



T.C.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BEYİN ve SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

# **DeneySEL Spinal Kord Yaralanmasında Oleuropein'in High Mobility Group Box-1 Aracılığıyla Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması**

Dr. Fatih ÇALIŞ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç.Dr.Mustafa Aziz HATİBOĞLU

İSTANBUL

2016



## ÖNSÖZ

Nöroşirürji eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, yalnız mesleki eğitimimde değil her durumda katkı ve desteklerini yanımda hissettiğim değerli hocalarım Prof. Dr. M. Yaşar Kaynar ve Prof. Dr. Saffet Tüzgen'e; tez çalışmalarımın başlatılması ve yürütülmesinin her aşamasında yardım ve eleştirileriyle katkı sağlayan, sorumluluk bilinci ve titizlikle işlerini yapmasıyla örnek aldığım tez danışmanım Doç. Dr. Mustafa Aziz Hatiboğlu'na; nöroşirürjiyi kendisi için bir meslekten daha çok bir yaşam şekli haline getiren kıymetli abim Doç. Dr. Hakan Hanımoğlu'na çok teşekkür ederim.

Mesleki tecrübesiyle her zaman yanımda olan Yrd. Doç. Dr. M. Hakan Seyithanoğlu ve Op. Dr. Meliha Gündoğ Papaker'e; abilerim Op. Dr. Şeref Öztürk, Op. Dr. Serkan Kitiş, Op. Dr. Tolga Turan Dünder, Op. Dr. Serdar Çevik'e ve acısıyla tatlısıyla bu zorlu eğitim sürecini omuz omuza geçirdiğimiz arkadaşlarım Arş. Gör. Dr. Enes Akkaya ve Arş. Gör. Dr. Şevket Evran'a; Arş. Gör. Dr. Salim Katar, Arş. Gör. Dr. Tahsin Saygı ve Arş. Gör. Dr. Abdurrahim Tekin'e 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 annem ve babama; biricik kardeşime çok teşekkür ederim.

.....

## İçindekiler Tablosu

<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>III</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>KISALTMALAR</b> .....	<b>IX</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1)GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>4</b>
<b>2)GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>6</b>
2.1 SPİNAL KORD YARALANMASI .....	6
2.1.2 Spinal Kord Yaralanmasının Evreleri .....	6
2.1.3 Sekonder (Subakut) Faz .....	7
2.2 SPİNAL KORD YARALANMASI PATOFİZYOLOJİSİ.....	7
2.2.1 İmmün Sistem Aracılı Spinal Kord Hasarı .....	7
2.2.2 Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu .....	8
2.2.3 Glutamat Eksitotoksitesisi .....	10
2.2.4 Apoptoz.....	11
2.2.5 Akson Demyelinizasyonu .....	12
2.2.6 Vasküler Değişiklikler .....	13
2.2.7 Nörojenik Şok .....	14
2.2.8 Travma Bölgesinde TNF- $\alpha$ Üretimi.....	14
2.3 TRAVMA SONRASI ETKİN MOLEKÜLLER.....	15
2.3.1 HMGB-1, TLR-4, RAGE ve NF- $\kappa\beta$ .....	15
2.3.2 Nrf2 .....	17
2.4 TRAVMA MODELİ .....	18
2.4.1 Genel Bilgiler.....	18
2.4.2 Travmatik SKY Sıçan Modelleri .....	19
2.5 OLEUROPEİN .....	21

### **3 GEREÇ VE YÖNTEM ..... 22**

3.1 DENEY HAYVANLARI .....	22
3.2 ANESTEZİ VE SIÇANLARIN HAZIRLANMASI .....	22
3.3 SKY TRAVMA MODELİ UYGULANMASI.....	22
3.4 DENEY GRUPLARI.....	23
3.5 SAKRİFİKASYON İŞLEMİ VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI.....	24
3.6 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM .....	24
3.7 DNA FRAGMENTASYONUNUN BELİRLENMESİ (TUNEL YÖNTEMİ).....	25
3.8 H-SKOR VE APOPTOTİK İNDEKSİN HESAPLANMASI .....	26
3.9 WESTERN BLOT YÖNTEMİ.....	27
3.10 BİYOKİMYASAL YÖNTEM .....	27
3.10.1 Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS).....	27
3.10.2 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması .....	29
3.11 İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	29

### **4) BULGULAR..... 30**

4.1 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	30
4.1.1 HMGB1, TLR4, RAGE ve NF- $\kappa$ B Düzeyleri .....	30
4.1.2 Nrf2 Düzeyleri .....	32
4.2 DNA FRAGMENTASYONU (TUNEL YÖNTEMİ) BULGULARI.....	33
4.3 WESTERN BLOT BULGULARI.....	34
4.3.1 HMGB1, TLR4 ve RAGE Düzeyleri .....	34
4.3.2 Nrf2 Düzeyleri .....	37
4.3.3 Bax, Bcl-2, Aktif Kaspaz 3, P53 Düzeyleri .....	38
4.4 BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	40
4.4.1 Total Antioksidan Kapasite (TAS), Total Oksidan Seviye (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Bulguları .....	40

### **5) TARTIŞMA ..... 42**

### **6) SONUÇ..... 47**

### **7) KAYNAKLAR ..... 48**

## TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Spinal kord örneklerinde HMGB1, TLR4, RAGE, NF-κB'ya ait H-Skor değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.....

Tablo 2: Spinal kord örneklerinde Nrf2'ye ait H-Skor değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.....

Tablo 3: Spinal kord örneklerinde TUNEL sonuçlarına ait TUNEL-pozitif hücre sayısının ortalama ± standart hata değerleri.....

Tablo 4: HMGB1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri..

Tablo 5: Nrf-2'ye ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.....

Tablo 6: Bax, Bcl-2, Aktif Kaspaz-3 ve P53'e ait western blot değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.....



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: HMGB-1etki mekanizması

Şekil 2: Spinal kord örneklerinde HMGB1, TLR4, RAGE ve NF- $\kappa$ B'nin immünohistokimyasal düzeyleri.

Şekil 3: Spinal kord örneklerinde Nrf2'nin immünohistokimyasal düzeyleri.

Resim 7: Tüm grupların spinal kord örneklerinde TUNEL reaksiyonu.

Şekil 4: Spinal kord örneklerinde TUNEL reaksiyonu.

Şekil 5: Spinal kord örneklerinde HMGB1 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 6: Spinal kord örneklerinde TLR4 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 7: Spinal kord örneklerinde RAGE proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 8: Spinal kord örneklerinde Nrf2 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi..

Şekil 9: Spinal kord örneklerinde Bax proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 10: Spinal kord örneklerinde Bcl2 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 11: Spinal kord örneklerinde kaspaz-3 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 12: Spinal kord örneklerinde P53 proteini anlatımının tüm gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi.

Şekil 13: Serum ve spinal kord örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri.

## RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Sıçanlarda spinal kord travma modeli uygulanması.

Resim 2: Spinal kord örneklerinde sitoplazmik HMGB1 düzeylerinin tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

Resim 3: Spinal kord örneklerinde sitoplazmik TLR4 düzeylerinin tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

Resim 4: Spinal kord örneklerinde sitoplazmik RAGE düzeylerinin tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

Resim 5: Spinal kord örneklerinde nuklear NF- $\kappa$ B düzeylerinin tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.

Resim 6: Spinal kord örneklerinde Nrf2 düzeylerinin tüm gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi.



## KISALTMALAR

**DAMP:** Hasar ilişkili moleküler paternler

**HMGB-1:** High Mobility Group Box-1

**IL:** İnterlökin

**iNOS:** İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

**MAPK:** Mitogen-activated Protein Kinase

**MSS:** Merkezi Sinir Sistemi

**NADP:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

**NF- $\kappa$ B:** Nükleer faktör kappa B

**Nrf2:** Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2

**OLE:** Oleuropein

**OSI:** Oksidatif Stres İndeksi

**RAGE:** Glikasyon son ürünlerinin reseptörü

**RNT:** Reaktif Nitrojen Türleri

**ROT:** Reaktif Oksijen Türleri

**SKY:** Spinal Kord Yaralanması

**TAS:** Total Antioksidan Kapasite

**TLR:** Toll Like Reseptör

**TOS:** Total Oksidan Seviye

**TNF:** Tümör Nekrozis Faktör

## ÖZET

### **Deneyisel Spinal Kord Yaralanmasında Oleuropein'in High Mobility Group Box-1 Aracılığıyla Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Araştırılması**

**Amaç:** Spinal kord yaralanması travmatik yaralanmaların morbidite ve mortaliteye sebep olan önemli sonuçlarından biridir. Geri dönüşümsüz etkiler bırakan primer hasarlanma ve tedaviye dönük çalışmaların esas hedefi olan sekonder hasarlanma olarak sınıflandırılabilir. HMGB-1, sekonder hasara sebep olan enflamasyonun önemli medyatörlerinden biridir. Redoksun aktive ettiği transkripsiyon faktörü Nrf2'nin birçok organ ve hücre tipini toksik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir. Oleuropein'in anti-inflammatuar özelliği bilinmektedir. Çalışmamızda Oleuropein'in deneyisel spinal kord yaralanması modelinde HMGB-1, Nrf2, apoptoz ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırdık.

**Metod:** 250-300 gr, 8-10 haftalık, dişi 24 adet Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Laminektomi grubunda T9-T10 laminektomi, travma grubunda T9-T10 laminektomi sonrası Yaşargil geçici anevrizma klibiyle 30 saniye ekstradural kompresyon, Oleuropein grubunda ekstradural kompresyon sonrası 20 mg/kg Oleuropein 0 ve 1. saatte intraperitoneal uygulandı. 24. saatte sakrifiye edilen sıçanların serum ve spinal kord örneklerinde immünohistokimya ve western blot yöntemleriyle HMGB-1, TLR-4, RAGE, Nrf-2, NF- $\kappa$ B ekspresyonları incelendi. TUNEL yöntemi ile apoptoz ve western blot yöntemiyle Bax, Bcl-2, p53, Aktif Kaspaz-3 düzeyleri bakıldı. Okdisatif stres ve antioksidan mekanizmalar da TAS, TOS, OSI ile değerlendirildi.

**Bulgular:** Travma grubunda, laminektomi grubuna göre HMGB-1 ( $P<0.001$ ), TLR4 ( $P<0.001$ ), RAGE ( $P<0.001$ ) ve NF- $\kappa$ B ( $P<0.001$ ) düzeylerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. OLE grubunda ise HMGB-1 ( $P<0.001$ ), TLR4 ( $P<0.001$ ) ve RAGE ( $P<0.001$ ) düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. Nrf2 antioksidan mekanizmaların önemli bir parçasıdır ve Nrf2 düzeylerinin travma grubunda arttığı ( $P<0.01$ ), OLE grubunda travma grubuna göre daha da yükseldiği belirlendi ( $P<0.001$ ). TUNEL metodu ile değerlendirilen apoptotik hücre sayısının, travma grubunda laminektomi grubuna göre artarken, OLE grubunda travma grubuna göre anlamlı miktarda azaldığı belirlendi ( $P<0.001$ ).

**Sonuç:** Bu çalışmada, oleuropein'in HMGB-1 üzerinden anti-enflammatuar Nrf2 üzerinden antioksidan etki göstererek apoptoz ve sekonder hasarı azalttığı spinal kord ve serum örnekleri incelenerek gösterilmiştir. Bu sonuçlar klinik çalışmalara ışık tutacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Spinal Kord Yaralanması, Oleuropein, HMGB-1, Nrf2, Apoptoz

## ABSTRACT

### **The Effect of Oleuropein via High Mobility Group Box-1 Protein on Apoptosis and Oxidative Stress in Experimental Spinal Cord Injury**

**Objective:** Spinal cord injury is an important result of traumatic injuries which cause morbidity and mortality. It can classify as a primary injury which cause irreversible effects and secondary injury which is the main target of medication studies. Inflammation cause secondary injury and HMGB-1 is an important mediator of inflammation. Protective effect of redox activated transcription factor Nrf2 against toxic injury has shown in many organ and cell type. Oleuropein has known anti-inflammatory features. In our study we investigate the effects of Oleuropein on HMGB-1, Nrf2, apoptosis and oxidative stress in experimental spinal cord injury model.

**Materials and Methods:** Weighing 250-300 g, 8-10 weeks, a total of 24 adult female Sprague-Dawley rats were used for the experiment. T9-T10 laminectomy were made in laminectomy group, after T9-T10 laminectomy 30 second extradural compression with Yasargil temporary aneurysm clip were made in trauma group, after extradural compression 20 mg/kg Oleuropein immediately and first hour of trauma were done intraperitoneally in Oleuropein group. 24 hour after procedure rats were sacrificed. Serum and spinal cord samples HMGB-1, TLR-4, RAGE, Nrf2, NF- $\kappa$ B expression levels analysed by western blot and immunohistochemistry examinations. Apoptosis was evaluated with TUNEL method and Bax, Bcl-2, p53, Aktive Caspase-3 levels analysed by western blot. Oxidative stress and antioxidant mechanisms were evaluated with TAS, TOS, OSI tests.

**Results:** We compared trauma group with laminectomy group and detected HMGB-1 (P<0.001), TLR4 (P<0.001), RAGE (P<0.001) and NF- $\kappa$ B (P<0.001) levels increased significantly after trauma. OLE group HMGB-1 (P<0.001), TLR4 (P<0.001), RAGE (P<0.001) and NF- $\kappa$ B (P<0.001) levels decreased significantly according to trauma group. Nrf2 is an important part of antioxidant mechanisms and Nrf2 levels increased in trauma group (P<0.01). OLE group Nrf2 levels also increased according to trauma group (P<0.001). Apoptotic cell number which evaluated with TUNEL method increased in trauma group according to laminectomy group and it decreased significantly in OLE group according to trauma group (P<0.001).

**Conclusion :** In this study with the investigation of spinal cord and serum samples we have shown Oleuropein has anti-inflammatory effect via HMGB-1 and antioxidant effect via Nrf2

and these result decrease in apoptosis and secondary injury. These results throw light on to clinical studies.

**Key words:** Spinal Cord Injury, Oleuropein, HMGB-1, Nrf2, Apoptosis



## 1)GİRİŞ VE AMAÇ

Spinal kord, merkezi sinir sisteminin (MSS) sinyal ve komutlarını, ekstremiteler ve organlara, periferik sinirler aracılığıyla iletir. Ayrıca doku, organ ve ekstremitelerden gelen uyarıları beyin sapı, serebellum ve serebruma iletir. Spinal kord, bu iletimin iki yönlü olarak bir denge halinde çalışması için çok önemli bir köprü konumundadır. Spinal kord, vücudumuzun en kuvvetli kemik yapılarından olan omurga içerisinde korunsa da gelişmiş teknoloji ve günümüz yaşam tarzı nedeniyle travma riski geçmişe nazaran artmıştır. Gelişmiş medikal ve cerrahi tedavi seçeneklerine rağmen travmaya en hassas, tedaviye en dirençli anatomik yapılarıdır.

Akut spinal kord yaralanması (SKY) travmatik yaralanmaların hem hasta hem hekim açısından çözümü oldukça zor veya imkansız problemler doğuran sonuçlarından biridir. SKY insidansı son yıllarda ekonomik büyümeyle birlikte artmaktadır (1). Birleşik Devletlerde neredeyse milyonda 40 yani her yıl 12.000 civarında yeni vaka görülmektedir. Dünya çapında sıklığı farklı ülkelerde milyonda 12 ile 60 aralığındadır (2, 3). Şu anda Birleşik Devletler’de farklı verilere göre 238.000 ila 332.000 SKY olan insan yaşamaktadır (2). SKY olan hastaların %80’den fazlası erkektir. Klasik olarak genç erişkinlerin hastalığı olarak bilinmekle birlikte, SKY geçirildiğindeki yaş 1970’lerde ortalama 29 civarında iken 2010’da 40 yaş üzeridir (2). En sık yaralanma inkomplet kuadriplejidir(%41) ve bunu inkomplet parapleji (%19), komplet parapleji (%18), ve komplet kuadripleji (%12) takip etmektedir. (2) SKY; hasta ve yakınlarının yaşamlarında oluşturduğu etki, tedavi, bakım giderleri ve iş gücü kaybı nedeniyle ciddi bireysel ve toplumsal etkilere sebep olan bir travmadır.

SKY; travma sırasında olan ve geri dönüşümsüz etkiler bırakan primer hasarlanma ve sonrasında gelişen ve günümüzdeki tedaviye dönük çalışmaların esas hedefi olan sekonder hasarlanma olarak sınıflandırılabilir. Primer hasarlanma; yaralanma sırasında dış etkenlerle akson ve nöronların mekanik olarak parçalanmasıdır. Mekanik darbenin yarattığı ezilme ve kontüzyon, omurilik için gerekli olan kan akımının azalmasına yol açar. SKY’nin akıbeti kalsiyum iyon kanalları, serbest oksijen radikallerinin tetiklediği lipid peroksidasyon, inflammatuar reaksiyon, otoimmün cevap, vasküler olaylar ve apoptozdan oluşan hücresel, moleküler ve biyokimyasal kaskadlar serisinin aracılık ettiği sekonder hasarın boyutuna bağlıdır (4-6).

