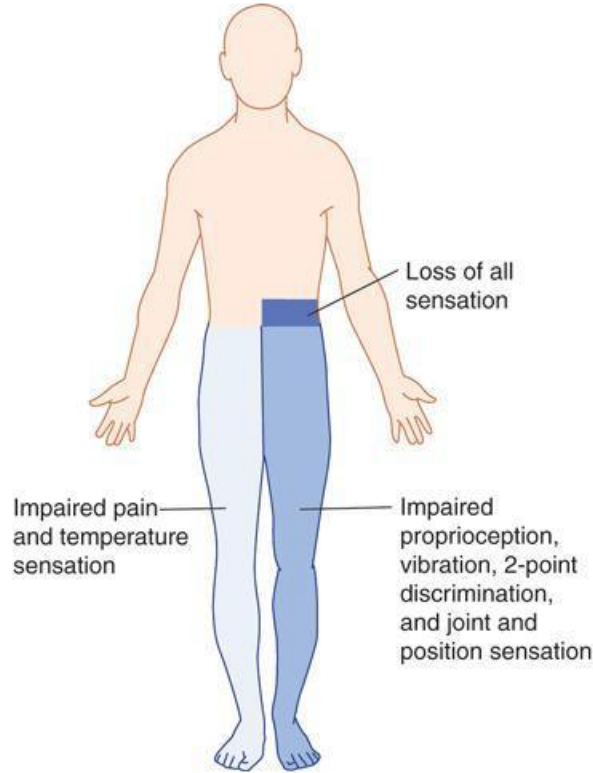
3.1.Komplet (Tam) Spinal Kord Yaralanması

Komplet yaralanmada travmanın 3 ya da daha fazla segment üzerinde hiç duyu ya da motor fonksiyon korunamamıştır. Bulgular 1 günde fazla devam ederse distal fonksiyonların geri gelmeyeceği anlamına gelir (6).

3.2.İnkomples (Kısmi) Spinal Kord Yaralanması

Klinikte üç farklı şekilde görürüz. Bunlar: Anterior ve posterior kord sendromu, Santral kor sendromu ve Brown Sequart sendromu (6).

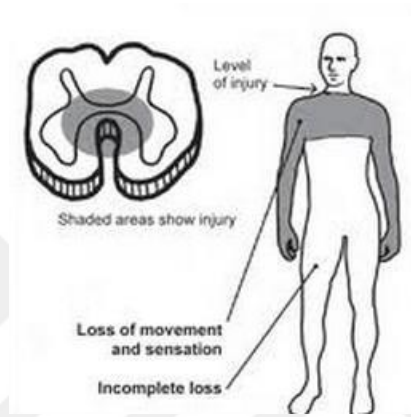
Brown-Sequart Sendromu; genelde penetran bir travma sonrası oluşan medulla spinalisin yarı kesisi sendromudur. Lezyonun altında kontralateral ağrı ısı kaybı farklı derecelerde idrar ve gaita inkontinansı, ipsilateral derin duyu, propriyepsiyon ve vibrasyon kaybı ile birlikte motor disfonksiyon gelişir. (Şekil 7).



Source: Waxman SG: *Clinical Neuroanatomy, 26th Edition*:

Şekil 7:Brown Sequart Sendromu (15)

Santal kord sendromu; Medulla spinalisin santral kanal ve çevresindeki lezyonlarda görülür. Çoğunlukla spinal dar kanalı olan hastalarda hiperekstansiyon yaranlaması sonrası gelişir. İnkomplet spinal kord yaranlanması en sık bu şekilde görülür. Lezyon düzeyinin altında üst ekstremitelerde daha çok olmak üzere bütün ekstremitelerde motor kayıp gelişir. Dissosiyasyon duysal kayıp görülür. Dissosiyasyon duysal kayıpta ağrı ve ısı duyuları kaybolmuştur. Sfinkter kusuru ve hastaların %7 sinde Lhermitte bulgusu vardır. İyileşme ilk başta alt ekstremiteler daha sonra mesane olacak şekilde distalden proksimale doğru ilerler. Hastaların büyük bir kısmı ilk 5 gün içinde destekle yürüyebilir (6) (Şekil 8).



Şekil 8: Santral Kord Sendromu

Anterior kord sendromu; Anterior spinal arterin enfarktına neden olan kordun anterior kısmındaki lezyonlar sonrası oluşan sendromdur. Klinikte C7 seviyesi üzerindeki lezyonlar tetrapleji ve bilateral ağrı ısı kaybı diğer lezyonlar parapleji olarak karşımıza çıkabilir. İnkomplet spinal travma sonrası en kötü prognozlu olandır (6).

4.SPİNAL KORD TRAVMASINDA HASTA YÖNETİMİ

Aspirasyon ve şok (nörojenik ve hipovolemik) spinal kord yaranmasında mortalitenin en önemli nedenidir. Travma sonrası muayenede öncelikle havayolu açıklığı kontrol edilmeli. Solunum dolaşım ve kanama kontrolü sonrası nörolojik fonksiyonlar değerlendirilmelidir (6).

Nörojenik şok travma sonrası spinal kord yaranmasına bağlı olmaksızın motor, duyu ve sempatik otonom fonksiyonun inkomplet veya tam kaybına sebep olan klinik durumdur. Hastanın kliniğinde hipotansiyon bradikardi ve sıcak ekstremiteler bulguları vardır. Servikal lezyonlarda belirgin olmak üzere hipotansiyon genellikle T6 düzeyi üzerindeki lezyonlarda görülür (4). Genelde 2 haftadan sonra geçer. Tüm refleksler kaybolmuştur ancak komplet kesinin ilk

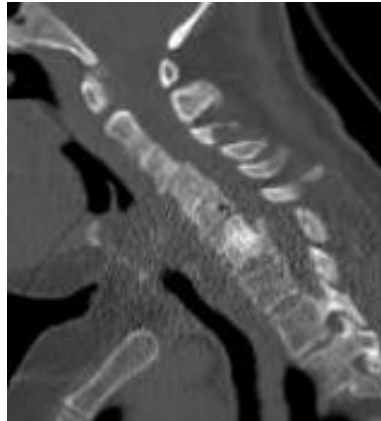
başlarında plejik ekstremitede uyarıyla fleksiyon gerçekleşebilir. Bu kısa süreli refleks spinal kordun otomatizmasına bağlı görülür ve adına mass refleksi verilir (31).

Hipovolemik şok; kan kaybı ve sıvı açığına bağlı olarak klinikte hipotansiyon, taşikardi ve hipotermi bulguları ile karşımıza çıkar. Temel parametrelerdeki anormallikler spinal kordda meydana gelecek sekonder hasarı artırabilir. Sistolik kan basıncı 90mmHg, nabızı da 45 atım/dakikanın üzerinde tutulmalıdır. Nörojenik şok ve hipovolemik şokta hipotansiyon tedavileri farklı olduğu için şok ayırımı yapılmalıdır. Hipotansiyon nörojenik şokta otonomik disfonksiyona bağlı gelişir. Sıvı açığı olmadığı için hipotansiyonu düzeltmek için sıvı tedavisi akciğer ödemine sebep olabilir(4).

Amerika spinal travma derneği (ASIA) ve Frankel nörolojik performans skalaları uluslararası kabul gördüğü için klinikte nörolojik muayenede bu skalalar kullanılmaktadır.

5.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TANI

Spinal kord travma şüphesi olan her hastada tanı amaçlı radyolojik inceleme yapılır. Direkt grafiler ilk aşamada kullanılır. Şuuru kapalı her hastada tüm spinal grafi çekilmelidir (Şekil 9). Direkt grafilerdeki görünen patolojik durum veya şüphelenilen durumlarda daha detaylı gösterme amaçlı olarak bilgisayarlı tomografi (BT) çekilmelidir. Kemik patolojilerini en iyi BT gösterir (4).



Şekil 9: C6 vertebra fraktürü (BT)

Ciddi spinal kord travması olan hastalarda yumuşak doku patolojilerini (disk hernisi, hematoma, ligament yaralanması ve nöral doku hasarı) göstermek amaçlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) çekilmelidir (4,6) (Şekil 10).



Şekil 10: Servikal fraktür MRI görüntüsü

6.SPİNAL KORD TRAVMASINDA TEDAVİ

Spinal kord travmasında tedavideki ana amaç sekonder hasarı azaltmaktır. Cerrahi tedavi ve medikal tedavi ile spinal kordu koruma amaçlı ajanların kullanılması bilinen tedavi seçenekleridir. SKT sonrası kullanılan ilaçların etkilerini belirlemek amacıyla tek ya da kombine şekilde deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır (14). Güncel tedavi yöntemleri arasında rejenerasyon çalışmaları ve hipotermi tedavisi bulunmaktadır (32).