Akut SKY patofizyolojisi primer ve sekonder yaralanma mekanizmalarını içerir. SKY'deki nörolojik disfonksiyona her iki mekanizma da sebep olmakla beraber araştırmaların çoğu sekonder hasarın patofizyolojisini anlamaya ve SKY'yi takiben oluşan geç hücre kaybını azaltmaya odaklanmıştır. Bu amaçla son 30 yılda pek çok ilaç, hayvan çalışmalarında denenmiş ve bir kısmı etkin bulunmuştur. Etraflıca tanımlanmış yaklaşık 25 sekonder hasar mekanizması vardır. Daha önce yapılan deneysel araştırma ve çalışmalar sekonder hasarda etkin rol alan; serbest radikal üretimi, glutamaterjik, kolinerjik ve katekolinerjik nörotransmisyon sistemleri, kalsiyum ve diğer iyon kanalları, büyüme faktörleri, lipid peroksidasyonu, nörotrofik faktörler, inflamasyon süreci, endojen opioid reseptörleri, enzimler, apoptotik hücre ölümü ve rejenerasyon mekanizmaları ile ilgili olmuştur. Birleşik Devletler ve Avrupa'da klinik deneylerin maliyeti kişi başi 50.000 ila 100.000 \$ arasındadır ve faz 2 preliminar etkinlik deneylerinin projelendirme ücreti ilaç başına 5-10 milyon \$'dan az değildir (7). Bu yüksek maliyetlere rağmen klinikte kullanılabilen tedaviler az bir fayda sağlamaktadır, bundan dolayı günümüzdeki araştırmalar spinal kord tamir ve rejenerasyonu için daha etkili tedaviler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Primer (mekanik) hasar, vasküler, hücrenel ve biyokimyasal olaylar kaskadından oluşan sekonder mekanizmaların yayıldığı bir nidus gibi görev yapmaktadır. Primer hasarın şiddetinin hastanın kabulü sırasındaki nörolojik durumunu büyük oranda belirlediği ve sonuçta en güçlü prognostik indikatör olduğu bilinmektedir.

SKY'de hücrenel ve moleküler yapıların i içe olduğu immün sistem mekanizması görev alır. İmmünitede görevli hücreler ile birlikte proteinler inflamasyona sebep olur. SKY'de inflamasyon, sekonder hasarlanmada rol alır ve birkaç hafta ya da aya kadar devam eder. SKY'deki immün yanıtta başlıca 4 hücre görev alır. Bunlar; nötrofiller, monositler, mikroglia ve T – lenfositlerdir (8). Bu hücreler; proinflamatuvar sitokinler, interlökin (IL) - 1 $\beta$ , IL - 6, tümör nekroz faktör -  $\alpha$  (TNF -  $\alpha$ ) salgılar ve inflamasyonun giderek artmasına sebep olur. İnflamasyon kritik bir süreç olup, kalan nöronların yenilenmesine engel olan kalıntıların temizlenmesini sağlar. Bununla birlikte inflamatuvar reaksiyonun aşırı aktivasyonu, sağlıklı dokuya zarar verip, yaralanma şiddetini arttırabilir. Bu yüzden, inflamasyonun ekzojen kontrolü önemli bir yer tutmaktadır.

Biz bu çalışmamızda anti-inflammatuar ve nöroprotektif özelliği bilinen oleuropein'in SKY sonrası sekonder hasarda önemli etki mekanizmalarından olan HMGB-1 ve Nrf2 proteinlerine ve apoptoza etkisini inceledik.

## **2)GENEL BİLGİLER**

### **2.1 SPİNAL KORD YARALANMASI**

#### **2.1.1 Tanım, Epidemiyoloji**

Akut SKY patofizyolojisi primer ve sekonder yaralanma mekanizmalarını içerir. SKY'deki nörolojik disfonksiyona her iki mekanizma da sebep olmakla beraber araştırmaların çoğu sekonder hasarın patofizyolojisini anlamaya ve SKY'yi takiben oluşan geç hücre kaybını azaltmaya odaklanmıştır. Etraflıca tanımlanmış yaklaşık 25 sekonder hasar mekanizması vardır. Birleşik Devletler ve Avrupa'da klinik deneylere kayıt ücreti kişi başı 50.000 ila 100.000 \$ arasındadır ve faz 2 preliminar etkinlik deneylerinin projelendirme ücreti ilaç başına 5-10 milyon \$'dan az değildir (7). Bu yüksek maliyetlere rağmen klinikte kullanılabilen tedaviler az bir fayda sağlamaktadır, bundan dolayı günümüzdeki araştırmalar spinal kord tamir ve rejenerasyonu için daha etkili tedaviler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Primer (mekanik) hasar, vasküler, hücrenel ve biyokimyasal olaylar kaskadından oluşan sekonder mekanizmaların yayıldığı bir nidus gibi görev yapmaktadır. Primer hasarın şiddetinin hastanın kabulü sırasındaki nörolojik durumunu büyük oranda belirlediği ve sonuçta en güçlü prognostik indikatör olduğu bilinmektedir.

#### **2.1.2 Spinal Kord Yaralanmasının Evreleri**

İlk darbe travma bölgesinde hemen kanama ve hızlı hücre ölümüne sebep olur, bunu çoklu sekonder hasar kaskadlarının sebep olduğu doku kaybı ve disfonksiyonu takip eder.

Spinal kordun primer hasarının 4 morfolojik tipi vardır;

1. Darbe ile kalıcı kompresyon
2. Darbe ile geçici kompresyon
3. Distraksiyon
4. Laserasyon ya da transeksiyon

Morfolojik hasar kordun yerleşik hücrelerine sadece ani hasar vermez ayrıca orijinal travmadan sonra hayatta kalan hücrelerin geç hasar ve ölümlerine de sebep olur. SKY'de biyolojik cevap birbiri içine geçen akut, sekonder ve kronik olmak üzere 3 fazdan oluşur.

Akut fazda, primer hasar travmanın direkt etkisiyle oluşur ve ani fiziksel ve biyokimyasal hücrel değişikliklere sebep olur. Lokal olaylarla olduğu kadar sistemik etkilerle de saniyeler içinde gelişir (9). Bunlar sistemik hipotansiyon, spinal şok, vazospasm, iskemi, plasma membran hasarı, iyonik homeostaz ve nörotransmitterlerin birikimindeki dengesizliklerdir. Her fazda sinir, immün ve vasküler sistemlerden farklı grupta hücre ve moleküller bulunmaktadır.

### **2.1.3 Sekonder (Subakut) Faz**

Sekonder mekanizma hasarlanmadan dakikalar sonra başlar ve haftalar veya aylarca devam eder (10). Bu faz sırasında travma alanı belirgin şekilde genişler. Sekonder fazda akut fazdaki elektrolit şifti, ödem ve nekrotik hücre ölümü gibi olaylar devam ederken serbest radikal oluşumu, gecikmiş kalsiyum inflaksi, immün sistem cevabı, enflamasyon ve apoptotik hücre ölümü gibi yenileri eklenir.

## **2.2 SPİNAL KORD YARALANMASI PATOFİZYOLOJİSİ**

### **2.2.1 İmmün Sistem Aracılı Spinal Kord Hasarı**

Hasarlanmış kordda immün hücreler ve düzenleyici proteinlerin toplam etkisi inflamasyondur. İnflamasyon sekonder hasarlanma kaskadında anahtar role sahiptir, SKY'yi takiben hemen başlar ve haftalar veya aylarca devam eder. İmmün hücreler inflamasyonun yaygınlığını artıran IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılar. İnflamatuvar cevap hayatta kalan nöronların rejenerasyonunu önleyebilen hücrel enkazın temizlenmesinde kritiktir. Bununla birlikte inflamatuvar cevabın aşırı aktivasyonu sağlıklı dokuya zarar verebilir ve hasarı ağırlaştırabilir. İmmün sistemin SKY'deki rolü tartışmalıdır. Bununla birlikte kontrolsüz immün sistem aksonal büyümeyi inhibe eder ve hücre ölümüne sebep olur, net fayda sağlaması için immün sistemin eksojen kontrolü gerekmektedir (11). MSS'nin doğal immün hücreleri zaman ve duruma bağlı olarak çeşitli fonksiyonları olan yerleşik mikroglialardır. Hasarlanmış spinal kordda kan kaynaklı monositler (makrofajlar) yerleşik mikroglialardan farklı etkilere sahiptir. Hayvan modeli ve hastalarda SKY'nin hiperakut fazında verilen yüksek doz steroid tedavisinin faydalı etkilerine dair yayınlar immün hücre aktivitesine negatif bakışı desteklemektedir (12). SKY'yi takiben deneysel makrofaj sayısının azaltılması veya nötrofil infiltrasyonunun engellenmesinin yararlı sonuçları gösterilmiştir (13, 14). Bu ve benzeri çalışmaların aksine, MSS'deki immün hücrelere atfedilen negatif şöhretin tersine, son 10 yıldaki bazı çalışmalar iyi kontrol edilmiş



doğal ve edinilmiş immün cevabın tamir mekanizmalarının merkezinde yer aldığını göstermiştir (15-17). SKY sonucu oluşan inflamasyon dört immün hücre tipini bölgeye çekmektedir: nötrofiller, monositler, mikroglia ve T-lenfositler. Hasarlanan bölgeye gelen ilk immün hücreler nötrofillerdir. Spinal dokudaki nötrofiller mikrobiyal etkenler ve doku kalıntılarını uzaklaştırır.

Nötrofiller ayrıca inflamatuvar hücreleri ve glial hücreleri aktive eden ve nöron hasarı ve ölümüyle sonuçlanan kaskadı sitokin, proteaz ve serbest radikalleri salgılar. Endotel hücre yüzeyinde nötrofil adhezyonunun inhibisyonunun kompresif travmanın tetiklediği SKY'nin şiddetini belirgin azalttığı gösterilmiştir (18). Mekanik hasarlanmadan kısa bir süre sonra monositler spinal korda infiltre olur ve makrofajlara farklılaşır. Aktive olmuş yerleşik mikroglia ve makrofajlar yakınındaki hücreleri pozitif veya negatif yollarla etkileyen çeşitli sitokinler, serbest radikaller ve büyüme faktörlerini salgırlar (19, 20). Büyüme faktörleri nöronların sağkalımı ve doku tamiri için kritik öneme sahiptir. Bununla birlikte serbest radikaller ve pro-inflamatuvar sitokinler hasarlanmanın etkisinin kötüleşmesine ve lezyonun genişlemesine katkıda bulunur. Lenfositlerin spinal kord hasarlanmasındaki rolü oldukça tartışmalıdır. Bazı çalışmalar otoreaktif T lenfositlerin demyelinizasyonu tetikleyerek akson hasarını ve fonksiyonel kaybı artırıcı özellikleri olduğunu göstermiştir (21). Diğerleri lenfositlerin patolojik olmadığını, myelinle sarılı nöronların korunmasını sağladığını söylemektedir (22, 23). Myelinin korunması myelinle sarılı aksonun bütünlüğünün korunmasını da sağlamaktadır. Hasarlanmış spinal kordda kontrolsüz immün sistem inflamasyon ve serbest radikal aracılığıyla geniş bir etki sahasına sahiptir. İmmün sistemin net fayda sağlayabilmesi için ekzojen kontrol şarttır.

### **2.2.2 Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu**

Serbest radikaller en dış kısmında serbest elektronu bulunan kimyasal bileşiklerdir. Bu elektron oksidasyon esnasında başka bir biyolojik moleküle kolaylıkla transfer edilebilir. Bu özellik serbest radikal moleküllerini fazlasıyla reaktif yapar. Dokularda meydana gelen reaktif oksijen türleri (ROT) ve serbest radikaller DNA, protein, karbonhidrat ve lipidler gibi biyolojik açıdan önemli materyallere zarar verebilmektedir. Serbest radikaller vücut dışından gelebileceği gibi insan metabolizmasının doğal bir sonucu olarak da oluşabilmektedir. Serbest radikallerin endojen olarak üretimi farklı yollarla gerçekleşmektedir. ROT oluşumu aerobik çevrede yaşamın kaçınılmaz sonucudur. Mitokondriyal enerji metabolizması çoğu ökaryotik hücre tipinde miktar olarak en önemli ROT kaynağını oluşturmaktadır, mitokondriyal elektron transport zinciri fizyolojik koşullarda

dahi elektron sızdırmaktadır (24). Moleküler oksijen mitokondriyal elektron transport zincirinin son elektron alıcısıdır. Bir elektron aldığıında O<sub>2</sub>'den süperoksit anyonu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hidroksil radikali (OH) ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gibi indirgenmiş moleküller olan ROT'ler oluşturulur.

Mitokondrideki elektron transport zincirinin yanında ksantin oksidaz, nitrik oksit sentaz ve sitokrom P450 gibi diğer enzimler de metabolik ara ürün olarak reaktif ürünler üretir. Ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidazlar birincil fonksiyon olarak ROT üretir.

İskemik dokularda hücreye kalsiyum inflaksının artması birçok enzimin aktivasyonuna sebep olur. Bunlardan biri de ksantin dehidrogenaz alt ünitelerinden 15-20 kDa'luk parçalar ayıran ve böylece enzim metabolizmasını oksidaz formuna değiştiren proteazdır. Bunun sonucu olarak oksijene elektron transferiyle ROT üretilir (25).

Buna karşılık, canlı organizmalar serbest radikallerin potansiyel yıkıcı etkilerine karşı kendilerini korumak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Serbest radikallerin neden olduğu oksidasyonları önleyen, serbest radikalleri yakalama ve stabilize etme yeteneğine sahip maddelere "antioksidan" adı verilir. Fizyolojik olarak doğal antioksidanlar ile serbest oksijen radikalleri radikal formasyonlarını kaybederler. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasındaki bu etkileşim normal fizyolojinin bir parçasıdır ve serbest oksijen radikallerinin üretimi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Travma gibi iskemi yaratan olaylarda serbest oksijen radikallerinin üretimi artmaktadır.

Fazla miktarda oluşan serbest radikallerin patolojik etkisiyle iki yoldan hücre hasarı gelişir;

1-Lipidlerin peroksidasyonu sonucu hücre membranının geçirgenliği bozulur,

2-Oluşan serbest radikaller diğer biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek hasar oluşturur. Reaksiyona girdikleri biyolojik moleküller arasında; çeşitli enzimlerin yapısına giren proteinler, hücre membranı, hücre organellerinde bulunan doymamış yağ asitleri, karbonhidratlar ve çeşitli protein sentezi ve genetik kod aktarımını yöneten nükleik asitler yer alır (26). Normal şartlarda doğal savunma mekanizmaları tarafından nötralize edilen serbest radikallerin fazla miktarda oluşması travma sonrası nöronların dejenerasyon ve ölümünde önemli bir rol oynar (27). Bu moleküller çeşitli yollar üzerinden oluşmaktadır. Bu yollar araziidonik asit metabolizması, mitokondriden kalsiyum nedenli çıkış, ksantin

oksidaz aktivasyonu, ekstrasvaze hemoglobin bozukluğu ve katekolaminin otooksidasyonudur. Araşidonik asit yolu, travmatik hasar sonucu artan serbest radikallerin en etkin kaynağıdır. Eksitatör aminoasitlerin hücre dışına çıkmasının neden olduğu kalsiyumun hücre içine girişi ile proteazlar ve lipazlar aktive olur fosfolipaz A2, lipooksijenaz ve siklooksijenaz). Sonuç olarak, aktifleşen bu enzimler ile araşidonik asit; tromboksan A2, prostaglandinler, lökotrienler ve serbest aminoasitlere dönüşür. Bu bozulma ürünleri ise serbest oksijen radikalleri üretir (28).

Hücre membranında oksidasyona duyarlı ve doymamış yağ asitleri fazla olan fosfolipidler bulunur. Serbest radikaller, oksijen varlığında doymamış yağ asitlerinin çift bağlarını kırarak zincirleme bir reaksiyon meydana getirirler ve bunun sonucunda hücre zarının stabilizasyonu bozulur, permeabilite etkilenir, membran potansiyeli oluşturabilme yeteneği bozulur. Hücre içinde fazla miktarda kalsiyum birikir ve hücre ölümü olur (29).

SKY sonrası erken dönem patolojik süreçlerden birisi de ROT ve reaktif nitrojen türlerinin (RNT) oluşmasıdır. Bu durum intrasellüler kalsiyum düzeylerinin artışı, mitokondriyal disfonksiyon, araşidonik asit yıkımı ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) aktivasyonunun sonucudur (30, 31). ROT ve RNT protein ve nükleik asitlere oksidatif ve nitratif hasar vermenin yanında lipid peroksidasyonuna da sebep olurlar. Serbest radikaller nöron kaybına neden olan hücre membranı lizisi dışında hücre iskeleti ve organel hasarına da neden olurlar. Lipid peroksidasyonunda serbest radikaller lipid molekülünden elektron absorbe eder ve daha kararsız bir moleküle dönüştürür böylece membran lizisi ve nekroz ile sonuçlanan reaksiyonları başlatır. ROT ve RNT'den kaynaklanan kollektif hasar SKY sonrası nekroz, apoptoz ve fonksiyon kaybında önemli bir etkidir.

### **2.2.3 Glutamat Eksitotoksitesisi**

Glutamat MSS'nin majör eksitatör nörotransmitteridir. Spinal kordda travmanın hemen sonrasında ekstrasellüler glutamat düzeyleri travma bölgesi ve çevresinde artmaktadır ve direkt, indirekt kord hasarına sebep olmaktadır (32). İndirekt etkiyi ROT ve RNT oluşumu, mikrodolaşım değişiklikleri ve sekonder iskemi ile kalsiyum inflaksı üzerinden göstermektedir (33, 34). Kalsiyum inflaksı nekroz veya apoptoz ile nöron ölümüne sebep olmaktadır ve eksitotoksik hücre ölümü olarak bilinmektedir (34). Nöronlar ve oligodendrositler çok miktarda glutamat reseptörü eksprese ettikleri için glutamat eksitotoksitesisine daha duyarlıdır. Travma bölgesindeki oligodendrosit ve nöronların eksitotoksik hasarı aksonların demyelinizasyonu ve nöron kaybı ile sonuçlanır. Böylece beyin

ile hasarlanan spinal segmentin aşağısı arasındaki iletim ciddi miktarda azalır veya tamamen kaybolur ve motor ve duyuşal defisite sebep olur. Glutamat eksitotoksitesisi ciddi fonksiyonel sonuçlar doğurur. Bundan dolayı glutamat reseptör blokajına dönük çalışmalar yapılmaktadır.

#### **2.2.4 Apoptoz**

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Apoptoz genel olarak hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, genlerle düzenlenen, programlı, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinim duyan, organizmada homeostazı koruyan bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı ve fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile aynı anlamda kullanılan terimlerdir. İlk zamanlarda hücre ölümünün sadece fizyolojik formu olduğu düşünülmesine rağmen günümüzde patolojik hücre ölümüne de aracılık ettiği bilinmektedir.

Nöronlar bölünemeyen dolayısıyla çoğalamayan hücrelerdir. Yenilenemediklerinden dolayı ömür boyu yaşarlar. Oysa Alzheimer, Parkinson, Huntington koresi gibi nörodejeneratif hastalıklarda apoptozis süreci tetiklenerek nöronların öldüğu bilinmektedir (35). Ayrıca iskemi-reperfüzyon hasarı gibi çeşitli yaralanmalar sonucu meydana gelen hasarlarla dokulara yeterli besin sağlanamayabilir. Bu durumda hücreler apoptozise gider ve hasar devam ettikçe apoptozisin hızı artar ve hücre geri dönüşümsüz bir yola girer (36).

Memeli hücrelerinde başlıca iki apoptozis yolu tanımlanmıştır;

##### **a) Fas/TNF-R reseptör yolu (Ekstrinsik yol)**

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF- $\alpha$ , TRAIL) bağlanması sonucunda reseptörler trimerik yapı kazanır. Trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Death inducing signaling complex) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'den aktif kaspaz-8'in oluşması sağlanır. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder ve apoptoz başlar. Ya direkt kaspaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da dolaylı olarak intrinsik mekanizma ile kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 DNA fragmentasyonuna neden olur. Fas ve TNF- $\alpha$  dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (37-39).

## **b)Mitokondriyal yol(instrinsik yol)**

Büki ve ark. tarafından aksonlarda mitokondri iç zarından sitokrom c salınımı tanımlanmıştır (40). Mitokondri iç zarından sitozole salınan sitokrom c, apoptozisin mitokondriyal yolunu başlatır. Sitozoldeki sitokrom c; apoptozis aktive edici faktör-1, kaspaz-9 ve deoksiadenozintrifosfata bağlanır ve sırasıyla; kaspaz-3 aktivasyonuna, daha sonra poli ADP-riboz polimeraz gibi substratından ayrılmasına, endonükleazların aktivasyonuna ve son olarak DNA'nın yıkılmasına yol açar. Bu nedenle mitokondriden sitokrom c salınımına yol açan mekanizmaların aydınlatılması akut kafa travmasında apoptozis mekanizmalarının anlaşılmasında önemlidir (41).

Hücrede herhangi bir nedenle (radyasyon, kemoterapi) DNA hasarı oluştuğunda eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusu G1 fazında durdurulur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırılır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir ve bu gen DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse hücre siklusundaki blok kalkar (42). Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (pro-apoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (36, 42).

Bir hücrede hücre içi bcl-2/bax oranı hücrenin apoptozise gidip gitmeyeceğine karar vermede son derece önemlidir. Eğer bax (proapoptotik gen) fazla ise hücre apoptozise gidecektir, bcl-2 (antiapoptotik gen) fazla ise apoptozis inhibe olacaktır (43). Son yıllarda, kafa travması sonrası nöral hücre ölümünden P53'e bağımlı apoptozis mekanizmasının sorumlu olduğu yönündeki araştırmalar mevcuttur (44).

SKY sonrası nöron, oligodendrosit, mikroglia, ve astrositlerdeki apoptotik kaskad aktive olabilir. Esas tetikleyici hasarın indüklediği hücre içine kalsiyum akınıdır. Kalsiyum inflaksı hücre membranı, iç iskeleti ve proteinlerini yıkan anahtar role sahip kaspasları aktive eder ve hücre ölümüne sebep olur. SKY bölgesinin santimlerce uzağında apoptoz görülebilir ve bu mesafe kalsiyum difüzyonu için çok fazladır (45). Bu durumun sitokinler, enflammatuar hasar, serbest radikal hasarı ve eksitotoksiteden kaynaklandığına inanılmaktadır (33).

### **2.2.5 Akson Demyelinizasyonu**

İlk travma sonrası hayatta kalan aksonların demyelinizasyonu glutamat eksitotoksitesinin tetiklediği oligodendrosit ölümünün sonucudur. Apoptoz, serbest radikal

hasarı, proinflatuar sitokinler bu durumu artırır. Demyelinizasyon lezyon bölgesinde travma sonrası saatler içinde gelişen, lezyonun rostral ve kaudalinde ise haftalarca devam eden oligodendrosit kaybının sonucudur (46, 47). Demyelinizasyon SKY sonrası subakut kronik dönemde etkili olmaktadır ve myelin kaybıyla çıplak kalan aksonlar serbest radikal hasarı ve enflamatuar sitokinlerin etkisine açık hale gelmektedir. Böylece nekroz ve apoptoz ile hücre kaybı görülmektedir. Demyelinizasyon iletimin yavaşlaması veya blokajına da sebep olur. Dolayısıyla oligodendrosit ölümünün sonucu olan nöron kaybı ve demyelinizasyon travmatize korddaki hasarı arttırmakta ve tedavi potansiyelini sınırlandırmaktadır.

### **2.2.6 Vasküler Değişiklikler**

SKY'de lokal vasküler değişiklikler, özellikle gri maddede görülen kanama ve iskemi/reperfüzyon, sekonder hasarlanmanın önemli nedenlerinden biridir. Mekanik etki ile mikrodolaşımdaki bozulma, peteşiyal kanamalara ve damar içi tromboza sebep olur. Travmatize spinal kordda özellikle gri maddede görülen kanamalar hasar bölgesinde hemorajik nekroz ve sonuç olarak santral myelomalazi oluşumuna sebep olur. Hayvan ve insan çalışmaları büyük arterlerin travma sonrası sağlam kaldığını asıl hasarın lezyon bölgesindeki mikrodolaşımla (özellikle kapiller ve venüller) ilgili olduğunu göstermiştir. Yapılan otopsi çalışmalarında gri maddenin perfüzyonunun, beyaz maddeden daha kötü olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak; gri maddenin beslenmesinde görev yapan sulkal arterlerin, tromboz nedeniyle işlevini yerine getirememesi gösterilmiştir (48). Gri maddede bulunan nöronlar, yüksek metabolik ihtiyaçları nedeniyle, iskemiye, oldukça duyarlıdır (49). SKY'den hemen sonra lezyon bölgesinin kan akımında ciddi azalma görülür. Bu iskemi ilk saatlerde gitgide kötüleşir. İskeminin altında yatan mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Mekanik hasara veya vazoaaktif aminlere sekonder gelişen vazospasm bir miktar sorumlu olabilir. Kanamalar iskemiye veya trombosit agregasyonu sonucu tromboz oluşumuna katkıda bulunabilir. Travma sahasında sıvı birikimi korda zararlıdır (50). SKY sonrası mikrodolaşım kaybı, küçük damarların yırtılması ve kanama, otoregülasyonun bozulması, glutamat aracılı eksitotoksiste ve iskemi travmanın şiddeti arttıkça kötüleşir. Direkt travmadan kaynaklanan mikrodolaşımdaki bozukluklara iskemi-reperfüzyonun tetiklediği endotel hasarı eşlik etmektedir (51). İskemi-reperfüzyonun tetiklediği endotel hasarının serbest radikaller ve toksik ürünler nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Endotel hasarı sonrası damar geçirgenliği ve ödem oluşumu artmaktadır (50).

### 2.2.7 Nörojenik Şok

Nörojenik şok kan damar duvarının kas tonusunu sağlayan sempatik sinir sistemi sinyallerinin ani kaybıyla karakterize vücuda yetersiz kan akışına sebep olan ve hayatı tehdit eden bir şok tipidir. SKY nörojenik şok ile sonuçlanabilir. Nörojenik şok T6 ve üzeri spinal kord yaralanması olan hastalarda hasar oluşumu sırasında sempatektomi gelişmesi ve böylece sempatik sinir sisteminin supraspinal kontrolünün kaybolması nedeniyle gelişmekte ve önemli bir rol oynamaktadır. Kontrol edilemeyen nörojenik şok tablosu kord hasarını daha da arttırabilir. Nörojenik şokun sistemik etkileri spinal kord ve diğer organların iskemisini içerir (33). Klasik triadı; hipotansiyon, bradikardi ve hipotermidir. SKY'de meydana gelen hipotansiyonun; sempatik tonusun kaybı ve periferik vasküler direncin düşmesi nedeniyle olduğu bilinmektedir. Yüksek kord lezyonu sonrası bradikardi kalbin sempatik tonusunun kaybolmasından dolayı vagal tonusun karşılanmamış etkisinden kaynaklanır. Endobronşial negatif basınç ve hipoksi ile bradikardi şiddetlenir. Meydana gelen bu kaskad; sinir dokusu hasarını daha da arttırarak önemli bir mortalite ve morbidite sebebi olarak karşımıza çıkar. Evrensel bir tanımlama olmamakla beraber; spinal travma sonrası, belirgin başka bir neden olmaksızın sistolik kan basıncının < 100 mmHg ve kalp hızının < 80 atım / dk olması ya da tek başına sistolik kan basıncının < 90 mmHg olması, nörojenik şok olarak kabul edilir (52).

### 2.2.8 Travma Bölgesinde TNF- $\alpha$ Üretimi

TNF- $\alpha$  en iyi tanımlanmış sitokinlerden biridir. Bu güne kadar MSS'de akut hasarlanma sonrası endojen TNF- $\alpha$ 'nın rolü ile ilgili net bir konsensüs sağlanamamıştır. Çalışmalar güçlü bir şekilde SKY sonrası travma bölgesinde TNF- $\alpha$  üretiminin sekonder doku hasarına katkıda bulunduğunu göstermektedir (53). Spinal kord hasarı yapılan sıçanlarda travmanın 30. dakikasında hasarlanan bölgede TNF- $\alpha$  düzeylerinde artış olduğu ve travmanın şiddeti ile TNF- $\alpha$  düzeyleri arasında doğru orantı olduğu gösterilmiştir (54). Lökositopenik sıçanlarda travma bölgesinde TNF- $\alpha$  düzeylerinin artmadığı ve travma sonrası gelişen motor bozukluğun azaldığı gösterilmiştir (51). Bununla birlikte güncel çalışmalardan birinde TNF- $\alpha$ 'nın hasarlanmanın fazına göre ikili role sahip olduğu, SKY sonrası TNF- $\alpha$  aşırı ekspresyonunun akut fazda zararlı, kronik fazda ise yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (55). Nöronal ve glial hücrelerde TNF- $\alpha$  reseptörlerinin yerleşim paternindeki farklılıklar, aktivasyon durumları ve etkileyen faktörlerin MSS'de TNF- $\alpha$ 'nın yararlı veya zararlı etki göstermesini belirlemede önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (56). Ek olarak TNF- $\alpha$  nötrofilleri aktive ederek ve aktive nötrofillerin endotel yüzeyine tutunmasını sağlayan E-selektin gibi moleküllerin ekspresyonunu arttırarak doku hasarına sebep olur (57).

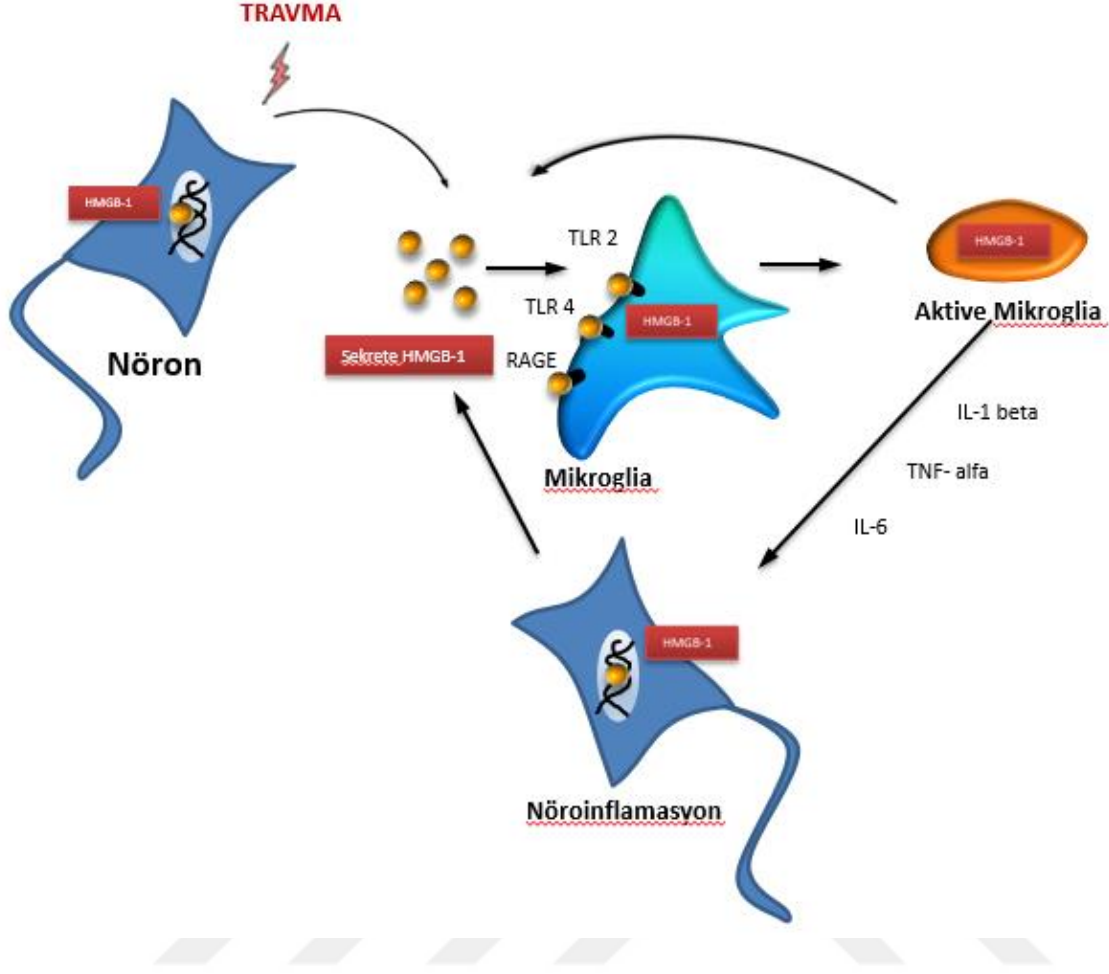
## 2.3 TRAVMA SONRASI ETKİN MOLEKÜLLER

### 2.3.1 HMGB-1, TLR-4, RAGE ve NF- $\kappa$ B

HMGB-1 HMGB ailesinin (HMGB 1,2,3 ve 4) bir üyesidir. HMGB-1 25-30 kDa molekül ağırlığında, 215 aminoasit, 3 parça ve 2 DNA bağlanma bölgesine sahip iyi korunmuş bir non-histon nükleer proteindir (58). 3 parça olan HMGB A box (9-79 aa), B box (95-163 aa) ve C-terminal asidik kuyruktan (186-215 aa) oluşmaktadır (59). Normal organlarda hücreleri hasardan koruyan bir faktör olarak rol oynamaktadır. Nükleer HMGB-1 DNA'nın minör oluşuna bağlanır ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile nükleozomların stabilizasyonunda rol oynar (60).