6.1.Spinal Kord Travmasında Cerrahi Tedavi

Travma sonrası basıyı ortadan kaldırmak amacıyla yapılan dekompresif yaklaşım erken dönemde fayda verebilir. İlk 24 saat içinde yapılacak acil dekompresyon nörolojik durumu düzeltebilir. Ayrıca anatomik pozisyonda düzelme sağlama amaçlı yapılacak stabilizasyon sekonder hasar şiddetini azaltabilir (30).

6.2.Spinal Kord Travmasında Rejenerasyon ve Kök Hücre Tedavisi

Kök hücre kendini yenileme özelliği bulunduğundan birçok patolojide tedavi edici rolü bulunmaktadır. Birçok ciddi çalışma yapılmasına rağmen insanda spinal kordun rejenerasyonu halen gösterilememiştir. Son yıllarda kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin intravenöz uygulama sonrası rejenerasyon ve remyelinizasyon oluştuğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonrası üreyebilen kök hücrelerin spinal korda göç etmesi SKT sonrası gelişen geri dönüşümsüz nörolojik işlevlerin iyileşmesini mümkün kılar (4).

6.3.Spinal Kord Travmasında Medikal Tedavi

SKT üzerine yapılmış birçok deneysel çalışmalarda çeşitli farmakolojik ajanlar verilmiştir. Bazı farmakolik ajanların faydası deneysel olarak gösterilmişse de bu ajanlar klinikte kullanılamamıştır. İnsanlarda faz çalışmalarını bitirmiş ve güncel kullanıma giren ajanlar arasında başta metilprednizolon, gangliozidler ve naloksan bulunmaktadır (33).

6.3.1.Metilprednizolon

Metilprednizolonun (MP) travma sonrası ilk 8 saatte verilmesinin 6 hafta, 6 ay ya da 1 yıl içerisinde motor ve duyu fonksiyonlarda faydalı sonuçlarını kanıtlayan çalışmalar mevcuttur (6,18). NASCIS I, II, III (ulusal akut spinal kord yaralanma çalışmaları) SKT sonrası ilk 8 saat içinde verilen yüksek doz metilprednizolonun nörolojik fonksiyonlarda iyileşme sağladığını desteklemektedir. MP antiödem, lizozomal membran stabilizatörü ve antioksidan olarak görev yapar. MP Membrandaki Na-K ATPaz enzimini koruyarak ve lipid peroksidasyonuna (LP) bağlı membran yıkımını önleyerek etkisini gerçekleştirir (21,23). MP tedavisinin yan etkileri yüzünden kullanımı tartışmalı olsa da etkili tek medikal tedavidir (6).

Tedavi protokolü aşağıda gösterilmiştir:

İlaç konsantrasyonu: Tüm solüsyonlar 62.5 mg/ml olacak biçimde hazırlanır

Bolus: Başlangıçta 30mg/kg intravenöz 15 dakikada bolus olarak verilir.

İdame: 1.saatte idame tedavisi verilir. 5.4 mg/kg/saat 48 saati geçmeyecek şekilde infüzyon tedavisi verilir. Cerrahi tedavi yapılacaksa cerrahi işlem sırasında da infüzyona devam edilir (6,34).

6.3.2.Naloksan

NASCIS II çalışmasında opiyat reseptör antagonisti olan Naloksanın spinal kord hasarını engellemede etkili olduğu gösterilmiştir. Bu etkiyi de spinal kord kan akımını artırarak yaptığı biliniyor. Tedavide 5.4 mg/kg yükleme sonrası 24 saatte 4 mg/kg idame dozundan verilmesi sonrası başarılı sonuçlar elde edilmiştir (4,12).

6.3.3.Gangliosidler

Deneysel çalışmalarda antiapoptotik etkisi ve nöron gelişimi üzerine faydalı etkileri gösterilen glikosfingolipid yapıdaki ajanlardır. Klinik çalışmalarda 600 mg yükleme sonrası 56 gün boyunca 200mg/gün idame tedavi verildiğinde belirgin nörolojik iyileşme gösterilmiştir (4).

7.DENEYSEL SPİNAL KORD TRAVMA MODELLERİ

Travma oluşturmak için çok sayıda deneysel model bulunmaktadır. Güncel olarak yüksekte ağırlık düşürme ve anevrizma klipsi ile kompresyon modelleri kullanılmaktadır (17,35).

İlk yöntem Allen tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntemde laminektomi sonrası ortaya çıkarılan spinal korda belli bir yükseklikten bilinen bir ağırlık bırakılır (17).

İkinci yöntemde klips kullanılarak spinal kord komprese edilir. 24 g gücünde Yaşargil anevrizma klipi spinal korda kompresyon amacıyla 30 ya da 60 saniye tutulur ve travma yapılır (20).

Çalışmamızda anevrizma klips yöntemi kullanılarak travma gerçekleştirilmiştir.

8. MikroRNA'LAR

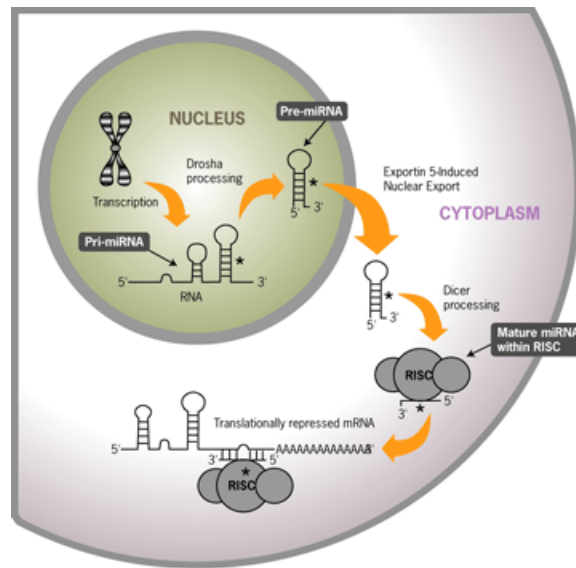
Transkripsiyon sonrası gen ifadesini kontrol eden protein kodlamayan ve 19-25 nükleotid uzunluğunda olan kısa RNA'lara mikroRNA (miRNA) denir. İlk defa Lee ve arkadaşları tarafından 1993 te C.elegans'ın gelişimini çalıştıklarında tanımlanmıştır. MiRNA'lar mRNA'ların protein baskınlanmasını hedef mRNA ya kısmi şekilde bağlanarak veya gen ifadesini susturmayı hedef mRNA'ları

keserek yaparlar (36). 19-25 baz çifti(bç) uzunluğundaki miRNA'lar 60-70 bç'lik tek zincirli öncüllerinden Dicer ve Drosha enzimleri yardımı ile hairpin prekürsörlerinin iki aşamada ayrılması sonrası oluşurlar. MiRNA lar hücre farklılaşması ve gelişimini tranlasyonel represyon mekanizmasının kullanarak gerçekleştirir. İnsanlarda şimdiye kadar 700 tane miRNA gen baskınlanması için iki aşamalı yolak izlediği görülmüştür (37).

8.1 mikroRNA yolağı

MiRNA'ların sentezlenmesi saç tokası yapısı içeren 60-70 bç'lik transkriptler halinde gerçekleşir. Bu transkriptlerden bir ya da daha fazla miRNA kodlanabilir. Pre-miRNA oluşması pri-miRNA'ların RNaz III tip enzimi olan insan DGCR8 (Drosha-Pasha) protein kompleksinin kesmesiyle gerçekleşir. Pre-miRNA nükleustan sitoplazmaya nükleer transport reseptör aracılığı ile geçer. Sitoplazmaya geçen pre-miRNA Dicer ve eş protein ile (Drosophila R2D2,insan TRBP) kesilerek çift iplikli dubleks miRNA'lara dönüşüm olur. Dubleksin bir ipliği nükleazlar tarafından parçalanırken diğeri ise olgun miRNA olarak görev yapar (36) (Şekil 11).

Bazı miRNA'lar mRNA ile tam komplementerlik göstermediğinden dolayı mRNA parçalanmaz bu yüzden sadece gen ifadesinin susturular. Ancak bazı miRNA'lar da mRNA ile tam uyum sağladığı için mRNA'yı parçalayarak gen ifadesinin sustururlar (36).



Şekil 11: miRNA yolağı (38)

MiRNA lar hücre gelişimi, hücre ölümü, bazı hastalıklarda (kanser, miRNA onkogenler ve beyin tümörleri) ve kolesterol biyosentezinde işlev görürler (39).