HMGB-1 vertebralıların hemen her hücresinde eksprese edilen, çekirdekte yapısal olarak bulunan ve salgılandığında inflamatuvar etkiler gösteren bir proteindir. Erken beyin gelişimi sırasında MSS'nin kompleks zamansal ve uzaysal dağılımında rol oynar. Ön beyin gelişimi gibi süreçlerde kritik önemi olan nörit gelişimi ve hücre göçünü kolaylaştırır. Erişkin dönemde HMGB-1 spinal kord ve beyin lezyonlarında hasarlanma sonrası nöroinflamasyonu tetiklemeye yarar. HMGB-1 çekirdekte DNA'yı büker ve diğer nükleer proteinlerin montajını kolaylaştırır (61). HMGB-1 nekrotik hücrelerden, virüs veya mikobakteri ile enfekte hücrelerden pasif olarak salınabilir. Endojen veya ekzojen uyaranlara cevap olarak doğal immün hücrelerden ise aktif olarak salınabilir. HMGB-1 inflamatuvar faktör olarak monosit, makrofaj, astrosit ve nöronlar gibi farklı hücrelerden salgılanabilir (62). HMGB-1 RA, SLE, hepatik iskemi ve reperfüzyon hasarı ve nefrit gibi birçok hastalıkta TLR-2, TLR-4, TLR-9 ve RAGE gibi reseptörler üzerinden hücrelerel sinyal iletişiyle inflamatuvar cevabı tetikler (63). HMGB-1 düzeyleri insanlarda ve hayvanlarda ciddi sepsis durumunda belirgin artmıştır ve HMGB-1 spesifik antikörlerin kullanımı sepsisten ölümü önlemektedir (64). Birçok akut ve kronik hastalık artmış HMGB-1 düzeyleri ile karakterizedir ve bu durum inflamasyon ve doku hasarı ile ilişkilidir. Ayrıca HMGB-1 beyin, kalp, karaciğer, akciğer, gastrointestinal sistem, eklemler ve kan damarları hastalıklarının patogenezinde katkı sağlamaktadır ve anti-HMGB-1 etkili maddeler fayda sağlamaktadır (64, 65). HMGB-1 ekstrasellüler alana salındığında membran reseptörleri üzerinden inflamatuvar cevabı aktive eden endojen faktörlerden olup 'alarmin' ailesine dahil edilen özgün bir inflamatuvar sitokindir, hücre göçü ve çoğalmasında rol oynar (66).





Şekil 2: HMGB-1 etki mekanizması

Nörodegeneratif hastalıklarda endojen HMGB-1 düzeylerinde artış görülür. HMGB-1'in Huntington hastalığında bazı enzimleri aktive ederek koruyucu etki gösterdiği rapor edilmekle birlikte Alzheimer, Parkinson ve MS gibi diğer nörodegeneratif hastalıklarda hafıza kaybı, kronik nörodegenerasyon ve nöroinflamasyon gelişimine katkı sağlar. HMGB-1 nöral gelişim ve nörodegenerasyon sırasında önemli ve çift yönlü bir rol oynar.

HMGB-1 steril inflamasyona (travma, iskemi, otoimmünite ve kanser) cevaben hücrelerin herhangi bir bölümünden kaynaklanan strese maruz kalmış hücrelerden salgılanan veya ölü/ölmekte olan hücrelerden salınan hasar ilişkili moleküler paternler (DAMPs) denilen heterojen bir grup molekülün en iyi tanımlanmış üyesidir. DAMPs ekstrasellüler alana salınır ve homeostazı yeniden sağlamak amacıyla tehlikeli duruma karşı immün sistemi uyarır. Böylece intrasellüler DAMPs fizyolojik fonksiyonlarını yerine getirir ve immün sistem

tarafından algılanamaz, ekstrasellüler DAMPs ise tehlike sensörü olarak görev yapar ve immünstimülatör moleküldür (67, 68).

Son zamanlarda spinal kord kompresyon hasarı olan kemirgenlerin spinal cord dokularında HMGB-1 düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiş olup bu durum nöronal hücre apoptozu ile ilişkilidir (69, 70). Spinal kord iskemik hasarı olan kemirgenlerde hem doku hem serum HMGB-1 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (71, 72). Melatonin, etil pirüvat, hidrojen gazı ve hiperbarik oksijenin SKY olan kemirgenlerde HMGB-1 düzeylerini azalttığı, motor disfonksiyonu düzelttiği ve motor nöron apoptozunu azalttığı bulunmuştur (69, 71, 72). Önceki çalışmalarda geçici serebral iskemi olan sıçanlarda HMGB-1'in nöral hücrelerde apoptozu direkt olarak indüklediği, enfarkt volümü ve nörolojik defisiti arttırdığı gösterilmiştir (73, 74). SKY sonrası gecikmiş nöronal hücre ölümünün apoptoz ile olduğu bilinmektedir (71, 72, 74). Apoptozun inhibisyonu nörolojik düzelmeye sağlamaktadır (71, 72, 74). Bu nedenle birçok akut ve kronik hastalıkta olduğu gibi SKY'de de HMGB-1 inhibisyonunun özgün bir tedavi stratejisi olacağı beklenmektedir.

### **2.3.2 Nrf2**

Oksidatif stres MSS'nin akut yaralanmaları, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok akut ve kronik hastalığın patofizyolojisinde rol oynar. Redoksun aktive ettiği transkripsiyon faktörü Nrf2'nin birçok organ ve hücre tipini toksik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir. İnflamasyon, SKY sonrası ikincil hasarın patogenezinde önemli bir rol oynar. Daha önceki çalışmalar, çeşitli deneysel modellerde Nrf2'nin inflamasyonun düzenlenmesinde anahtar rol oynayabileceğini düşündürmektedir (75). Nrf2 ayrıca, antioksidan yanıt elementi aktive edici transkripsiyon faktörü olarak rol oynar ve antioksidan genlerin anlatımını tetikler. SKY sonrası, Nrf2-antioksidan yanıt elementi yolu spinal kordda devreye girer (76).

Öte yandan birçok kanserde kontrolsüz Nrf2 aktivitesi sitoprotektif genlerin ekspresyonunu artırır ve sonuç olarak kanser hücrelerinin büyümesini sağlayabilir. Nrf2'nin koruyucu etkisi Alzheimer'ın da aralarında bulunduğu birçok MSS hastalığında gösterilmiştir (77). Çalışmaların verileri topluca değerlendirildiğinde Nrf2'nin yapısal aktivasyonu büyük oranda mutasyonlar sonrası Keap 1 fonksiyon kaybı veya Nrf2 gen mutasyonu sonrası aktivasyon artışı ile ilişkili olmakla beraber başka mekanizmalar da bulunmaktadır (78). Bu yüzden Nrf2 ekspresyonunu arttırmak veya azaltmak için Keap1-Nrf2 sistemini hedefleyen farmakolojik çalışmalar yapılmaktadır.

ROT kanserin başlangıç ve ilerleyişinde önemlidir (79). Nrf2 oksidatif ve ksenobiyotik hasara cevaben birçok sitoprotektif geni düzenlediği için geleneksel olarak kanser önleyici transkripsiyon faktörü olduğu düşünülmüştür ve Nrf2'yi aktive eden ürünlerin kanser önleyici etkileri çalışılmıştır (80). 2006 yılında akciğer kanseri hücre serilerinde ve hasta örneklerinde kalıcı Nrf2 hiperaktivasyonu bulunmasıyla Nrf2'nin onkolojik rolü keşfedilmiştir (81). Nrf2 aktivitesinde artış daha sonra diğer kanser tiplerinde de bulunmuştur. Nrf2, Keap 1 genindeki mutasyonlar, epigenetik mekanizmalar ve Keap 1 Nrf2 arasındaki bağlanmayı bozan çeşitli proteinler Nrf2 aktivasyon artışına sebep olabilir. Nrf2 aktivasyonu KT, RT direncine sebep olur ve kanser hücrelerinin metabolik yeniden programlamayla apoptozdan kaçıp hızlı proliferasyonunu sağlar. Dolayısıyla Nrf2 hiperaktivitesi olan kanser hastaları çoğu zaman kötü prognoza sahiptir (78).

Akut ve kronik MSS hastalıklarında Nrf2 fonksiyonunu artırma endojen korumayı arttıran ortak tedavi stratejisidir. Epo ve melatonin Nrf2-ARE yolağı aktivitesini artırır ve nörolojik hastalıklarda faydalı etkiler sağlar. Tanımlanan Nrf2 aktivatörlerinin birçoğu kan beyin bariyerini geçemez ve bu onların MSS hastalıklarında kullanımını sınırlar (82).

## **2.4 TRAVMA MODELİ**

### **2.4.1 Genel Bilgiler**

SKY'den muzdarip hastalar için tedavi bulmak maksadıyla birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar planlanırken insanda meydana gelen travmayı taklit etme ihtiyacı doğmuştur. Birçok travma modeli olmakla beraber travmatik SKY ile bütün yönleriyle benzeşen özel bir model yoktur. Modellerin belli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır ve çalışmanın hedefine göre uygun model seçilmelidir. Bunge ve arkadaşları hasarlanmış insan spinal kordu üzerinde yaptıkları görüntüleme ve histoloji temelli araştırmada travmatik SKY'yi 1-) kavite oluşumuyla sonuçlanan kontüzyon 2-) masif kompresyon 3-) laserasyon olarak sınıflandırmışlardır (83, 84). Kontüzyon hasarı en sık fokal spinal kord kompresyonundan kaynaklanmaktadır ve beyaz ve gri maddeyi çevreleyen pia ve glia limitansı eritir. Spinal kord parankiminde doku hasarı ve kanama olan yerlerde sıvı dolu boşluklar ve kist oluşur. Buna karşılık masif kompresyon ve laserasyon yaralanmalarında glia limitans ve pia kesilmektedir. Laserasyon yaralanmaları fokaldır ve masif kompresyon yaralanmaları gibi zamanla spinal kordda bağ dokusundan bir kitle oluşumuyla sonuçlanır.

Primer mekanik SKY sonrası hayatta kalan akson ve hücrelerin hasar ve ölümüne sebep olan, endojen iyileşme işlemlerini bozan sekonder hasarlanma kaskadı vardır. Travmatik SKY'nin zorluklarını azaltmaya ve muhtemel kür tedavisine yönelik araştırmalar sekonder hasar kaskadının üstesinden gelmeye veya azaltmaya yönelik, endojen tamir mekanizmalarını arttırıcı, aksonları rejenere edici, kayıp hücreleri yerine koyucu ve rehabilitasyona yönelik girişimleri kapsamaktadır. Bu araştırmalar insan SKY'sini taklit eden hayvan modellerinin oluşturulmasına sebep olmuştur.

Travmatik SKY çalışmaları için sıçanlar sadece kolay ulaşılabildikleri için değil aynı zamanda SKY sonrası oluşan morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel değişikliklerin insandakine benzerlik göstermesi nedeniyle seçilmektedir (85-87). Elle mesane boşaltımının göreceli kolaylığı ve idrar yolu enfeksiyonunun daha az görülmesi nedeniyle dişi sıçanlar daha çok tercih edilebilir.

## **2.4.2 Travmatik SKY Sıçan Modelleri**

### **2.4.2.1 Ağırlık Düşürme**

İlk belgelenmiş SKY hayvan deneyi köpeklerde ağırlık düşürme tekniğini kullanan Allen tarafından tanımlanmıştır. Ağırlık ve yüksekliğe bağlı olarak kord farklı miktarlarda güce maruz kalmakta ve değişik derecede SKY ile sonuçlanmaktadır. Travma yüzeyinin şekil ve ölçüleri hasarlanmanın akıbeti açısından önemli değişkenlerdir (88). Allen'in orijinal çalışmasında köpek kullanılmış olmakla beraber sonraları ağırlık düşürme tekniği sıçanlara uyarlanmıştır (89).

Bir hasarlanma modelinin farklı şiddette hasar ve akıbete sebep olacak şekilde ayarlanabilme özelliği çok önemlidir. Hasarlanma çok hafifse, kendiliğinden iyileşme hızlıca gelişebilir ve kullanılan ilacın tedavi potansiyelini değerlendirmek zorlaşır. Travma çok şiddetli ise ileri düzey fonksiyon kaybına sebep olur ve ilacın potansiyel tedavi kapasitesini maskeleyebilir.

MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) impaktörü 1991 yılında Dr. John Gruner, Carl Mason ve Wise Young tarafından geliştirilmiştir ve eskiden NYU (New York University) impaktörü denirdi. MASCIS impaktörü sıçanlarda derecelendirilebilir ve tekrarlanabilir spinal kord kontüzyonu oluşturabilir. İmpaktör 10 gr.lık bir çubuğun 12.5, 25.0 veya 50.0 mm yükseklikten hareketini kesin olarak ölçer. Ayrıca etki bölgesindeki spinal kord hareketini ölçer, çubuğun düşme doğrultusunu gösterir ve impakt hızı, kord kompresyon aralığı, kord kompresyon zamanı ve kord kompresyon oranını ölçer. Böylece önceden belirlenen kriterleri sağlamayan sıçanlar deneyden çıkarılabilir.

#### **2.4.2.2 Anevrizma Klip Kompresyonu**

Birçok araştırma grubu sıçanları orijinali Allen tarafından tasarlanan ağırlık düşürme modeli için çok küçük bulmaktadır. Araştırmacılar bu problemin üstesinden gelmek ve insandaki klinik durumlarda karşılaşılan ventral kompresyonu daha iyi sağlamak maksadıyla özel olarak modifiye edilmiş Kerr-Lougheed anevrizma klipi ile kompresyon metodunu geliştirmişlerdir (90). Klip önceden istenen kompresyon gücüne göre ayarlanır. Klip kolayca korda tutturulur ve belirlenen kompresyon zamanı dolduğunda kolayca çıkarılabilir.

#### **2.4.2.3 Ayarlanabilir Forseps Kompresyonu**

Fokal hasarlanma oluşturan anevrizma klibine alternatif olarak üretilen bir yöntemdir. Daha büyük hacimde spinal kord dokusunun kompresyonunu sağlamaktadır.

#### **2.4.2.4 Kontüzyon**

Kompresyon hasarı gücü dorsalden veya lateralden uygulayan birçok methodla oluşturulabilir. Buna karşılık kontüzyon hasarlanması modeli özel aletlerin kullanımıyla insan SKY vakalarındaki benzer şekilde dorsal spinal korda güç uygulanmasıyla oluşturulur (91). Hasarın şiddetini daha iyi kontrol edebilmek ve biyomekanik özellikleri daha yakından monitorize edebilmek için birçok laboratuvar kontrollü pnömotik kompresyon modellerini denemeye başlamıştır (92). Noyes şimdilerde Ohio State University (OSU) aleti olarak bilinen yeni bir elektromekanik spinal kord impaktörü tanımlamıştır. OSU aletinin yüksek maliyeti kullanımını sınırlandırmakla beraber bu sofistike model biyomekanik yönden hasarlanmanın şiddetini belirleyen kompresyon hızı, kompresyon gücü derinliği vs. gibi etmenler üzerinde muhteşem kontrol sağlamaktadır.

#### **2.4.2.5 Laserasyon**

Travmatik SKY modelleri arasında en sık kullanılan tam transeksiyon, fokal myelotomi, dorsal veya lateral hemiseksiyon gibi laserasyon modelleridir. Laserasyon yaralanmaları klinikte sık görülmemekle beraber yükselen ve alçalan aksonlar arasındaki iletişimi etkili bir şekilde kesmektedir. Bu nedenle akson rejenerasyonu ile ilgili çalışmalara uygun bir modeldir.

#### **2.4.2.6 Kimyasal Aracılı SKY**

Daha önce tanımlanan modellerin aksine kimyasal aracılı SKY travmatik SKY'nin bütün komponentlerini içermeyen hedefe yönelik bir girişimdir. Bu deneklerden elde edilen bulgular kliniğe uyarlanırken bu durum göz önünde bulundurulmalıdır. Serbest radikal hasarı, eksitotoksik hasar, iskemik hasar gibi tekil etkisi olan moleküllerle model oluşturulmaktadır.

## 2.5 OLEUROPEİN

Son yıllarda anti-inflamatuar ajanlar ve serbest radikal temizleyicilerinin etkinliğinin görülmesiyle sekonder hasara olan ilgi artmıştır. Zeytinyağı oleuropein gibi fenolik içerikten zengin ve insan sağlığına birçok faydalı etkisi olan bir kaynaktır. Oleuropein'in hidrolizi hidroksitirozol ve tirozol gibi diğer fenoliklerin oluşumu ile sonuçlanır (93). Deneysel çalışmalar oleuropein ve hidroksitirozol gibi derivativlerinin yararlı etkilerini anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-karsinojenik, anti-mikrobiyal, anti-aterojenik ve antiviral özelliklerine bağlamaktadır (94-96). Zeytinyağı fenollerinin mutlak nöroprotektif mekanizması bilinmemekle beraber anti-oksidadif anti-inflamatuar etkinin esas mekanizma olduğu kabul edilmektedir.



## **3 GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1 DENEY HAYVANLARI**

Bu çalışmada 8-10 haftalık, ağırlıkları 250- 300 gr arasında değişen, daha önce herhangi bir deneyde kullanılmamış toplam 24 adet dişi Spraque-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan sağlandı. Sıçanlar çalışma süresince oda ısısında ( $22 \pm 2$  °C), 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık siklusunda ve %50-60 nem ortamında barındırılarak, standart pelet sıçan yemi ile beslenerek, suya serbestçe ulaşabilmeleri sağlandı. Çalışmaya başlamadan önce sıçanlar bir hafta süreyle bu ortamda izlendi ve ortama uyum sağlamaları gözlendi.

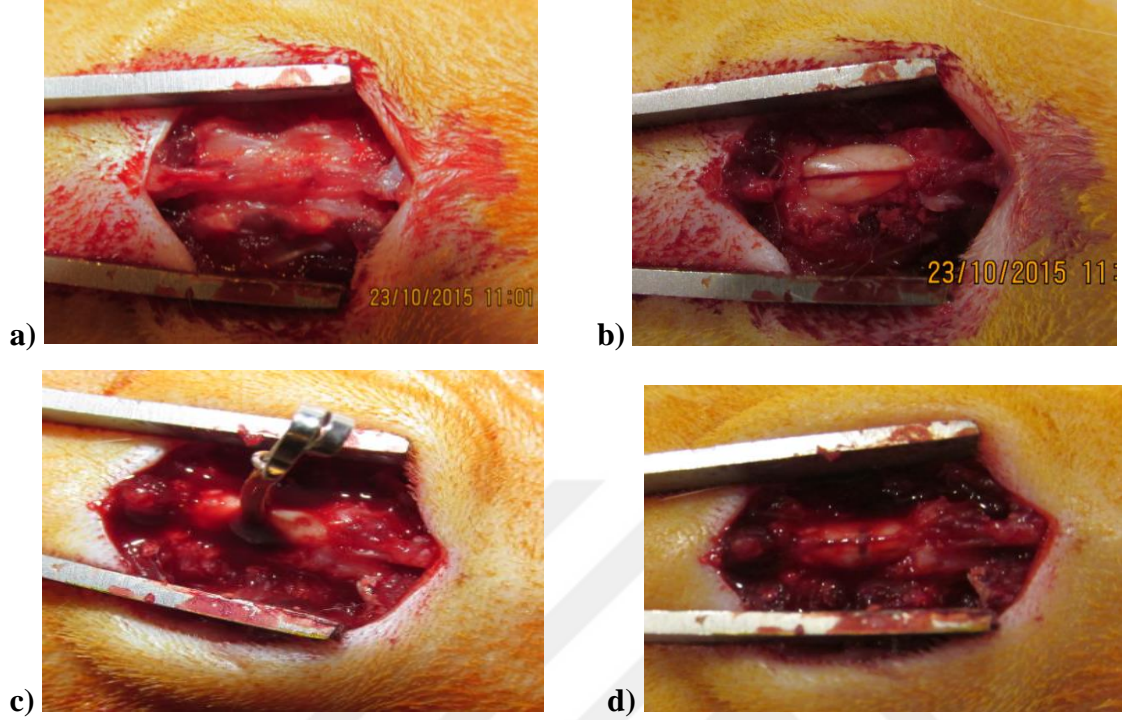
### **3.2 ANESTEZİ VE SIÇANLARIN HAZIRLANMASI**

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 arka bacadan intamuskuler yolla uygulandı. Sedasyondan emin olunduktan sonra sıçanların dorsal bölgesi traş edildi. Daha sonra sıçanlar sert bir süngerin üstüne yüzüstü pozisyonda yerleştirildi.

### **3.3 SKY TRAVMA MODELİ UYGULANMASI**

Sıçanlar anestezi ile sedasyon sağlanıp yüzüstü pozisyonda, sert sünger üzerinde sabitlendikten sonra, daha önce traş edilen sıçanın dorsal bölgesi batikonla temizlendi. T8-T11 arası orta hattan dikey olarak 15 numara bistüri ile 3-4 cm uzunluğunda cilt-ciltaltı kesisi yapıldı. Fasya bilateral bistüri ile kesildikten sonra paravertebral adeleler dissektör ve punch yardımıyla sıyrıldı. Paravertebral adele kanamaları oksitlenmiş selüloz (Surgicel, Ethicon, İstanbul) yardımıyla kontrol altına alındı. Otomatik ekartör yerleştirildi. Bebek rongeur ile T9-T10 spinöz proses alındı. Daha sonra klemp yardımıyla T9-T10 total laminektomi uygulandı. Duraya zarar vermeksizin spinal kord ortaya konuldu. Spinal korda kapanma kuvveti 90 g (0.88 N) olan Yaşargil geçici anevrizma klibi (FT262T, Aesculap, Tuttlingen, Almanya) dura ve spinal kordun tüm katları içine alınarak yerleştirildi ve 30 saniye sonra çıkartıldı. Kanama kontrolünden sonra fasya ve cilt 4/0 prolene yardımıyla primer sütüre edildi. Daha sonra batikonla cilt pansumanı yapılarak sıçanlar kafeslerine koyuldu. Tüm bu

işlemler esnasında asepsi kurallarına uyuldu ve cerrahi işlem sırasında ısıtıcı pedler kullanılarak vücut ısısı 36.5-37.5 derece aralığında tutuldu.



**Resim 1:** Sıçanlara spinal kord travma modeli uygulanması. a) Paramedian kaslar laterale sıyrılmış durumda T9-10 laminaları ve spinöz prosesler; b) T9-10 laminektomi sonrası intakt dura ve spinal kord; c) Anevrizma klipi ile spinal kord hasarı oluşturulurken; d) Anevrizma klipi ile travma oluşturduktan sonra lineer tarda yaralanma görüyor.

### 3.4 DENEY GRUPLARI

Sıçanlar rastgele seçilerek, her bir grupta 8'er adet sıçan olmak üzere üç grup oluşturuldu. Laminektomi grubu hariç diğer gruplara anevrizma klipi ile spinal kord travma modeli uygulandı.

**Grup 1 (Laminektomi) (n: 8):** Bu grupta sıçanlara anestezi verildikten sonra T9-T10 laminektomi yapıp travma uygulanmadan cilt-cilt altı suture edilerek kapatıldı. Ardından 0.dk ve 1.saatte intraperitoneal yolla %0,9 saline enjeksiyonu yapıldı. (5 ml/kg)

**Grup 2 (Travma) (n: 8):** Bu grupta sıçanlara anestezi verildikten sonra T9-T10 laminektomi yapıp Yaşargil geçici anevrizma klipi ile 30 sn. ekstradural kompresyon uygulandı, işlem sonrası kanama kontrolü sağlandı ve cilt-cilt altı suture edilerek kapatıldı. Ardından 0.dk ve 1.saatte intraperitoneal yolla %0,9 saline enjeksiyonu yapıldı. (5 ml/kg)



**Grup 3 (Oleuropein) (n: 8):** Bu grupta sıçanlara anestezi verildikten sonra T9-10 laminektomi Yaşargil geçici anevrizma klipi ile 30 sn. ekstradural kompresyon uygulandı, işlem sonrası kanama kontrolü sağlandı ve cilt-cilt altı suture edilerek kapatıldı. Ekstradural kompresyon sonrası 20 mg/kg oleuropein 0 ve 1. saatte intraperitoneal yolla uygulandı. (5 ml/kg)

Oleuropein doz, uygulama yöntemi ve zamanı önceki çalışmalar göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

### 3.5 SAKRİFİKASYON İŞLEMİ VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Literatürdeki diğer çalışma örnekleri incelendiğinde HMGB-1 düzeylerinin travma sonrası 24-48 saatte en yüksek düzeylere ulaştığı görülmüştür (1,2,3). Biz çalışmamızda oleuropein'in akut dönemdeki etkisini görmeyi amaçladığımız için sıçanları 1. gün sakrifiye ettik. 24. saatte anestezi uygulanıp sedasyon sağlandıktan sonra tüm gruplardaki sıçanlardan intrakardiyak yolla 10 cc kan alındı ve kuru (jelsiz) biyokimya tüplerine koyuldu. Daha sonra sıçanlar dekapitasyon işlemi ile sakrifiye edildi. Spinal kord laminektomi alanı kranial ve kaudale 2 seviye daha genişletildikten sonra düzgün bir şekilde doku örneği alındı. Alınan örnekler %10 formaldehid içeren tüplere konuldu.

### 3.6 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEM

İmmünohistokimyasal çalışmalar için, spinal kord örnekleri, %10'luk nötral formalinde fikse edildi. Fiksasyonun ardından, doku örnekleri tam otomatik doku takip cihazında (Histokinet) (Leica TP 1020 ve Leica EG 1160; Leica, Wetzlar, Germany) işlenerek 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2155; Leica, Wetzlar, Germany) ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Spinal kord örneklerinde, HMGB-1, TLR4, RAGE, Nrf2 ve NF-κB immünoaktiviteleri, Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) yöntemi ile immünohistokimyasal olarak incelendi.

**Streptavidin-Biotin Peroksidaz Kompleks (StrepABC) Yöntemi:** Parafin kesitler deparafinizasyon işleminden sonra hidrate edilerek, saf su ile yıkandı. Kesitleri içeren pozitif yüklü lamlar saf suda yıkandıktan sonra, mikrodalgada 10 dakika (2x5 dakika) boyunca sitrat tamponu (pH 6.0) içerisinde 700 Watt'ta kaynatıldı ve ardından 20 dakika oda sıcaklığında

soğumaya bırakıldı. Sitrat tamponunun ardından saf suda yıkanan lamlar 9-10 dakika (3x3 dakika) boyunca tuzlu fosfat tamponunda (PBS; 0.01 M; pH 7.4) bekletildi. Oda sıcaklığında ve nemli ortamda metanolde hazırlanan %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'de (Merck, 1.08597) endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 10 dakika karanlık ortamda tutulduktan sonra tekrar PBS'e alındı. Ardından kesitlere oda sıcaklığında 10 dakika boyunca bloklayıcı serum (Thermo Scientific, TA-125-UB; Deutsch, Germany) uygulaması yapıldı. Kesitler, antikor uygulama protokolüne uygun olarak TLR4 (Novus, NB100-56566), RAGE (Novus, NBP2-03950) ve NF-κB (Santa Cruz, sc-114) antikorlarında +4 °C'de bir gece (18-19 saat), HMGB1 (Novus, NB100-2322) ve Nrf2 (Santa Cruz, sc-722) antikorlarında ise 37 °C etüvde 1 saat inkübe edildi. HMGB-1, TLR4 ve Nrf2 antikorları, antikor sulandırıcı (Thermo Scientific, TA-125-UD) ile 1:100, RAGE antikoruna 1:50, NF-κB antikoruna ise 1:25 oranında sulandırıldı. Antikor uygulamasının ardından kesitler, PBS'de 10 dakika yıkandıktan sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca keçiden elde edilmiş biyotinlenmiş anti-tavşan sekonder antikoruna (Thermo Scientific, TP-125-BN) ile inkübe edildiler. Lamlar, PBS'de 10 dakika yıkandıktan sonra, peroksidaz ile işaretli streptavidin (Thermo Scientific, TS-125-HR)'de oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu. Renkli reaksiyon ürününün oluşması için kesitler, mikroskopta reaksiyonun izlenmesi temel alınarak, yaklaşık 10 dakika boyunca 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (Thermo Scientific, TA-004-HAC) ile karanlık ortamda inkübe edildi ve ardından reaksiyonun durdurulması amacıyla distile su ile yıkandı. Yıkamanın ardından, zıt boyama aşaması için kesitler 1 dakika boyunca Mayer hematoksilinde (Thermo Scientific, TA-125-MH) bekletildi. Kesitler, 5 dakika boyunca musluk suyunda yıkandıktan sonra su bazlı kapatıcı (Thermo Scientific, TA-060-UG) ile kapatıldı. Negatif kontrol kesitlerine, primer antikor yerine distile su uygulaması yapıldı (Gurel ve ark., 2007). Kesitler, Leica DM4000 B ışık mikroskobu ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

### **3.7 DNA FRAGMENTASYONUNUN BELİRLENMESİ (TUNEL YÖNTEMİ)**

Formalin ile fikse edilmiş spinal kord örnekleri, 58 °C'lik parafine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom ile alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler, pozitif yüklü lamlara yapıştırıldı. Kesitlerdeki apoptotik hücreler, ApopTag® Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Kit (Chemicon International; Darmstadt, Germany) kullanılarak, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) yöntemi ile gösterildi. Parafin bloklardan alınan 4-µm kalınlığındaki kesitler bir gece 37 °C'de tutuldu. Ksilol ve azalan alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, PBS'de yıkandı. Bunu takiben, kesitler 15

dakika boyunca 20 µg/ml proteinaz K (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) enzimi ile 37 °C etüvde inkübe edildi. Kesitlere, karanlık ortamda endojen peroksidaz aktivitesinin engellenmesi için 5 dakika boyunca PBS’de hazırlanmış %3’lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, 1.08597) uygulandı. 37 °C etüvde dengeleme tamponunda 10 dakika tutulan kesitlere, 1.5 saat süresince TdT enzimi uygulaması yapıldı. TdT enziminin reaksiyonunu durdurmak için, kitin içerisinde bulunan durdurma/yıkama tamponu oda sıcaklığında 10 dakika uygulandıktan sonra, kesitler PBS ile 3 dakika (3x1 dakika) boyunca yıkandı. Bunu takiben anti-digoksinin peroksidaz enzimi 30 dakika boyunca 37 °C etüvde uygulandı. PBS’de 8 (4x2) dakika yıkama yapıldıktan sonra, kesitlere kromojen olarak 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substratı uygulandı. 30-45 dakikalık uygulamanın ardından, kahverengi olarak gözlenen reaksiyon, distile su ile durduruldu. Kesitler bu aşamadan sonra zıt boya olarak kullanılan metil yeşili ile boyandıktan sonra, hızlı bir şekilde bütanolden geçirildi. Toplam 15 dakikalık (3x5 dakika) ksilol uygulaması ile saydamlaştırılan lamalar entellan ile kapatılarak, ışık mikroskopunda incelenmek üzere hazırlandı. TdT enziminin uygulandığı basamakta, negatif kontrol preparatında enzim yerine distile su kullanıldı (Taskin ve ark., 2009).

### **3.8 H-SKOR ve APOPTOTİK İNDEKSİN HESAPLANMASI**

Tüm değerlendirmeler iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak yapıldı. Yapılan immünohistokimyasal boyama sonrasında spinal kord kesitlerindeki reaksiyonlar, 6 farklı grubun tüm bireylerinde, 400x büyütmede ve rastgele seçilmiş 7 farklı alanda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak HMGB-1, TLR4, RAGE, Nrf2 ve NF-κB boyanmalarını analiz etmek için, kesitlerdeki immün pozitif hücreler histolojik skor (H-Skor) kullanılarak değerlendirildi (Senturk ve ark., 1999; Taskin ve ark., 2008). Pozitif boyanan hücreler sayılarak, boyanma yoğunluğuna bağlı olarak derecelendirildi: 0, negatif; 1, hafif; 2, orta; 3, yoğun olarak kabul edildi. Her bir dokuda H-Skor değeri,  $H-Skor = \frac{Pi}{i + 1}$  formülüyle belirlendi. Formülde, “i” yoğunluk skoru (derecesi), “Pi” ise boyanma gösteren hücrelere ait yüzde değeridir. Tüm kesitler, Leica DM4000 B mikroskobu (Leica) kullanılarak fotoğraflandı.

Apoptotik hücre sayımı, iki kör gözlemci tarafından bağımsız olarak, 6 farklı grubun tüm bireylerinde, 400x büyütmede ve rastgele seçilmiş 7 farklı alanda sayım yapılarak belirlendi. Sonuçlar, gruplardaki her bireyin 7 farklı alanından elde edilen değerlerin ortalaması olarak ifade edildi (ortalama değer / alan) (Erdoğan et al., 2015).

### 3.9 WESTERN BLOT YÖNTEMİ

#### Reaktifler

Sıçanlardan alınıp homojenizasyonu yapılan doku örneklerinde, Bradford yöntemi ile 1 mg/ml Bovine serum albümin (BSA) standart olarak kullanılarak, total protein miktar tayini 595 nm dalga boyunda Plak okuyucu (Thermo Scientific Multiskan FC, 2011-06, USA)'da ölçüldü. Her bir örnek için yaklaşık 20 µg total protein SDS-PAGE'e yüklendi. 1 saat 120 mv'da yürütüldü. Transfer işlemi Invitrogen I Blot transfer cihazı kullanılarak üst ve alt PVDF membranlara aktarılarak yapıldı. Transfer işleminden sonra membranlar bloklama işlemine tabi tutuldu. Bloklama işlemi için, membranlar %5'lik skim milk (süt tozu)'de +4 °C'de çalkalayıcıda 1 saat inkübasyona bırakıldı. Bloklama işlemi bittikten sonra membranlar TBS-T ile 2 defa yıkandı. HMGB-1 (Novus, NB100-2322), TLR-4 (Novus, NB100-56566), RAGE (Novus, NBP2-03950), Nrf2 (Santa Cruz, sc-722), Bax (Santa Cruz, sc-493), Bcl-2 (Santa Cruz, sc-492), p53 (Santa Cruz, sc-126), Caspase-3 (Santa Cruz, H-277) primer antikoları 1/500 oranında hazırlandı. Membranlar primer antikolar ile işaretlendikten sonra +4 °C'de çalkalayıcıda 1 gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün membranlar TBS-T ile 3 defa yıkandıktan sonra 1/500 oranında hazırlanan sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz Ca USA) ile işaretlenerek 1 saat oda ısısında çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. Bantlar, Vilbert Laurmart Fusion Fx5 cihazında görüntülendi ve değerlendirildi.