8.2.Spinal kord travmasının patofizyolojisi ve mikroRNA

1993 yılında ilk miRNA dizisinin keşfedilmesinden bu yana, insan vücudunda kilit düzenleyici rol oynayan binlerce benzersiz miRNA dizisi tanımlanmıştır (40). Özellikle miRNA'ların nörogeniz ve kortikal gelişimin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (41). SKY'nin yeni patofizyolojik mekanizmaları ve bunları izlemek için hassas biyobelirteçler tespit edilebilirse, SCI'nın yönetimi çarpıcı biçimde geliştirilecektir. Hücre dışı RNA'lardaki değişiklikler, ikincil yaralanma kaskadlarının düzenleyicilerini tanımlamak için kullanılabilir ve RNA konsantrasyonlarındaki genel değişiklikler, hastaları ikincil yaralanma risk kategorilerinde sınıflandırmak için kullanılabilir ve hasta sonuçlarının öngörüsü olabilir (42).

8.2.1 Astrogliazis

Normalde astrositler, merkezi sinir sistemi (MSS) homeostazını, kan-beyin bariyerini (KBB) ve kan-omurga bariyerini koruyarak, nöronal göçü, farklılaşmayı ve gelişmeyi yöneterek ve aksonal büyüme veya yenilenme için materyaller sağlayarak düzenler (43). Bir hasta omurilikte önemli bir yaralanmaya maruz kaldığında ve sekonder travmanın etkilerinden muzdarip olduğunda, yaralanmanın yakınında kalan bölge astrogliazis geçirir. Astrogliazisin akut aşamalarında (yaralanmadan yaklaşık üç gün sonra), glial fibril asidik protein (GFAP) ve vimentin (VIM) eksprese eden hipertrofik astrositler, enflamatuar lökositleri dışarıda tutar, antioksidanları salar ve kan-omurilik bariyerini korur. Bu etkiler hem koruyucu hem de faydalıdır (43,44).

Astrogliazisin sonraki aşamalarında (yaralanmadan yaklaşık 4-6 hafta sonra), astrositler, hipertrofikten hiperplastiğe dönüşerek kondroitin sülfat proteoglikanlarını eksprese ederek glial bir skar oluşturur. Bu, tüm lezyon bölgesini sıkıştıran ve akut hipertrofik fazda mevcut olan kendi kendini rehabilite eden ve koruyucu eylemleri önleyen zararlı bir süreçtir (43,44). Astrogliazis sürecinin, hipertrofikden hiperplaziye geçişinde önemli bir rol oynayan miRNA'larla ilişkili olduğu gösterilmiştir (43,44). MiRNA miR-21, astrogliazis sırasında lezyon bölgesine yakın ve içindeki astrositlerde yüksek oranda eksprese edilir (44). Ek olarak, miR-21, GFAP ve VIM'i baskıladığı için hipertrofikden hiperplaziye geçişinde doğrudan sorumludur.

MiR-21, STAT3 üzerinden sinyal veren kemik morfogenezik protein (BMP) tarafından yönetilir (43). Spesifik olarak, BMP reseptörü tip 1A ve 1B genleri, BMPR1A ve BMPR1B, miR-21'i zıt yönlerde düzenleyerek astrogliosisi kontrol eder. BMPR1A, miR-21 sinyalini düşürür, BMPR1B ise bunu artırır (44).

8.2.2 Apoptozis

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, SKY 'de görülür. Apoptozis, glial hücreler de dahil olmak üzere, omurilikteki tüm hücre tiplerini etkileyebilir. SKY'nin, miRNA ekspresyonunu, hedefe bağlı olarak apoptotik genleri yukarı ya da aşağı regüle etmesi için uyardığı dikkate alındığında bu önemlidir (43,44). Bu sürece dahil olan miRNA'lar arasında, miR-21'in SKY'den sonra en düzensiz miRNA'lardan biri olduğu gösterilmiştir (45, 46). Yukarıda bahsedildiği gibi, astrogliozda hipertrofidan hiperplaziye geçişin büyük ölçüde miR-21 tarafından yönetildiği ve miR-21'in baskılanmasının apoptoza neden olduğu bilinmektedir.

MiR-21, her ikisi de apoptozu teşvik eden Fas ligand geninin FASLG ve PTH fosfataz ve tensin homolog geninin aşağı regülatörüdür (44,45). Genel olarak, SKY sonrası apoptozis, ya kaspaz familyası genleri gibi proapoptotik genleri hedefleyen miRNA'ların aşağı regülasyonundan ya da BCL2 veya MYC gibi antiapoptotik genleri hedef alan miRNA'ların yukarı regülasyonundan kaynaklanır (44,47).

8.2.3 İnflamasyon

İnflamasyon doğal iyileşme sürecinin bir parçası olmasına rağmen, ilaçların çoğu onu en aza indirmeye veya tamamen ortadan kaldırmaya yöneliktir. İnflamasyon, vücudun doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından sürekli olarak düzenlenir (48). SKY'nin oluşumunda, iltihabın rolü doku sıkışmasına ve aşırı hücre ölümüne neden olan zararlı etkilere bağlıdır.

Astrogliozisin temel fonksiyonlarından biri, travmanın başlangıç noktasının ötesine ikincil hasarın yayılmasını en aza indirmek için lezyon bölgesindeki ve çevresindeki enflamatuar reaksiyonları en aza indirmektir. SKY'de, vücudun enflamatuar süreçlerini düzenlemeye yardımcı olan çeşitli miRNA'ların ifadeleri değişmiştir ve bu nedenle potansiyel tedaviler için önemli bir hedefdir. MiR-21 ve miR-146a'nın astrogliyal hipertrofidan hiperplaziye geçişinde rol oynadığı açıklanmaktadır. Çalışmalar, miR-146a'nın SKY sırasında spinal astrositlerde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir.

Proinflatuar enzim siklooksijenaz-2'yi (COX-2) ve IL1B ve IL6 genleri tarafından kodlanan proteinleri hedefler (44,48)

9.MATERYAL METHOD

Bu çalışmanın deneysel bölümü Bezmialem Vakıf üniversitesi Tıp Fakültesi Deneş Hayvanları Laboratuvarı'nda, real-time PCR çalışmaları Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

Deneş gruplarında 250-300 gr ağırlığında 8-10 haftalık 36 adet dişi sprague dawley sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deneş Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Sıçanlar işleş öncesi ve sonrasında takibi kafeslerde oda sıcaklığı (22-25C)'nda 12 saat gündüz/12 saat gece sirkadien siklusu halinde izlendi. Normal diet ve suya erişimi deneş sürecinde serbest bırakıldı.

9.1.Deneş Grupları

Çalışmamızda her birinde altı adet sıçan bulunan altı grup planlandı. Travma oluşturulmadan sadece laminektomi yapıp 1.gün sakrifiye edilen grup (Grup I), travma oluşturulup 1. gün sakrifiye edilen grup (Grup II), travma oluşturulduktan sonra metilprednizolon verilip 1. gün sakrifiye edilen grup (Grup III), travma oluşturulmadan sadece laminektomi yapıp 7.gün sakrifiye edilen grup (Grup IV), travma oluşturulup 7. gün sakrifiye edilen grup (Grup V), travma oluşturulduktan sonra metilprednizolon verilip 7. gün sakrifiye edilen grup (Grup VI) olmak üzere 6 gruba rastlantısal olarak ayrıldı (Tablo 1).

Tablo 1: Çalışma grupları

	Sakrifikasyon günü	Tedavi	Travma
Grup I (SHAM)	1	-	-
Grup II (TRAVMA)	1	-	+
Grup III (TRAVMA+TEDAVİ)	1	Metilprednizolon (30mg/kg)	+
Grup IV (SHAM)	7	-	-
Grup V (TRAVMA)	7	-	+
Grup VI (TRAVMA+TEDAVİ)	7	Metilprednizolon (30mg/kg)	+

9.2.Cerrahi İşlem ve Tedavi

Deney hayvanlarına anestezi, cerrahi işlem öncesi 60 mg/kg ketamin hidroklorür (Parke Davis, İstanbul) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun % 2 solüsyon, 50 cc. flakon, Bayer-Türk İlaç Ltd. İstanbul) spontan solunumda intraperitoneal yolla uygulandı. Sedasyondan emin olunduktan sonra sıçanların dorsal bölgesi tıraş edildi. Daha sonra sıçanlar yüzüstü pozisyonda işleme alındı. İşlem yapılacak alan batikonla temizlendikten sonra 15 numara bisturi ucu ile orta hatta 2 cmlik cilt kesisi yapıldı. Paraspinal kaslar ekarte edildi ve laminektomi işlemi yapıldı. Ardından SHAM cerrahi gruplarına (Grup I ve Grup IV) ek işlem yapılmadı.

Travma gruplarına (Grup II, III, V, VI) T9-T10 laminektomi sonrası spinal korda geçici anevrizma klipsi (kapanma kuvveti 90 g (0.88 N) olan Yaşargil geçici anevrizma klipi (FT262T, Aesculap, Tuttlingen, Almanya)) ile 30 sn. ekstradural kompresyon yapıldı.