### 3.10 BİYOKİMYASAL YÖNTEM

#### 3.10.1 Total Antioksidan Seviye (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS)

İnflamasyonlar, aldığımız besin maddeleri, normal metabolizma, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı (pO<sub>2</sub>), ozon (O<sub>3</sub>), azot dioksit (NO<sub>2</sub>), kimyasal maddeler, sigara ve ilaçlar gibi birçok uyarıların etkisiyle, oksidan adı verilen moleküller ortaya çıkar. Bu oksidan moleküllere serbest radikaller ya da reaktif oksijen türleri (ROT) de denilmektedir.

Oksidanlar: hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine zarar vererek; kanser, kalp hastalıkları, bağırsak hastalıkları, depresyon, damarlarda yapı bozuklukları ve erken yaşlanma gibi onlarca önemli soruna yol açabilirler.

### **TAS için reaktifler**

**Reaktif 1:** 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde 10 mM o-Dianisidine ve 45 mM Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O çözülerek hazırlandı.

**Reaktif 2:** 7,5 mM hidrojen peroksit 75 mM Clark tamponu (pH=1.8) içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

#### **Prensip:**

Fe<sup>2+</sup>-o-dianisidine kompleksi hidrojen peroksit ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak OH radikalini oluşturur. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgenerek düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidine radikallerini oluştururlar. Dianisidil radikalleri, ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumu artmaktadır. Ancak, örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar.

Çalışma zamanında, daha önce -80 °C'de saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi. Total protein ölçümleri yapılmış doku örnekleri ile beraber çalışmaya dahil edildi. Tüm örneklerden 100'er µl alınıp üzerlerine sırasıyla, 150 µl R1 ve 150 µl R2 eklendi. 1 dakika 37 °C'de bekletildikten sonra spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06,USA) 240 nm'de okundu. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanıldı ve sonuçlar mmol.Trolox.ekivalent/L olarak ifade edildi.

### **TOS için reaktifler**

**Reaktif 1:** 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözülerek ana solüsyon hazırlandı. Ana solüsyonda, önce% 10 oranında gliserol çözüldü, daha sonra total hacimde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlandı.

**Reaktif 2:** Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözüldü, daha sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek reaktif hazırlandı.

**Prensip:** Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyona oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür.

Çalışma zamanında, daha önce -80 °C'de saklanan serum örnekleri oda ısısına getirildi. Total protein ölçümleri yapılmış doku örnekleri ile beraber çalışmaya dahil edildi. Tüm

örneklerden 100' er µl alınıp üzerlerine sırasıyla 150 µl R1 ve 150 µl R2 eklendi. 1 dakika 37 °C'de bekledikten sonra spektrofotometrede (Thermo Scientific Multiscan FC, 2011-06,USA) 520 nm'de okundu. Standart olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı ve sonuçlar µmol.H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.ekivalent/L olarak ifade edildi.

### 3.10.2 Oksidatif Stres İndeksinin (OSI) Hesaplanması

TAS'ın birimi µmol.Trolox.ekivalent/L'ye çevrilir ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi hesaplanır.

$$\text{Oksidatif stres indeksi (OSI)} = \frac{\text{TOS } (\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2.\text{ekivalent/L})}{\text{TAS } (\mu\text{mol.Trolox.ekivalent/L})} \times 100$$

### 3.11 İstatistiksel Analiz

Çalışma sonunda elde edilen immünohistokimya, western blot, biyokimyasal analizler ve TUNEL yöntemi sonuçları, ortalama±standart hata (S.E.M.) olarak hesaplandı. Grupların dağılımının normal dağılıma uygunluğunun test edilmesini takiben, istatistiksel değerlendirme GraphPad Prism (GraphPad Prism Version 5 Software Program, San Diego, CA) Programı kullanılarak, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrasında Tukey çoklu karşılaştırmalar testi ile yapıldı. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4) BULGULAR

### 4.1 İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

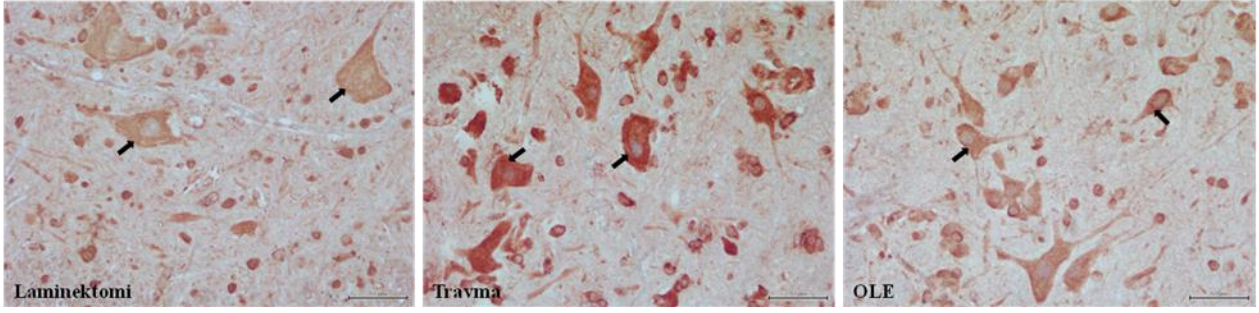
Çalışmamızda, spinal kord kesitlerinde HMGB-1, TLR4, RAGE, NF- $\kappa$ B ve Nrf2 düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi.

#### 4.1.1 HMGB-1, TLR4, RAGE ve NF- $\kappa$ B Düzeyleri

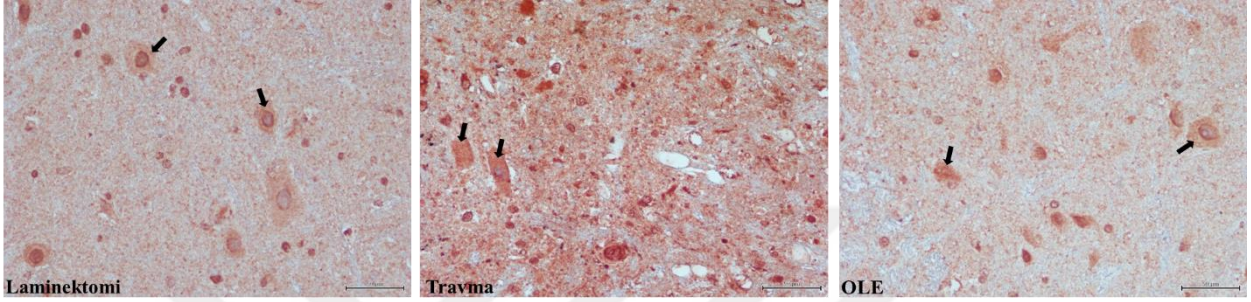
Hücre dışı HMGB-1; RAGE, TLR2 ve TLR4 ile etkileşim kurarak enflamatuar sinyallere veya diğer hücrel cevaplara aracılık eder. Bu da, transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B ve MAPK aktivasyonu ile sonuçlanır. Çalışmamızda, tüm grupların spinal kord örneklerinde HMGB-1 (Resim 2), TLR4 (Resim 3), RAGE (Resim 4) ve NF- $\kappa$ B (Resim 5) düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Travmatik spinal kord hasarı oluşturulan 1 günlük travma grubunda, laminektomi grubuna göre HMGB-1 ( $P<0.001$ ), TLR4 ( $P<0.001$ ), RAGE ( $P<0.001$ ) ve NF- $\kappa$ B ( $P<0.001$ ) düzeylerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. Buna karşın, travmatik spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra oleuropein verilen OLE grubunda, HMGB-1 ( $P<0.001$ ), TLR4 ( $P<0.001$ ) ve RAGE ( $P<0.001$ ) düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. OLE grubunda, NF- $\kappa$ B düzeyleri travma grubuna göre azalmasına karşın, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 1 ve Şekil 2).

PARAMETRELER	LAMINEKTOMI	TRAVMA	OLE
HMGB1 (H-Skor)	171,0 $\pm$ 4,5	197,3 $\pm$ 3,5	176,2 $\pm$ 3,7
TLR4 (H-Skor)	219,6 $\pm$ 4,1	308,3 $\pm$ 4,3	238,7 $\pm$ 5,0
RAGE (H-Skor)	213,1 $\pm$ 4,4	276,7 $\pm$ 6,2	233,1 $\pm$ 4,2
NF- $\kappa$ B (H-Skor)	217,1 $\pm$ 6,3	277,5 $\pm$ 8,3	254,1 $\pm$ 6,4

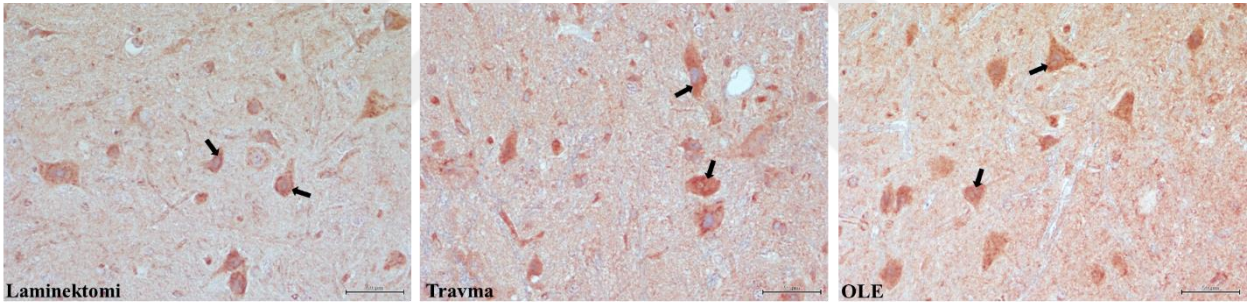
**Tablo 1:** Spinal kord örneklerinde HMGB1, TLR4, RAGE, NF- $\kappa$ B'ya ait H-Skor değerlerinin ortalama  $\pm$  standart hata değerleri.



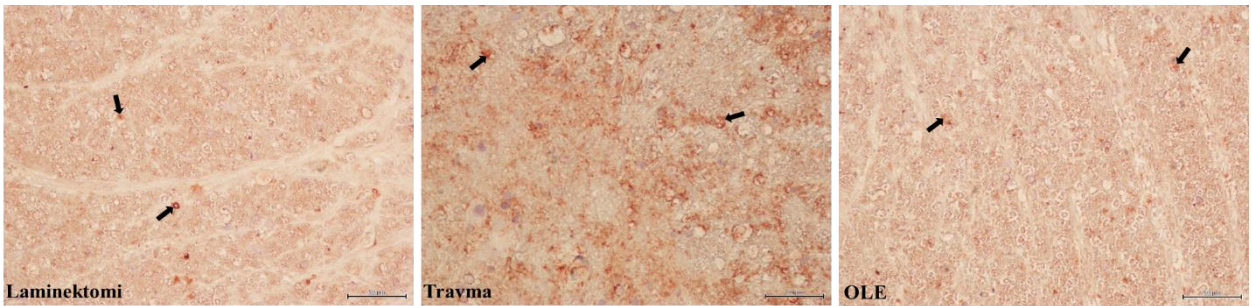
**Resim 2:** Spinal kord örneklerinde sitoplazmik HMGB1 düzeylerinin (↑) laminektomi, travma ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Bar: 50 µm.



**Resim 3:** Spinal kord örneklerinde sitoplazmik TLR4 düzeylerinin (↑) laminektomi, travma ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Bar: 50 µm.

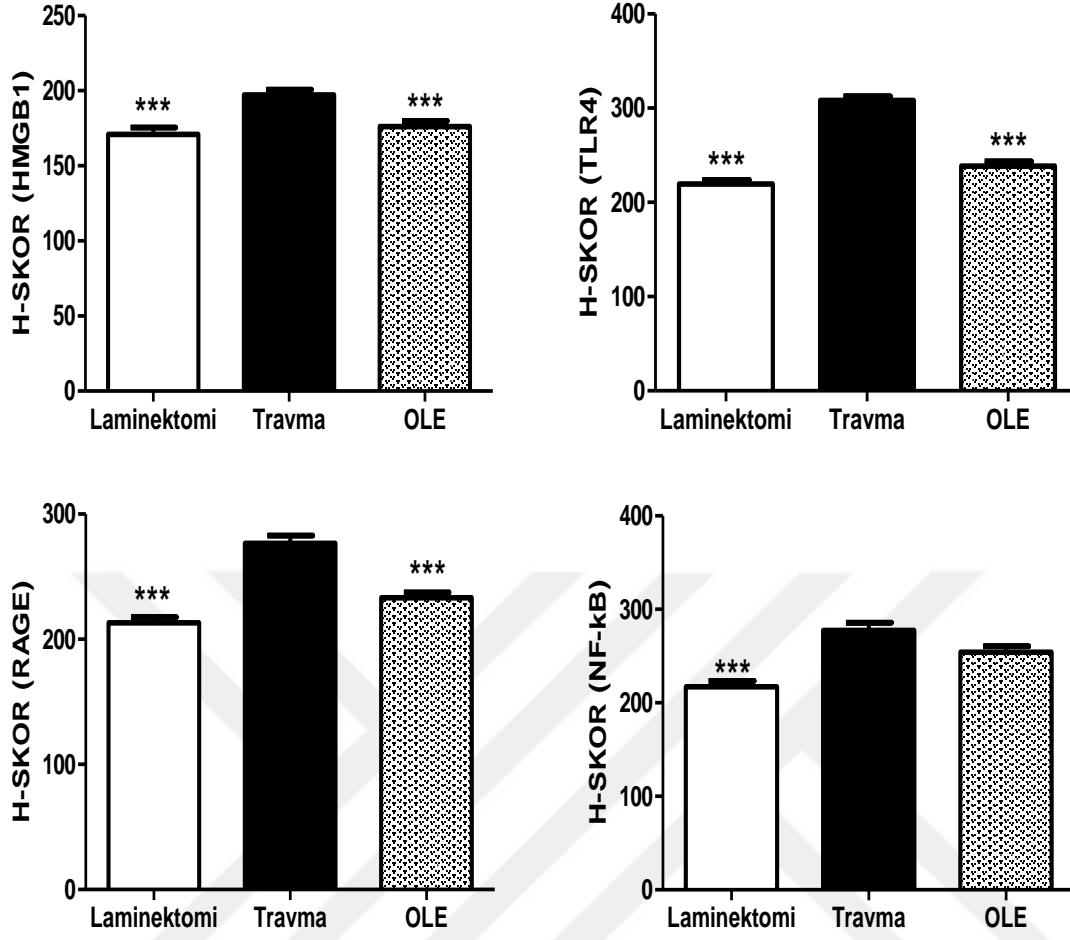


**Resim 4:** Spinal kord örneklerinde sitoplazmik RAGE düzeylerinin (↑) laminektomi, travma ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Bar: 50 µm.



**Resim 5:** Spinal kord örneklerinde nuklear NF-κB düzeylerinin (↑) laminektomi, travma ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Bar: 50 µm.





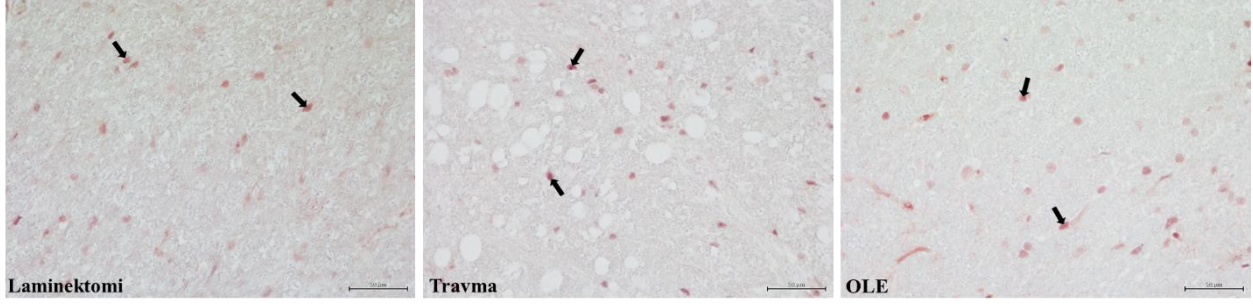
**Şekil 2:** Spinal kord örneklerinde HMGB1, TLR4, RAGE ve NF-κB düzeyleri. Spinal kord kesitlerinde HMGB1, TLR4, RAGE ve NF-κB'nin immünohistokimyasal düzeyleri, spinal kord hasarı yapılan travma grubunda artarken; laminektomi yapılan ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda travma uygulanan gruba göre azaldı. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

#### 4.1.2 Nrf2 Düzeyleri

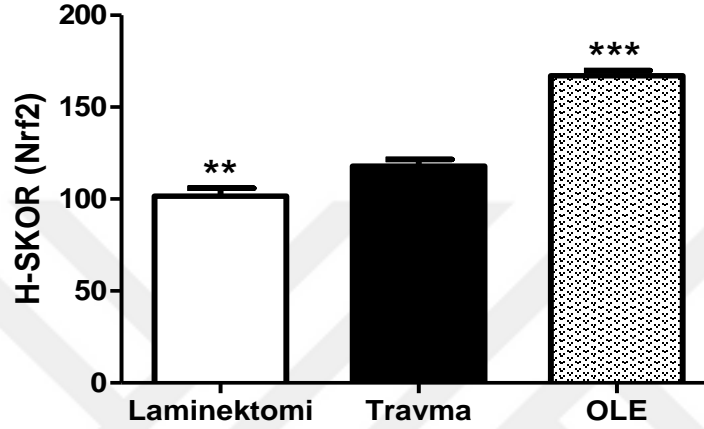
Çalışmamızda 1 gün sonra sakrifiye edilen laminektomi, travmatik spinal kord hasarı oluşturulan travma ve oleuropein (OLE) verilen grupların nükleer reaksiyon veren Nrf2 düzeyleri immünohistokimyasal olarak değerlendirildi. Travmatik spinal kord hasarının Nrf2 düzeylerini arttırdığı (P<0.01), bu düzeylerin OLE uygulamasıyla travma grubuna göre daha da yükseldiği belirlendi (P<0.001) (Tablo 2, Resim 6 ve Şekil 3).

PARAMETRELER	LAMINEKTOMI	TRAVMA	OLE
Nrf2 (H-Skor)	101,6±4,2	117,9±3,7	167,1±2,8

**Tablo 2:** Spinal kord örneklerinde Nrf2'ye ait H-Skor değerlerinin ortalama ± standart hata değerleri.



**Resim 6:** Spinal kord örneklerinde Nrf2 düzeylerinin (↑) laminektomi, travma ve oleuropein (OLE) uygulanan gruplarda immünohistokimyasal olarak gösterilmesi. Bar: 50 µm.



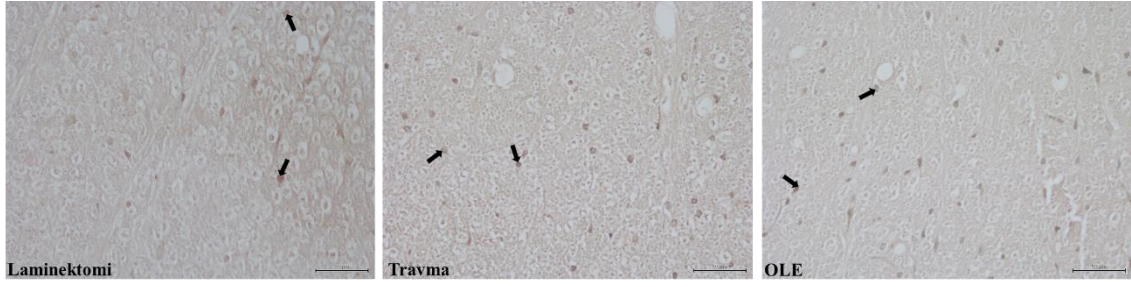
**Şekil 3:** Spinal kord örneklerinde Nrf2 düzeyleri. Nrf2 düzeyleri, laminektomi grubunda spinal kord hasarı yapılan travma grubuna göre düşükken, oleuropein (OLE) uygulanan grupta travma uygulanan gruba göre anlamlı olarak arttı. \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

#### 4.2 DNA FRAGMENTASYONU (TUNEL YÖNTEMİ) BULGULARI

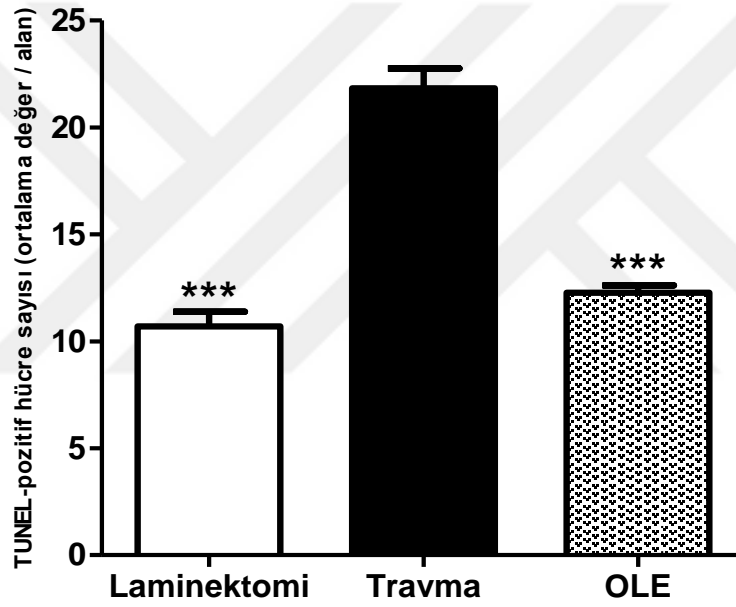
Bir gün sonra sakrifiye edilen deney gruplarının spinal kord kesitlerinde TUNEL yöntemi ile apoptotik hücreler gösterildi (Resim 7). Buna göre travma grubunda, laminektomi grubuna göre alanda bulunan ortalama apoptotik hücre sayısının arttığı (P<0.001); OLE (P<0.001) grubunda ise travma grubuna göre apoptotik hücre sayısının anlamlı miktarda azaldığı belirlendi (Tablo 3, Şekil 4).

PARAMETRELER	LAMINEKTOMI	TRAVMA	OLE
TUNEL-Pozitif Hücre Sayısı (Ortalama Değer / Alan)	10,7±0,7	21,8±0,9	12,3±0,4

**Tablo 3:** Spinal kord örneklerinde TUNEL sonuçlarına ait TUNEL-pozitif hücre sayısının ortalama ± standart hata değerleri.



**Resim 7:** Laminektomi, travma ve OLE gruplarının spinal kord örneklerinde TUNEL reaksiyonu (↑). Bar: 50  $\mu$ m.



**Şekil 4:** Spinal kord örneklerinde TUNEL reaksiyonu. Apoptotik hücre sayısı, spinal kord hasarı yapılan travma grubunda laminektomi grubuna göre artarken, oleuropein (OLE) uygulanan grupta travma uygulanan gruba göre anlamlı olarak azaldı. \*\*\* $P < 0.001$ , travma grubuna göre anlamlılık değeri.

### 4.3 WESTERN BLOT BULGULARI

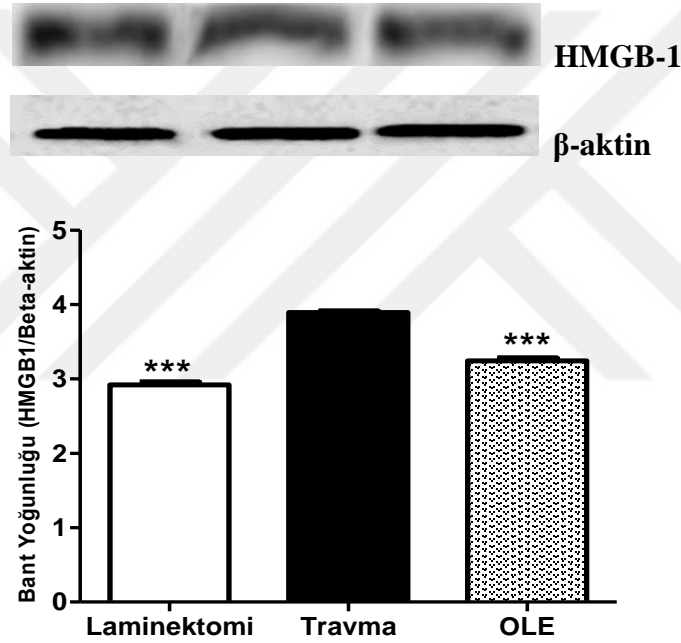
#### 4.3.1 HMGB-1, TLR4 ve RAGE Düzeyleri

HMGB-1 vertebralıların hemen her hücresinde eksprese edilen, çekirdekte yapısal olarak bulunan ve salgılandığında TLR4, RAGE gibi reseptörler üzerinden hücrel sinyal iletiliyle inflamatuvar etkiler gösteren bir proteindir. Travma grubundan alınan örneklerde bu proteinin seviyesinin laminektomi grubuna göre anlamlı olarak arttığı ( $P < 0.001$ ), oleuropein

verilen sıçanlarda HMGB-1 proteini ekspresyonunun, travma grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görülmektedir ( $P<0.001$ ) (Şekil 5). HMGB-1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama  $\pm$  standart hata değerleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 4).

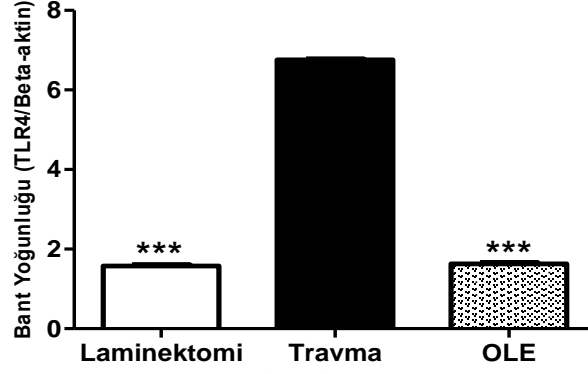
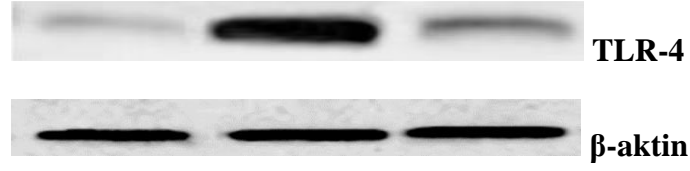
PARAMETRELER	LAMİNEKTOMİ	TRAVMA	OLE
HMGB1/ $\beta$ -aktin	2,92 $\pm$ 0,04	3,89 $\pm$ 0,02	3,24 $\pm$ 0,04
TLR4/ $\beta$ -aktin	1,58 $\pm$ 0,02	6,76 $\pm$ 0,02	1,63 $\pm$ 0,02
RAGE/ $\beta$ -aktin	2,11 $\pm$ 0,04	6,00 $\pm$ 0,03	1,91 $\pm$ 0,02

**Tablo 4:** HMGB1, TLR4 ve RAGE'e ait western blot değerlerinin ortalama  $\pm$  standart hata değerleri

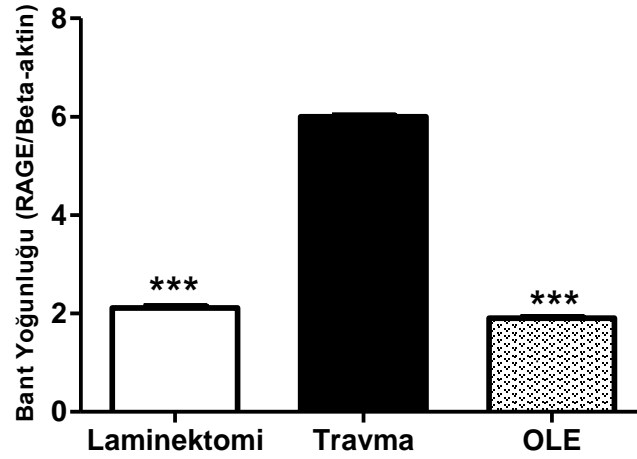
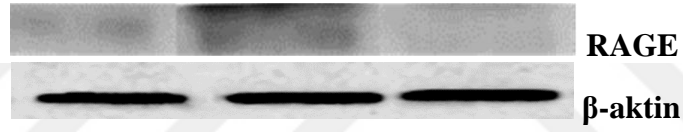


**Şekil 5:** Spinal kord örneklerinde HMGB1 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\* $P<0.001$ , travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Çalışmamızda laminektomi grubu hayvanlarda TLR4 ekspresyonu oldukça az miktarda olmuşken, travma grubundaki hayvanlarda TLR 4 ekspresyonu, HMGB1 proteini gibi yüksek miktarda bulunmuştur ( $P<0.001$ ). OLE grubunda ise TLR 4 ün ekspresyonu da travma grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ( $P<0.001$ ) (Şekil 6).



**Şekil 6:** Spinal kord örneklerinde TLR4 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.



**Şekil 7:** Spinal kord örneklerinde RAGE proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri

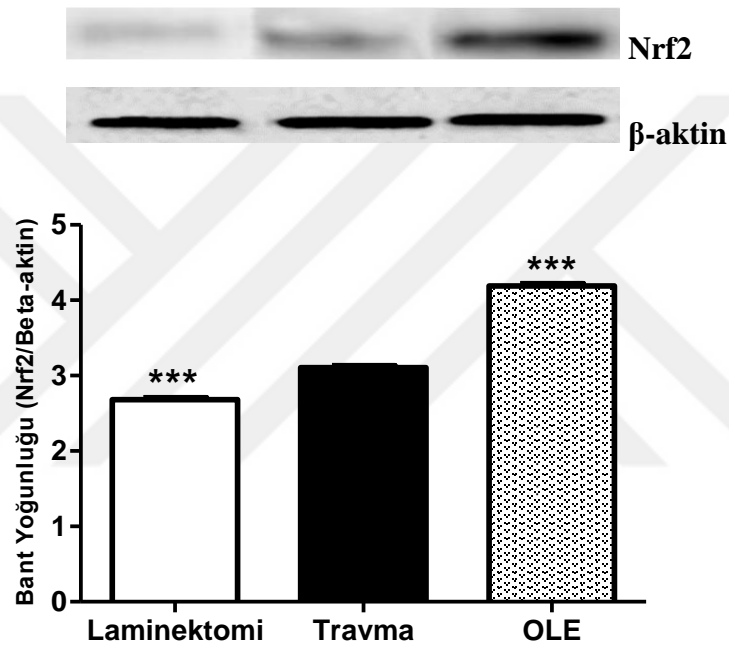
HMGB-1 proteininin reseptörü olan RAGE proteini ekspresyonu da travma grubunda laminektomi grubuna göre anlamlı miktarda artmıştır (P<0.001). OLE grubunda ise RAGE ekspresyonu travma grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır (P<0.001) (Şekil 7).

### 4.3.2 Nrf2 Düzeyleri

Akut SKY hastalarında oksidatif stres geç nöron ve glia ölümüne katkı sağlar ve sekonder hasar kaskadında önemli bir yere sahiptir. Redoksun aktive ettiği transkripsiyon faktörü Nrf2'nin birçok organ ve hücre tipini toksik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir.

PARAMETRELER	LAMİNEKTOMİ	TRAVMA	OLE
Nrf2/ $\beta$ -aktin	2,68 $\pm$ 0,03	3,11 $\pm$ 0,02	4,19 $\pm$ 0,03

**Tablo 5:** Nrf-2'ye ait western blot değerlerinin ortalama  $\pm$  standart hata değerleri.



**Şekil 8:** Spinal kord örneklerinde Nrf2 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

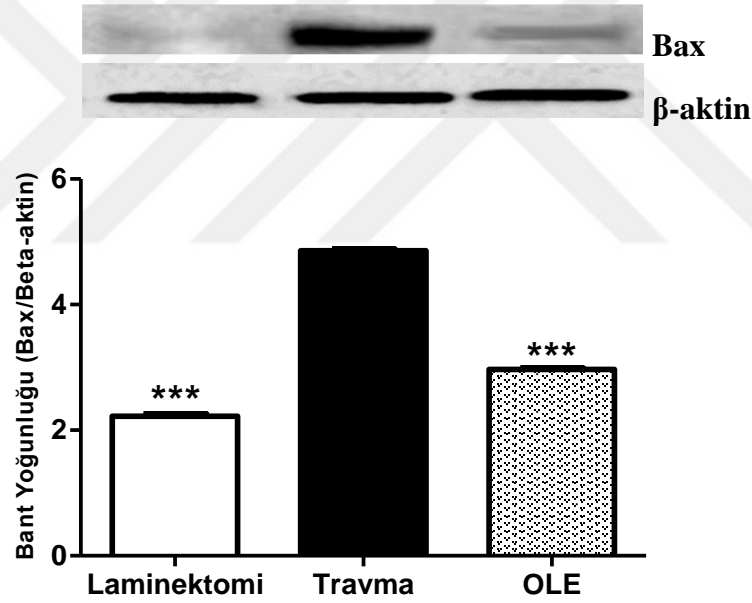
Çalışmamızda laminektomi grubu ile karşılaştırıldığında travma grubunda Nrf2 düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür (P<0.001). Bu durum travma sonrası oksidatif stresin artışı ve buna cevaben antioksidan sistemi aktive etmek üzere Nrf2 düzeylerinin artışıyla ilişkilidir. Ole grubunda travma grubuyla karşılaştırıldığında Nrf2 düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür (P<0.001) (Şekil 8). Böylece oleuropein Nrf2 düzeylerini arttırarak antioksidan etkinlik göstermektedir.

### 4.3.3 Bax, Bcl-2, Aktif Kaspaz 3, P53 Düzeyleri

Bax proteini, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip, insanda bulunan bir proteindir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. Bax, p53 aracılığıyla indüklenir ve bulunduğu hücrenin apoptoza gidişini hızlandırır.