Şekil 12: Medulla spinalisin anevrizma klipsi yöntemi ile kompresyonu

Grup II ve Grup V' deki sıçanlara medikal tedavi uygulanmadan sadece travma yapıldı. Grup III ve Grup VI'daki sıçanlara travma sonrası intraperitoneal Metilprednizolon 30 mg/kg yapıldı. Tüm sıçanların cilt, ciltaltı dokusu 3/0 atravmatik ipek sûtür ile anatomisine uygun şekilde kapatıldı. Kontrol grubu hariç travma uygulanan sıçanlar travmadan sonra paraplejik olduğu tespit edildi

Tüm gruplara erken postop dönemde 10 mg/kg parasetamol (Perfalgan, 10mg/mL infüzyon, Bristol Myers SQUIIB, Fransa) intraperitoneal olarak uygulanarak analjezi sağlandı. Paraplejik sıçanların mesanesi günde iki defa manuel kompresyon ile boşaltıldı. Grup I, II, III'teki sıçanlar 1.günde, grup IV, V, VI'daki sıçanlar 7.günde tekrar operasyona alındı, laminektomi alanındaki spinal kord örnekleri real-time PCR çalışmaları için çıkarıldı ve kapaklı 1.5 ml'lik eppendorf tüpleri içine koyuldu. Dokular -80 dolabına yerleştirildi. Ardından sıçanlar yüksek doz anestezi yöntemi ile sakrifiye edildi.

9.3.Real-Time PCR Çalışmaları

Doku örneklerinde miRNA-21 düzeyini ayrıca astrogliozis, apoptoz ve inflamasyon parametleri olan GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 düzeylerini real time PCR yöntemi ile belirlemek için aşağıdaki işlemler yapılmıştır.

9.3.1 RNA izolasyonu

1. Her numune için 1 µL Proteinaz K 300 µL Doku ve Hücre Lizis Solüsyonu içine seyreltildi.
2. Donmuş dokular sıvı nitrojende öğütüldü ve bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
3. Proteinaz K içeren 300 µL Doku ve Hücre Lizis Solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. 65 ° C'de 15 dakika inkübe edildi; Her 5 dakikada bir çevrildi.
5. Numuneler buz üzerinde 3-5 dakika bekletildi ve sonra toplam nükleik asit çöktürmesi kısmına geçildi.

9.3.1.1 Toplam Nükleik Asitlerin Çökeltilmesi

1. 300 µL parçalanmış numuneye 150 µL MPC Protein Yağış Reaktifi eklendi ve 10 saniye kuvvetlice karıştırıldı.
2. Hücre debris 4°C'de 10 dakika boyunca $\geq 10,000 \times g$ 'de bir mikrosantrifüjde santrifüjlenerek peletlendi.
3. Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve peleti atıldı.
4. Geri kazanılan süpernatanta 500 µL izopropanol eklendi. Tüp 30-40 kez ters çevrildi.
5. Toplam nükleik asitler 4 ° C'de 10 dakika boyunca bir mikrosantrifüjde santrifüjlenerek peletlendi.
6. Dikkatlice pelet çıkarılmadan izopropanol döküldü. Kirlenici DNA'nın RNA'dan uzaklaştırılması için Kirlenici DNA'nın Toplam Nükleik Asit Preparatlarından Çıkarılması kısmına geçildi.

9.3.1.2 Kirlenici DNA'nın Toplam Nükleik Asit Preparatlarından Çıkarılması

1. İzopropanolün tamamı bir pipetle çıkarıldı.
2. Her numune için 5 µL RNase-Free DNase I, 1X DNase Tamponu ile 200 µL'ye kadar seyreltildi. Her numune için 200 µL DNase I solüsyonu hazırlandı.
3. Toplam nükleik asit peleti 200 µL DNase I çözeltisi içinde yeniden süspanse edildi.
4. 37 ° C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 200 µL 2X T ve C Lizis Solüsyonu eklendi; 5 saniye çevrildi.
6. 200 µL MPC Protein Yağış Reaktifi eklendi; 10 saniye çevrildi; 3-5 dakika boyunca buz üzerine koyuldu.

7. Bir mikrosantrifüjde $\geq 10,000 \times g$ 'de 10 dakika boyunca $4^\circ C$ 'de santrifüjlenerek pelet oluşturuldu.
8. RNA içeren süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve pelet atıldı.
9. Süpernatana 500 μL izopropanol eklendi. Tüp 30-40 kez ters çevrildi.
10. Saflaştırılmış RNA $4^\circ C$ 'de 10 dakika boyunca bir mikrosantrifüjde santrifüjlenerek peletlendi.
11. RNA peleti yerinden çıkarılmadan izopropanol dikkatlice döküldü.
12. % 70 etanol ile iki kez durulandı, peletin yerinden çıkmamasına dikkat edildi. Daha sonra etanolün hepsi bir pipetle çıkarıldı.
13. RNA 10-35 μL TE Tamponu içinde yeniden süspanse edildi.
14. 1 μL RiboGuard™ RNase İnhibitörü eklendi.

9.3.2 cDNA dönüşümü

9.3.2.1 MikroRNA'dan Komplementer DNA Eldesi

Mir21 elde etmek için yapılan işlemler:

- I. Kit içeriğindeki kimyasallar buzun üstünde çözündürüldü ve reaksiyonlar buz üstünde devam ettirildi.
- II. Konsantrasyon 20 μl reaksiyon için en fazla 100 ng RNA kalıbı olacak biçimde ayarlandı.
- III. Reaksiyon Tablo 2'ye göre hazırlandı.

Tablo 2: miRNA'dan cDNA dönüşüm için kullanılan reaktifler ve miktarları

Materyal	Miktar
Kalıp RNA (200 ng)	6 μl 'ye kadar
5X RT tampon	4 μl
RT primer	0,4 μl
Ters transkriptaz enzimi	1 μl
Nükleaz içermeyen su	Total hacim 20 μl olacak biçimde eklendi.

- IV. Kimyasallar pipetaj yapıp tüp içerisinde karıştırıldı.
- V. Reaksiyon tüpü, ısı döngü cihazında 42°C’de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından reaksiyonu durdurma amaçlı 90°C’de 5 dakika boyunca inkübe edildi. Elde edilen cDNA, real-time PCR için -80°C’de saklanmıştır.

9.3.2.2 Total RNA’dan Komplementer DNA Elde Edilmesi

GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 elde etmek için yapılan işlemler:

- I. Kit içeriğindeki kimyasallar buzun üstünde çözdürüldü ve reaksiyonlar buz üstünde devam ettirildi.
- II. Reaksiyon Tablo 3’e göre hazırlandı.

Tablo 0: Total RNA’dan cDNA dönüşüm için kullanılan reaktifler ve miktarları

Materyal	Miktar
Total RNA (1 µg’a kadar)	200 ng
5X TransAmp tampon	4 µl
Ters transkriptaz enzimi	1 µl
Nükleaz içermeyen su	Total hacim 20 µl olacak biçimde eklendi.

- III. Yavaşça pipetaj yapılarak reaktifler karıştırıldı.
- IV. Isı döngü cihazında 25°C’de 10 dakika, 42°C’de 15 dakika boyunca inkübe edildi. Ardından reaksiyonu durdurma için 85°C’de 5 dakika boyunca inkübe edildi.
- V. Elde edilen cDNA, real-time PCR için -80°C’de bekletildi.

9.3.3 Real-Time PCR

9.3.3.1 miRNA’larda Rölatif Gen İfadesi

Mir21 elde etmek için sırasıyla yapılan işlemler:

MiRNA'dan elde edilen cDNA'lardan SensiSmart SYBR Master Mix (Bioline, Londra, İngiltere) yardımıyla RT-PCR amplifikasyon yapıldı.

- I. 2x SensiSmart™ Master Mix ve cDNA'lar buz üstünde çözündürüldü.
- II. cDNA reaksiyon tüpleri (20 µl), kitin içindeki DEPC'li su ile 100 µl'e kadar sulandırıldı.
- III. PCR reaksiyon mixi Tablo 4 baz alınarak hazırlandı. 96 kuyucuklu plağa dağıtıldı ve her cDNA örneği için iki kuyucuk çalışıldı.

Tablo 4: qPCR reaksiyonu için reaktifler ve miktarları

Reaktif	Tek Reaksiyon Miktarı
2x SensiSmart™ Master Mix	10 µl
Sulandırılmış cDNA	5 µl
PCR primerleri	2 µl
DEPC'li su	3 µl
Total Hacim	20 µl

- IV. Plak 200g'de 30 saniye boyunca santrifüj edildi.
- V. RT-PCR cihazı Tablo 5'te yazılan döngü parametrelerine ayarlandı ve polimeraz zincir tepkimesi gerçekleştirildi.

Tablo 5: RT-PCR'da kullanılan döngü parametreleri

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	10 dakika
	40°C	5 dakika
40	95°C	10 saniye

60°C

30 saniye

9.3.3.2 Hedef Genin Rölatif Gen İfadesi

GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 elde etmek için yapılan işlemler:

mRNA'dan elde edilen cDNA'lardan SensiFast™ SYBR No-ROX kit (Bioline, Londra, İngiltere) yardımıyla RT-PZR amplifikasyon yapıldı.

- I. PCR master mixi Tablo 6'da verilen değerlere göre hazırlandı.
- II. cDNA'lar (20 µl), 0,1 mM EDTA ile 100 µl'ye kadar sulandırıldı.
- III. Hazırlanan reaksiyonlar Tablo 7'de yazılan şartlarda yapıldı.

Tablo 1: RT-PCR reaksiyon içeriği

Reaktif	Hacim
2x SensiFAST SYBR No-ROX mix	10 µl
10 µM forward primer	0,8 µl
10 µM reverse primer	0,8 µl
cDNA	5 µl
dH ₂ O	3,4 µl
Total hacim	20 µl

Tablo 7: RT-PCR için uygulanan koşullar

Döngü Sayısı	Sıcaklık	Zaman
1	95°C	2 dakika
	95°C	5 saniye
40	60°C	10 saniye
	72°C	15 saniye

9.4.İstatistiksel Değerlendirme

İstatistik analizde IBM SPSS Statistic 21.0 veri analiz programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma, medyan(minimum-maximum) olarak verilmiştir. Grupların karşılaştırılmasında normal dağılıma uygun olan verilerde One Way ANOVA, normal dağılıma uygun olmayan verilerde Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Anlamli çıkan üç grup karşılaştırmalarında post-hoc karşılaştırmaları Tukey testi ile yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirme için $p<0.05$ değeri anlamlı kabul edilmiştir.

10.BULGULAR

Real-Time PCR sonucu elde edilen bulgular değerlendirildi. Bulguların delta ct (Δ ct) değeri hesaplandı. Delta ct (Δ ct) genin referans genden farkı olarak hesaplandı. Delta ct (Δ ct) 'nin mutlak değeri ne kadar yüksek ise referans genden o kadar uzaklaştığı ve gen ekspresyonun daha az olduğu anlamına gelir. MiRNA21 için referans geni olarak U6 geni; GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 için GAPDH geni referans alındı.

MiRNA21 ekspresyonu 1.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (grup I, II, III) kendi aralarında değerlendirildi. Elde edilen bulgularda travma grubundanki (grup II) ekspresyonun kontrol grubuna göre (grup I) arttığı görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi. Tedavi grubundaki (grup III) ekspresyonun travma grubuna göre (grup II) azaldığı görüldü ve bu azalma anlamlı idi ($p<0,05$). (Tablo 8)

Tablo 8: 1.gün sakrifiye edilen sıçanların miRNA21'e ait Δ ct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri

PARAMETRELER	Grup I	Grup II	Grup III
MiRNA21 (Δ ct)	4,38 \pm 1,16	3,47 \pm 1,03	5,96 \pm 1,37

MiRNA21 ekspresyonu 7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (grup IV, V, VI) kendi aralarında değerlendirildi. Kontrol grubuna (grup IV) göre hem travma grubundaki (grup V) hem de tedavi grubundaki (grup VI) sıçanlarda miRNA21

ekspresyonunun arttığı görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi. Travma grubu (grup V) ve tedavi grubu (grup VI) arasında ise belirgin farklılık görülmedi.(Tablo 9)

Tablo 9: 7.gün sakrifiye edilen sıçanların miRNA21'e ait Δct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.

PARAMETRELER	Grup IV	Grup V	Grup VI
MiRNA21 (Δct)	5,17 \pm 3,45	2,79 \pm 0,75	2,64 \pm 0,44

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında beklenildiği gibi anlamlı bir farklılık saptanmadı. Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7.gün sakrifiye edilen sıçanlarda miRNA ekspresyonunda artış görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi. Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7.gün sakrifiye edilen sıçanlarda miRNA ekspresyonunda anlamlı bir artış görüldü ($p<0.05$) .

Real time PZR yöntemi ile GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 düzeylerini belirlendi. Elde edilen bulgularda GFAP, VIM, STAT3, FASLG, PTEN, BAX, BCL2, COX-2, IL6 düzeyleri 1.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup I, II, III) arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı (Tablo 10) .

Tablo 10: 1.gün sakrifiye edilen sıçanlara ait parametrelerin Δ ct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.

PARAMETRELER	Grup I	Grup II	Grup III
GFAP (Δ ct)	-6,94 \pm 2,37	-5,76 \pm 0,97	-5,27 \pm 1,30
VIM(Δ ct)	-3,91 \pm 1,53	-6,48 \pm 2,24	-5,04 \pm 1,61
STAT3(Δ ct)	-5,7(min-7,7 max-3,8)	-7,2(min-7,7 max-5,1)	-5,2(min-7,7 max-4,9)
FASLG(Δ ct)	-11,63 \pm 0,38	-12,04 \pm 0,58	-12,29 \pm 1,26
PTEN(Δ ct)	-6,23 \pm 1,91	-8,09 \pm 1,64	-7,19 \pm 1,79
BAX(Δ ct)	-6,91 \pm 1,76	-8,35 \pm 1,55	-7,93 \pm 1,46
BCL2(Δ ct)	-11,09 \pm 0,59	-10,66 \pm 0,40	-11,17 \pm 0,97
COX-2(Δ ct)	2,70 \pm 1,65	2,87 \pm 1,51	2,46 \pm 0,94
IL6(Δ ct)	-9,54 \pm 1,67	-10,32 \pm 1,35	-9,17 \pm 1,58

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında GFAP düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) ve tedavi grubunda (grup VI) anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre azaldığı görüldü ancak bu azalma anlamlı değildi. (Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda GFAP düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7. gün sakrifiye edilen sıçanlarda GFAP düzeyinin azaldığı görüldü. Ancak bu azalma anlamlı değildi. Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda GFAP düzeyinde anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$)

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında VIM düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) ve tedavi grubunda(grup VI) azaldığı görüldü ancak bu azalma anlamlı değildi. Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artış anlamlı değildi.(Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında 7. gün sakrifiye edilen sıçanlarda VIM düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7. gün sakrifiye edilen sıçanlarda VIM düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7. gün sakrifiye edilen sıçanlarda VIM düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$).

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında STAT3 düzeylerinin kontrol grubuna(grup IV) göre travma (grup V) grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artma anlamlı değildi. (Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında STAT3 düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Travma grupları arasında (Grup II ve Grup V) ve Tedavi grupları arasında (Grup III ve Grup VI) STAT3 düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmedi.

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında FASLG düzeylerinin kontrol grubuna(grup IV) göre travma (grup V) grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artma anlamlı değildi.(Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar değerlendirildiğinde kontrol grupları arasında (Grup I ve Grup V) ,travma grupları arasında (Grup II ve Grup V) ve tedavi grupları arasında (Grup III ve Grup VI) FASLG düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmedi.

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında PTEN düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) ve tedavi grubunda (grup VI) anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artış anlamlı değildi.(Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda

PTEN düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda PTEN düzeyinin arttığı görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi. Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda PTEN düzeyinin arttığı görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi.

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında BAX düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) grubunun anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artış anlamlı değildi. (Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar değerlendirildiğinde kontrol grupları arasında (Grup I ve Grup V), travma grupları arasında (Grup II ve Grup V) ve tedavi grupları arasında (Grup III ve Grup VI) BAX düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmedi.

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında BCL2 düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) grubunda anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artış anlamlı değildi. (Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda BCL2 düzeylerinde anlamlı bir artma görüldü ($p<0.05$). Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda BCL2 düzeyinin azaldığı görüldü. Ancak bu azalma anlamlı değildi. Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda BCL2 düzeyinin arttığı görüldü. Ancak bu artış anlamlı değildi

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında COX2 düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) grubunda anlamlı şekilde arttığı görüldü ($p<0.05$). Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre azaldığı görüldü ancak bu azalma anlamlı değildi.(Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar değerlendirildiğinde kontrol grupları arasında (Grup I ve Grup V) ,travma grupları arasında (Grup II ve Grup V) ve tedavi grupları arasında (Grup III ve Grup VI) COX2 düzeyinde anlamlı bir farklılık görülmedi.

7.gün sakrifiye edilen sıçan grupları (Grup IV, V, VI) arasında IL6 düzeylerinin kontrol grubuna (grup IV) göre travma (grup V) ve tedavi grubunda (grup VI) azaldığı görüldü ancak bu azalma anlamlı değildi. Tedavi grubundaki (grup VI) düzeylerin travma grubuna (grup V) göre arttığı görüldü ancak bu artış anlamlı değildi. (Tablo 11)

1.ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlar kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grupları (Grup I ve Grup IV) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda IL6 düzeylerinde anlamlı bir farklılık görülmedi. Travma grupları (Grup II ve Grup V) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda IL6 düzeyinde anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$). Tedavi grupları (Grup III ve Grup VI) arasında 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda IL6 düzeyinde anlamlı bir azalma görüldü ($p<0.05$)

Tablo 11: 7.gün sakrifiye edilen sıçanlara ait parametrelerin Δ ct değerlerinin ortalama \pm standart hata değerleri.

PARAMETRELER	Grup IV	Grup V	Grup VI
GFAP (Δ ct)	-1,69 \pm 1,70	-6,66 \pm 2,58	-8,83 \pm 2,65
VIM(Δ ct)	-0,23(min-3,70 max 0,22)	-2,25(min-2,6 max-0,57)	-1,24(min-2,4 max0,69)
STAT3(Δ ct)	-4,05 \pm 0,65	-6,80 \pm 1,27	-5,88 \pm 1,58
FASLG(Δ ct)	-11,14 \pm 0,53	-12,53 \pm 1,26	-12,17 \pm 0,56
PTEN(Δ ct)	-4,00 \pm 0,57	-6,60 \pm 0,93	-6,18 \pm 1,14
BAX(Δ ct)	-5,56 \pm 0,57	-7,89 \pm 1,91	-7,50 \pm 1,08
BCL2(Δ ct)	-9,79 \pm 0,87	-11,25 \pm 0,55	-10,75 \pm 0,84
COX-2(Δ ct)	3,05 \pm 0,50	1,37 \pm 1,12	1,73 \pm 1,05
IL6(Δ ct)	-11,07 \pm 1,20	-12,45 \pm 0,76	-11,20 \pm 1,11

11.TARTIŞMA

Spinal kord travmalarının oluşturduğu hasar göz önüne alındığında ve literatürde kesin bir tedavisinin olmamasından dolayı önemi halen devam etmektedir. Spinal kord yaralanmasının fizyopatolojisinin açıklanmasında önemli gelişmeler olmasına ve güncel medikal tedavilere rağmen yüksek doz

metilprednizolon dışında klinikte etkinliği gösterilmiş başka bir tedavi yoktur (14).

SKT geçiren hastalarda kalıcı ve geri dönüşsüz nörolojik defisitler geliştiği için yaşam kalitesi azalır (49). Yüksek doz kortikosteroidlerin faydaları gösterilmiş olsa da kortikosteroidlerin ciddi yan etkileri vardır. SKT patolojisi ve SKT'nin medikal tedavisi ile ilgili soru işaretlerini gidermek için çalışmalar halen devam etmektedir. Mekanik etkiler ile meydana gelen primer hasar sonrası spinal kordda meydana gelen biyokimyasal ve histopatolojik olaylara sekonder hasar adı verilir ve spinal kordun daha çok zarar görmesine dolayısıyla SKT sonrası hücre ölümünün devamına sebep olmaktadır. Primer hasarın medikal ya da cerrahi tedavisi bulunmamasından dolayı kök hücre tedavi çalışmaları dışındaki tüm çalışmalar sekonder hasarı gidermeye yöneliktir (16,17).

Daha önceki çalışmalarda SKT'de hasarın en önemli sebeplerinden spinal korddaki kan akımının azalması olduğu belirtilmiştir. SKT sonrasındaki endorfinlerin vazokonstriktör etkileri kan akımını azalttığı bilinmektedir. Bu mekanizmadan dolayı opiat antagonistlerin endorfinlerin oluşturduğu vazospastik etkiyi ortadan kaldırarak spinal korddaki kan akımını arttırdığı bundan dolayı nörolojik hasarı engelleyebileceği ileri sürülmüştür (50).

Yapılan bir çalışmada spinal kord travmasına bağlı hipotansiyon meydana gelse bile yüksek dozlarda medilprenizolon tedavisinin bölgesel kan akımının arttırdığı ve lipid peroksidasyonunu azalttığı belirtilmiştir. Sekonder hasarda görülen lipid peroksidasyonun metilprednizolon tedavisi ile engellenmesinden dolayı lipid peroksidasyonu nedeniyle meydana gelen hücre ölümünün daha az olduğu düşünülmektedir (12).

MiRNA'lar hücrenin protein profili üzerinde güçlü ve önemli bir etkiye sahiptir. 1993 yılında ilk miRNA dizisinin keşfedilmesinden bu yana, insan vücudunda kilit düzenleyici rol oynayan binlerce benzersiz miRNA dizisi tanımlanmıştır (40). Özellikle miRNA'ların nörogenез ve kortikal gelişimin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (41). SKY'nin yeni patofizyolojik mekanizmaları ve bu mekanizmaları takip için hassas biyobelirteçler tespit edilebilirse, SKY'nin yönetimi çarpıcı biçimde geliştirilecektir (42).

SKY sonrası sekonder yaralanmanın etkisi olarak yaralanma bölgesi astrogliosis geçirir. Astrogliosisin akut aşamalarında (yaralanmadan yaklaşık üç gün sonra), glial fibriler asidik protein (GFAP) ve vimentin (VIM) eksprese eden

hipertrofik astrositler, enflamatuar lökositleri dışarıda tutar, antioksidanları salar ve kan-omurilik bariyerini korur. Bu etkiler koruyucu ve faydalıdır. Astrogliosisin sonraki aşamalarında astrositler, hipertrofikten hiperplastiğe dönüşerek kondroitin sülfat proteoglikanlarını eksprese ederek glial bir skar oluşturur. Bu, tüm lezyon bölgesini sıkıştıran ve akut hipertrofik fazda mevcut olan kendi kendini rehabilite eden ve koruyucu eylemleri önleyen zararlı bir süreçtir (44, 43).

Dong ve arkadaşları tarafından 2014'de yapılan derlemede miR-21'in astrogliyoz sırasında lezyon bölgesine yakın ve içindeki astrositlerde yüksek oranda eksprese edildiği belirtildi (44). Çalışmamızda da benzer olarak miRNA21 ekspresyonunun travma sonrası anlamlı olmasa da arttığı ve bu artışın 7.günde daha fazla olduğu görüldü. Metilprednizolon tedavisinin miRNA21 üzerine etkisi daha önce çalışılmamıştır. Bizim çalışmamızda metilprednizolon verilen sıçanlarda akut dönemde (1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda) miRNA21 ekspresyonunun anlamlı bir şekilde azaldığı görüldü. Metil prednizolon verilen ve 7. Gün sakrifiye edilen sıçanlarda miRNA21 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik görülmedi. Bu durumu metilprednizolon tedavisinin travma sonrası erken dönemde verildiği ve daha sonra verilmediği için 7.gün sakrifiye edilen sıçanlarda anlamlı sonuç vermediğini açıklayabilir.

MiR-21, GFAP ve VIM'i baskıladıği için hipertrofidan hiperplaziye geçişinden doğrudan sorumludur. MiR-21, transkripsiyon 3 geni, STAT3 sinyal transdüseri ve aktivatörü üzerinden sinyal veren kemik morfogenezik protein (BMP) tarafından yönetilir (43). Bastırılmış miR-21 sinyallemeli nakavt fareler astrosit hipertrofisini korur, daha küçük lezyon bölgeleri, daha az demiyelinizasyon, daha büyük akson rejenerasyonu ve genel olarak daha düşük bir enflamatuar yanıtla ilişkilidir (44.). Çalışmamızda astrogliosis parametreleri olan GFAP, VIM ve STAT3 değerlendirildi. Elde edilen sonuçlarda akut dönemde (1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda) anlamlı bir değişiklik görülmedi. Daha sonraki dönemde (7.gün sakrifiye edilen sıçanlarda) travma sonrası GFAP VIM ve STAT 3 ekspresyonunun azaldığı görüldü. Bu da 7. Gün artan miRNA 21 in GFAP ve VIM i baskılaması şeklinde yorumlanabilir. Aynı zamanda metilprednizolon tedavisinin 7.gün sakrifiye edilen sıçanlardaki GFAP VIM ve STAT 3 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü. Metilprednisolone tedavisinin GFAP VIM ve STAT 3 te yapacağı değişiklikler miRNA21 üzerinden yapabileceği düşünüldü.

Astrogliozda hipertrofidan hiperplaziye geçişin büyük ölçüde miR-21 tarafından yönetildiği ve miR-21'in baskılanmasının apoptoza neden olduğu

bilinmektedir. MiR-21, her ikisi de apoptozu teşvik eden FASLG ve PTEN geninin aşağı regülatörüdür (44,46). Her ne kadar miR-21'in baskılanması astrogliosis ile ilgili birçok yararlı etkiye sahip gibi gözükse de, nöronal hücre ölümü zıt etkiye sahiptir. Antagomir-21 kullanılarak miR-21'in baskılanması, spinal kord dokusunda SKY'den 28 gün sonra nöronal defisitleri ve lezyon boyutunu arttırır (46). Bu etki, miR-21'in inhibisyonunun, yaralanmadan 1-2 hafta sonra daha küçük lezyon boyutlarına ve daha etkin iyileşmeye neden olduğunu belirten çalışmanın bulgularının aksinedir. Bununla birlikte, her iki veri seti de kendi zaman dilimlerinde doğru olabilir (42).

Başka bir çalışmada miR-21'in oksidatif stres sırasında reaktif oksijen türlerini (ROS) kaynaklı apoptozu kuvvetle etkilediği gözlenmiştir. MiR-21 susturulduğunda, omurilik nöronlarında ROS kaynaklı hücre ölümü azaltıldı. Omurilik hücreleri üzerinde miR-21'in etkisi serbest radikallerinkine benzerdi. Bu veriler, miR-21 aşırı ekspresyonunun antiapoptotik etkilerinin nöronlar için geçerli olmadığını göstermektedir (51).

SKY'den sonra Antagomir-223 tedavisi, BAX ve CASP3'ü azaltarak ve BCL2'yi artırarak önemli ölçüde düşürülmüş apoptotik hücrelere yol açtı. Bu tedavi spinal kord dokusunu korudu ve Basso, Beattie ve Bresnahan lokomotor skalasındaki skorlarını SKY'den sonra anlamlı şekilde arttırdı (52). Çalışmamızda BAX ve BCL2 ekspresyonlarında travmanın 7. Gününde anlamlı azalma görüldü. Metil prednizolone tedavisinin BAX ve BCL'de anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü.

Genel olarak, SKY sonrası apoptozis, ya kaspaz familyası genleri gibi proapoptotik genleri hedefleyen miRNA'ların aşağı regülasyonundan ya da BCL2 veya MYC gibi antiapoptotik genleri hedef alan miRNA'ların yukarı regülasyonundan kaynaklanır (44, 47). Bu düzenleyici etkiler, proapoptotik ve antiapoptotik miRNA'ların dengesini yönetmeyi içeren potansiyel terapötik stratejiler için çoklu yollar sağlar. Böyle bir strateji Liu ve arkadaşları 2010 yılında; Çalışmalarında, ilk 10 gün içinde yapılan 5 günlük bisiklet egzersizi rejimi farelerde miRNA ekspresyonunu önemli ölçüde değiştirdi (53). Çalışmaları, egzersiz ile antiapoptotik ajanlar miR-21 ve BCL2'nin arttığını, proapoptotik ajanlar miR-15b, CASP7 ve CASP9'un azaldığını göstermiştir (53). Çalışmamızda da proapopitotik olan FASLG ve PTEN gen ekspresyonunun akut dönemde (1.gün sakrifiye edilen sıçanlarda) anlamlı bir değişiklik görülmedi. PTEN in 7. Gündeki ekspresyonunda travma grubunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı ve tedavi grubunda anlamlı olmasa da daha da azaldığı

görüldü. Bu sonuçlar miRNA21'in 7. Günde artan ekspresyonlarının proapoptotik olan PTEN'in aşağı regülatörü olmasından kaynaklanabilir. Aynı zamanda metil prednisolone tedavisi sonrası PTEN'in 7. Günde daha da azaldığı görüldü.

Astrogliosisin temel fonksiyonlarından biri, travmanın başlangıç noktasının ötesine ikincil hasarın yayılmasını en aza indirmek için lezyon bölgesindeki ve çevresindeki enflamatuar reaksiyonları en aza indirmektir. SKY'de, vücudun enflamatuar süreçlerini düzenlemeye yardımcı olan çeşitli miRNA'ların ifadeleri değişmiştir ve bu nedenle potansiyel tedaviler için önemli bir hedeftir (42).

MiRNA miR-146a'nın miR-21 ile yakın işbirliği içinde olduğu ve astroglial hipertrofi den hiperplaziye geçişinde rol oynar. Çalışmalar, miR-146a'nın SKY sırasında spinal astrositlerde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir. Proinflamatuar enzim siklooksijenaz-2'yi (COX-2) ve IL1B ve IL6 genleri tarafından kodlanan proteinleri hedefler (44, 48). Çalışmamızda da travmanın 1. Gününde metilprednisolone tedavisinin miRNA21 ekspresyonunu azalttığı ancak COX-2 ve IL6 değerlerinde anlamlı bir değişiklik olmadığından miRNA21 ile COX-2 ve IL6 arasında net bir ilişki ortaya koyulamadı. Çalışmamızda travmanın 7.gününde COX-2'nin anlamlı arttığı IL6'nın anlamlı azaldığı görüldü. Metilprednisolone tedavisinin COX-2 ve IL6 ekspresyonlarında anlamlı bir değişiklik yapmadığı görüldü.

12.SONUÇ

Omurilik yaralanması sınırlı tedavi kaynakları ile ciddi ve zayıflatıcı bir yaralanmadır. Omuriliğin ilk yaralanmasından sonra, toplam hasarın büyük bir kısmına katkıda bulunan çok sayıda ikincil patofizyolojik olay meydana gelir. Bu tür ikincil olaylar arasında inflamasyon, apoptoz, ROS oluşumu ve astrogliosis bulunur. Son yıllarda, birçok çalışma miRNA'ları ikincil yaralanmaya katkıda bulunanlar ve düzenleyiciler olarak tanımlamış, araştırmanın çoğu ilgili miRNA için spesifik mRNA hedefleri sunmuştur. Bununla birlikte, tüm miRNA'lar SKY'leri olumsuz etkilememektedir. Bazı miRNA'ların vücudun iyileşme mekanizmalarının faydalı yönlerini desteklediği görülmektedir. Bununla birlikte, temel sorun, çoğu durumda, SKY'nin hem zararlı miRNA'ların aşırı ekspresyonuna hem de faydalı miRNA'ların inhibisyonuna neden olmasıdır. SKY'den sonra miRNA'ların ekspresyonunun manipüle edilmesi, SKY'nin kalıcı ve zararlı etkilerinin üstesinden gelmek için yeni bir terapötik strateji olabilir,

çalışmamızda da klinikte SKY tedavisi olarak kullanılan metilprednizolone tedavisinin erken dönemde miRNA21 ekspresyonlarını azalttığı görüldü. Daha sonraki miRNA21 kontrolü için tedavi süresinin belirlenmesi açısından daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. Simon CM, Tan RP, LaPlaca MC. Spinal cord contusion causes acute plasma membrane damage. *J Neurotrauma*. 2008; 26(4):563-74.
2. Aslan G, Ökten A, Çaylı S. Omurilik Yaralanmasının Patoloji Ve Fizyopatolojisi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006; 28(2):73-8.
3. Seçkin Z, Aykol Ş, Orbay T, Ataoğlu Ö. Deneysel spinal kord yaralanmalarında farklı ilaç gruplarının etkisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*. 1991; 2(1): 10-3.
4. Merih I, Taner T, Hakan Y, Fevzullah A, Aylin A, Ferruh G, Mustafa U. The Use of Methylprednisolone, Vitamin E and Their Combination in Acute Spinal Cord Injury: An Experimental Study. *Turkish Neurosurgery*. 2006; 16(1): 2-8.
5. Kalayci M, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S, Acikgoz B. Neuroprotective effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats. *Neurochem Res*. 2005; 30(3): 403-10.
6. Yusuf SŞ, Ömer B, Sevil AV. Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimentally Induced Spinal Cord Trauma. *L Clin Anal Med*. 2012; 3(4): 442-7.
7. Sencer A, Aras Y, Akçakaya MO, Gömleksiz C, Can H, Canbolat A. 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. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2013; 19(4): 313-19
8. Impellizzeri D, Mazzon E, Paterniti I, Di Paola R, Bramanti P, Morittu VM, Procopio A, Perri E, Britti D, Cuzzocrea S. The effects of a polyphenol present in olive oil, oleuropein aglycone, in an experimental model of spinal cord injury in mice. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83(1): 1413-26.
9. Król W, B.V., Sforcin JM, Szliszka E, Czuba Z, Kuropatnicki AK. Propolis: properties, application, and its potential. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; doi: 10.1155/2013/807578
10. Ertuğrul U, Uğur F, Osman E, Harun A, Adnan T, Celal Y, Sinan D, Nebahat T. Deneysel Serebral İskemi/Reperfüzyon Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi. *Türk Nörol Derg*. 2011; 17(1): 131-136.

11. Olczyk P, Komosinska-Vassev K, Stojko J, Pilawa B. Positive effect of propolis on free radicals in burn wounds. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; doi: 10.1155/2013/356737
12. Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Iraz M, Oztas E. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis-induced oxidative stress in rats. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(3): 386-94.
13. Hoşnüter M, Babuççu O, Armutcu F, Kargi E, Işikdemir A. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns.* 2004; 30(1): 121-5.
14. Teke Z, Yenisey C, Sacar M, Simsek NG, Akoglu M. Caffeic acid phenethyl ester alleviates mesenteric ischemia/reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2012; 25(1): 354-65.
15. Shi Y, W.X., Gong Y, Qiu Y, Zhang H, Huang Z, Su K. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Curr Eye Res.* 2010; 35(10): 930-7
16. Ilhan A, K.U., Ozen S, Uz E, Ciralik H, Akyol O. The effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999; 16(1): 458-63.
17. Vural A, Nergis Y, Arslan A, Uzunlar K. Deneysel spinal kord travmalarında dopamin ile kombine nimodipin ve nalorfinin etkileri *Ankara Patoloji Bülteni.* 1994; 11(2): 21-5.
18. Onifer SM, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. *ILAR J.* 2007; 48(4): 385-95.
19. Hasturk A, Calisaneller T, Ozdemir O, Oruckaptan H, Altinors N. Analysis of serum pro-inflammatory cytokine levels after rat spinal cord ischemia/reperfusion injury and correlation with tissue damage. *Turk Neurosurg.* 2009; 19(4): 353-59
20. Döşoğlu M, İzgi N, Ünal ÖF. Omurilik Travmalarında İkincil Hasar Mekanizmaları. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 1998; 4(3): 147-57
21. Bakar B, Kupana Ayva S, Sarkarati B, Kasımcıan MO, Kılınç K. Effects of low-dose methotrexate in spinal cord injury in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013; 19(4): 285-93
22. Cristante AF, B.F.T., Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID. Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo).* 2012; 67(10): 1219-24.
23. Ismailoğlu Ö, O.B., Sütcü R, Kara Y, Tomruk O, Demir N.

- Neuroprotective effects of raloxifene on experimental spinal cord injury in rats. *Am J Med Sci*. 2013; 345(1): 39-44.
24. Song Y, Jin C, Zhang J, Ding B, Zhang F. Protective effect of ginkgolide B against acute spinal cord injury in rats and its correlation with the Jak/STAT signaling pathway. *Neurochem Res*. 2012; 38(3): 610-9.
25. Kuropatnicki AK, Kłósek M, Król W. The beginnings of modern research on propolis in poland. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; doi: 10.1155/2013/983974
26. Chengke WL, Xiyang W, Ping W, Xiaoyang P, Zhengquan X, Hao Z, Penghui Z, Wei P. Effect of infliximab combined with methylprednisolone on expressions of NF- κ B, TRADD, and FADD in rat acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013; 38(14): 861-9.
27. Cristante AF, Oliveira RP, Marcon RM, Ferreira R, Santos GB. Effects of antidepressant and treadmill gait training on recovery from spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. 2013; 51(1): 501-7.
28. Li X, Xu S, Lin X, Ling Z. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist rosiglitazone reduces secondary damage in experimental spinal cord injury. *J Int Med Res*. 2013. 41(1): 153-61.
29. Schiaveto-de-Souza A, Defino HL, Del Bel EA. Effect of melatonin on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord. *Braz J Med Biol Res*. 2013; 46(4): 348-58.
30. Grulova I, Nagyova M, Cizek M, Cizkova D. The effect of hypothermia on sensory-motor function and tissue sparing after spinal cord injury. *Spine J*. 2013; doi: 10.1016/j.spinee.2013.06.073. [Epub ahead of print].
31. Polat E, Elvan Ö, Bağrıyanık A, Kuyumcu M, Atalay A. Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması. *Turk Anest Rean Der*. 2010; 40(4): 212-21.
32. Neirinckx V, Coste C, Rogister B, Franzen R, Wislet-Gendebien S. Spinal cord injuries - how could adult mesenchymal and neural crest stem cells take up the challenge? *Stem Cells*. 2013; doi: 10.1002/stem.1579. [Epub ahead of print].
33. Avcı CB, Baran Y, Sahin F, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G. Caffeic acid phenethyl ester triggers apoptosis through induction of loss of mitochondrial membrane potential in CCRF-CEM cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137(1): 41-7.
34. Kasai M, Soumiya H, Furukawa S., Ethanol extract of chinese propolis

- facilitates functional recovery of locomotor activity after spinal cord injury. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011;10.1155/2011/749627.
35. Karamehmetoğlu SS, Karacan I, Yılmaz H, Togay HS, Ertekin M, Döşoğlu M, Ziyal MI, Kasaroğlu D, Hakan T. Traumatic spinal cord injuries in Istanbul, Turkey. An epidemiological study. *Paraplegia.* 1995; 33(8): 469-71
36. Seydel GŞ, Aksoy K. Onkogen ve tümör supressör gen olan miRNA'ların özellikleri ve kullanım alanları. *Arşiv Der* 2009; 18 (1):1-12.
37. Karaboz I, Colak C. Antisens teknolojisi. *Or-lab on-line Mikrobiyo Der* 2007; 5 (2):14-30.
38. Güzelgöl F. Aksoy K. Kodlanmayan RNA'ların işlevi ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.* 2009;18:141-55
39. Narry KV. Small RNAs: classification, biogenesis and function. *Mol Cells* 2005; 19, 1-15.
40. Ning B, Gao L, Liu RH, Liu Y, Zhang NS, Chen ZY. microRNAs in spinal cord injury: potential roles and therapeutic implications. *Int J Biol Sci* (2014) 10(9):997–1006. doi:10.7150/ijbs.9058
41. Fineberg SK, Kosik KS, Davidson BL. microRNAs potentiate neural development. *Neuron* (2009) 64(3):303–9. doi:10.1016/j.neuron.2009.10.020
42. Martirosyan NL, Carotenuto A, Patel AA, Kalani MYS, Yagmurlu K, Lemole GM Jr. , Preul MC and Theodore N (2016) The Role of microRNA Markers in the Diagnosis, Treatment, and Outcome Prediction of Spinal Cord Injury. *Front. Surg.* 3:56. doi: 10.3389/fsurg.2016.00056
43. Karimi-Abdolrezaee S, Billakanti R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury-beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol* (2012) 46(2):251–64. doi:10.1007/s12035-012-8287-4
44. Dong J, Lu M, He X, Xu J, Qin J, Cheng Z, et al. Identifying the role of microRNAs in spinal cord injury. *Neurol Sci* (2014) 35(11):1663–71. doi:10.1007/ s10072-014-1940-0
45. Yunta M, Nieto-Diaz M, Esteban FJ, Caballero-Lopez M, Navarro-Ruiz R, Reigada D, et al. microRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury. *PLoS One* (2012) 7(4):e34534. doi:10.1371/journal.pone.0034534
46. Hu JZ, Huang JH, Zeng L, Wang G, Cao M, Lu HB. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma* (2013)

47. Liu NK, Wang XF, Lu QB, Xu XM. Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol* (2009) 219(2):424–9. doi:10.1016/j.expneurol.2009.06.015
48. Alam MM, O’Neill LA. microRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol* (2011) 41(9):2482–5. doi:10.1002/eji.201141740
49. Anderson DK, M.E., Waters TR, Green ES, Microvascular perfusion and metabolism in injured spinal cord after methylprednisolone treatment. *J Neurosurg*. 1982; 56: 106-113.
50. Guang C, Shouyu W, Decheng LV. Combined treatment with FK506 and nerve growth factor for spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med*. 2013; 6(4): 868-72.
51. Jiao G, Pan B, Zhou Z, Zhou L, Li Z, Zhang Z. microRNA-21 regulates cell proliferation and apoptosis in H₂O₂-stimulated rat spinal cord neurons. *Mol Med Rep* (2015) 12(5):7011–6. doi:10.3892/mmr.2015.4265
52. Liu D, Huang Y, Jia C, Li Y, Liang F, Fu Q. Administration of antagomir-223 inhibits apoptosis, promotes angiogenesis and functional recovery in rats with spinal cord injury. *Cell Mol Neurobiol* (2015) 35(4):483–91. doi:10.1007/s10571-014-0142-x
53. Liu G, Keeler BE, Zhukareva V, Houle JD. Cycling exercise affects the expression of apoptosis-associated microRNAs after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* (2010) 226(1):200–6. doi:10.1016/j.expneurol.2010.08.032