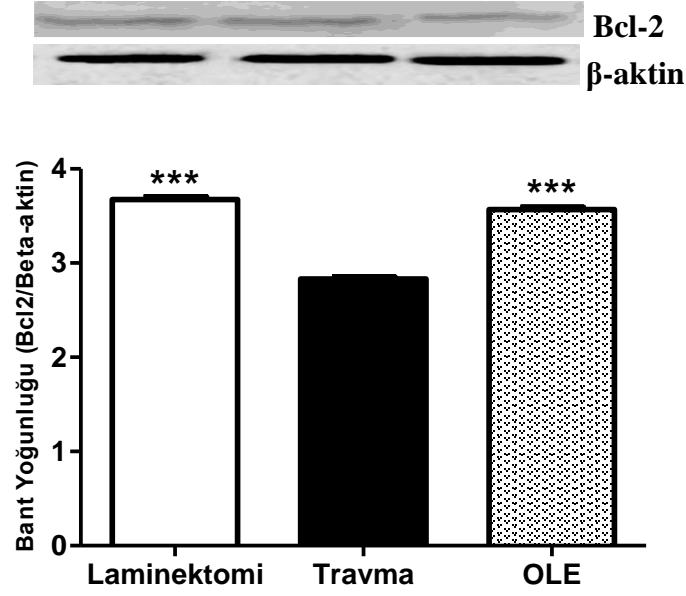
PARAMETRELER	LAMİNEKTOMİ	TRAVMA	OLE
Bax/ $\beta$ -aktin	2,22 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,02	2,97 $\pm$ 0,02
Bcl-2/ $\beta$ -aktin	3,68 $\pm$ 0,03	2,83 $\pm$ 0,02	3,57 $\pm$ 0,03
Aktif Kaspaz-3/ $\beta$ -aktin	1,75 $\pm$ 0,03	4,95 $\pm$ 0,03	3,34 $\pm$ 0,04
P53/ $\beta$ -aktin	2,65 $\pm$ 0,02	4,31 $\pm$ 0,02	2,99 $\pm$ 0,02

**Tablo 6:** Bax, Bcl-2, Aktif Kaspaz-3 ve P53'e ait western blot değerlerinin ortalama  $\pm$  standart hata değerleri.



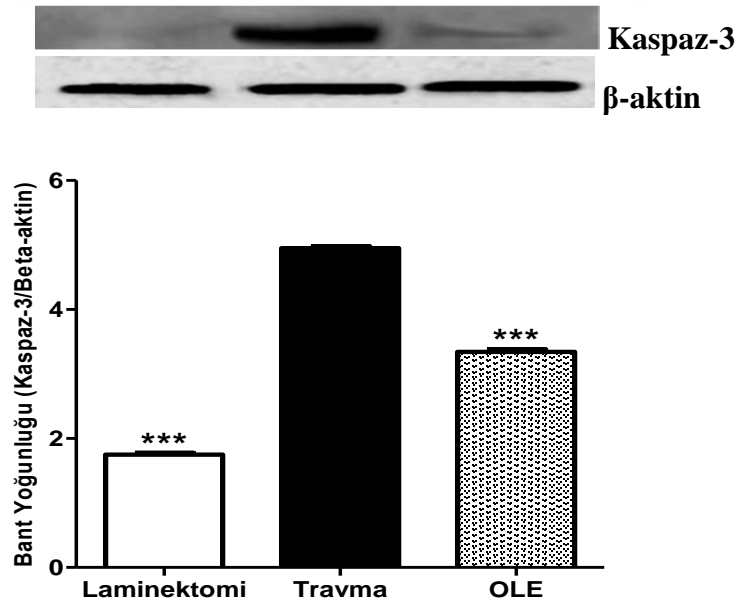
**Şekil 9:** Spinal kord örneklerinde Bax proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Çalışmamızda, laminektomi grubunda düşük seviyede bulunan Bax proteini, travma grubunda laminektomi grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeylere çıkmıştır (P<0.001). Bu da travma sonrasında apoptozun Bax artışına bağlı olarak arttığını göstermektedir. Travma oluşturulan sıçanlarda oleuropein uygulaması sonucunda, travma grubuna göre Bax düzeyleri anlamlı derecede düşüş göstermiştir (P<0.001) (Şekil 9).



**Şekil 10:** Spinal kord örneklerinde Bcl2 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Bcl-2 proteini antiapoptotik bir proteindir. Laminektomi grubunda bu protein miktarı normal seviyede iken, travma grubunda bu proteinin ekspresyonu anlamlı olarak düşmüştür (P<0.001). Travma sonrası oleuropein verilmiş olan grupta ise apoptozun azalmasına bağlı olarak Bcl-2 proteininin seviyesi anlamlı derecede artmıştır (P<0.001). (Şekil 10)

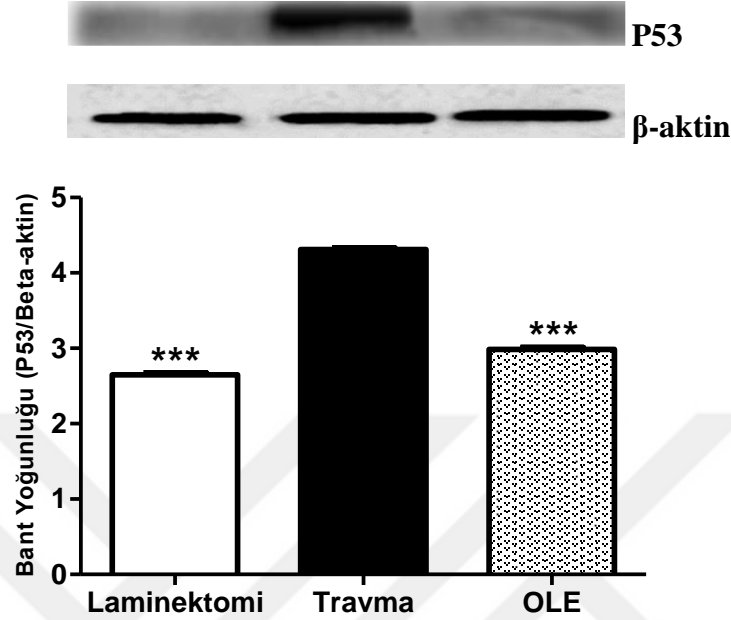


**Şekil 11:** Spinal kord örneklerinde kaspaz-3 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\*P<0.001, travma grubuna göre anlamlılık değeri.

Aktif Kaspaz-3, hücre döngüsünde bulunan önemli bir proteindir. Apoptozdan sorumlu olan bu protein kaspaz protein ailesinin bir üyesidir. Laminektomi grubunda aktif



kaspaz-3 proteini çok az miktarda eksprese edilmiştir. Travma grubunda aşırı derece eksprese edilmiş olan aktif kaspaz-3 proteini ( $P<0.001$ ), apoptozun artışı göstermektedir. Oleuropein grubunda aktif kaspaz-3 ekspresyonu anlamlı derecede azalmıştır ( $P<0.001$ ) (Şekil 11).



**Şekil 12:** Spinal kord örneklerinde P53 proteini anlatımının laminektomi, travma ve *oleuropein* (OLE) uygulanan gruplarda western blot yöntemiyle gösterilmesi. \*\*\* $P<0.001$ , travma grubuna göre anlamlılık değeri.

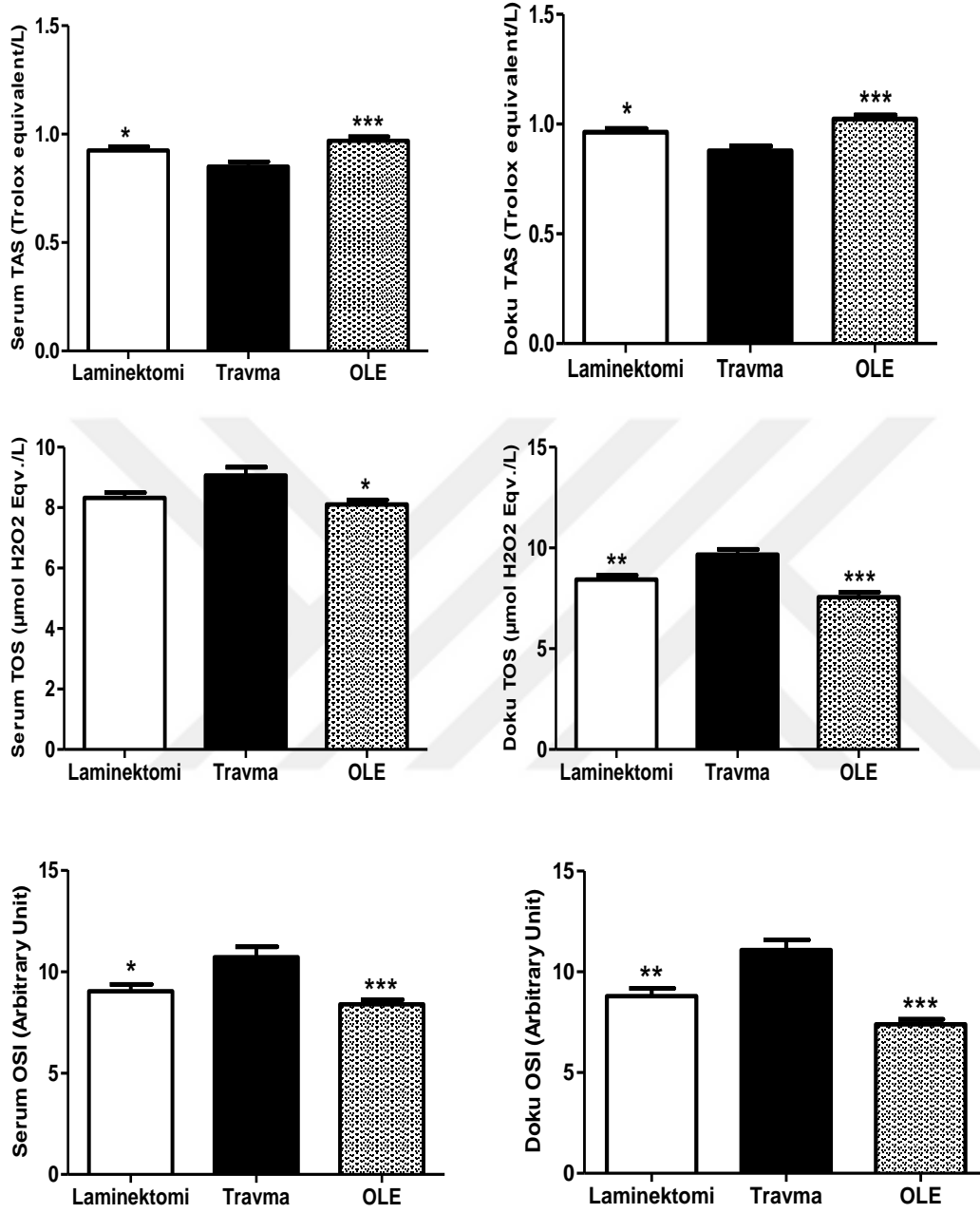
P53 apoptozu tetikleyen bir proteindir. Laminektomi grubunda bu protein miktarı normal seviyede iken, travma grubunda bu proteinin ekspresyonu anlamlı olarak artmıştır ( $P<0.001$ ). Travma sonrası oleuropein verilmiş olan grupta ise P53 proteininin seviyesi travma grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır ( $P<0.001$ ). (Şekil 12)

#### 4.4 BİYOKİMYASAL BULGULAR

##### 4.4.1 Total Antioksidan Kapasite (TAS), Total Oksidan Seviye (TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Bulguları

Çalışmamızda spinal kord doku örneklerinde ve serum örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri incelendi. Travma grubunda laminektomi grubuna göre TAS değerlerinin serum ve doku örneklerinin her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ( $P<0.05$ ), TOS ( $P<0.01$ ) ve OSI ( $P<0.01$ ) değerlerinin ise doku örneklerinde daha anlamlı olmak üzere arttığı belirlendi. OLE grubunda travma grubunda düşük olan TAS değerlerinin doku örneklerinde

daha fazla olmak üzere yükseldiği ( $P<0.001$ ), TOS ( $P<0.001$ ) ve OSI ( $P<0.001$ ) değerlerinin ise yine doku örneklerinde daha fazla olmak üzere düştüğü tespit edilmiştir (Şekil 13).



**Şekil 13:** Serum ve spinal kord örneklerinde total antioksidan kapasite (TAS), total oksidan kapasite (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , travma grubuna göre anlamlılık değeri.

## 5) TARTIŞMA

Teknoloji ve günümüz yaşam tarzı nedeniyle travma riski geçmişe nazaran artmıştır. Gelişmiş medikal ve cerrahi tedavi seçeneklerine rağmen spinal kord travmaya en hassas, tedaviye en dirençli anatomik yapılardandır. SKY; travma sırasında olan ve direkt hücre ölümü ve kanama gibi etkilerden oluşan primer hasarlanma ve sonrasında gelişen sekonder hasarlanma mekanizmalarını içerir. SKY'deki nörolojik disfonksiyona her iki mekanizma da sebep olmakla beraber araştırmaların çoğu önlenabilir, en azından azaltılabilir sekonder hasarın patofizyolojisini anlamaya ve SKY'yi takiben oluşan geç hücre kaybını azaltmaya odaklanmıştır.

SKY'nin akıbeti kalsiyum iyon kanalları, serbest oksijen radikallerinin tetiklediği lipid peroksidasyon, inflamatuvar reaksiyon, otoimmün cevap, vasküler olaylar ve apoptozdan oluşan hücre sel, moleküler ve biyokimyasal kaskadlar serisinin aracılık ettiği sekonder hasarın boyutuna bağlıdır (4-6). Sekonder hasar birkaç haftadan birkaç aya kadar sürmekte ve patofizyolojisinde inflamasyonun sebep olduğu değişiklikler etkili olmaktadır. İnflamasyon kritik bir süreç olup, kalan nöronların yenilenmesine engel olan kalıntıların temizlenmesini sağlar. Bununla birlikte inflamatuvar reaksiyonun aşırı aktivasyonu, sağlıklı dokuya zarar verip, yaralanma şiddetini arttırabilir. Bu yüzden SKY sonrası inflamasyonun ekzojen kontrolü önemli bir yer tutmaktadır.

Yapılan çalışmalarda spinal kordda travma ve iskemi gibi nöral doku hasarı yaratan patolojilerden sonra nekrotik dokuların nukleuslarından sitoplazmaya veya ekstrasellüler aralığa salınan HMGB-1 proteininin, proinflamatuvar sitokin salınımını tetiklediği ve inflamasyonun önemli medyatörlerinden biri olduğu gösterilmiştir. HMGB-1 erken beyin gelişimi sırasında MSS'nin kompleks zamansal ve uzaysal dağılımında rol oynar. Ön beyin gelişimi gibi süreçlerde kritik önemi olan nörit gelişimi ve hücre göçünü kolaylaştırır. HMGB-1 RA, SLE, hepatik iskemi ve reperfüzyon hasarı, nefrit gibi birçok hastalıkta ve SKY ile travmatik beyin hasarı sırasında TLR-2, TLR-4 ve RAGE gibi reseptörler üzerinden hücre sel sinyal iletişiyle inflamatuvar cevabı tetikler. HMGB-1'in RAGE ve TNF ekspresyonunu arttırdığı ve inflamatuvar reaksiyonlar aracılığıyla apoptozu tetiklediği gösterilmiştir (70).

Çalışmamızda, spinal kord örneklerinde HMGB-1, TLR4, RAGE ve NF- $\kappa$ B düzeyleri western blot ve immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. Travma grubunda,

laminektomi grubuna göre HMGB-1 (P<0.001), TLR4 (P<0.001), RAGE (P<0.001) ve NF-κβ (P<0.001) düzeylerinin anlamlı derecede arttığı belirlendi. Buna karşın OLE grubunda, HMGB-1 (P<0.001), TLR4 (P<0.001) ve RAGE (P<0.001) düzeylerinin travma grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi. OLE grubunda, NF-κβ düzeyleri travma grubuna göre belirgin azalmasına karşın, bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Oksidatif stres MSS'nin akut yaralanmaları, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok akut ve kronik hastalığın patofizyolojisinde rol oynar. Redoksun aktive ettiği transkripsiyon faktörü Nrf2'nin birçok organ ve hücre tipini toksik hasara karşı koruduğu gösterilmiştir. ROT, RNT üretimi ve artmış oksidatif stres birçok MSS hastalığının patofizyolojisinin merkezindedir (97). Oksidatif stres Alzheimer, Parkinson, ALS ve epilepsi gibi kronik nörolojik hastalıkların ana patofizyolojik özelliklerindedir (98, 99). İnme, travmatik beyin hasarı ve travmatik SKY gibi akut MSS yaralanmaları da artmış oksidatif stresle karakterizedir (100, 101). Bu yüzden akut ve kronik MSS hastalıklarında Nrf2 fonksiyonunu artırma endojen korumayı arttıran ortak tedavi stratejisidir. Epo ve melatonin Nrf2-ARE yolağı aktivitesini artırır ve nörolojik hastalıklarda faydalı etkiler sağlar. Tanımlanan Nrf2 aktivatörlerinin birçoğu kan beyin bariyerini geçemez ve bu onların MSS hastalıklarında kullanımını sınırlar (82).

Akut SKY hastalarında oksidatif stres geç nöron ve glia ölümüne sebep olur ve sekonder hasar kaskadında önemli bir yere sahiptir (102). SKY hastalarında travmadan sonra en az 1 yıl boyunca oksidatif stres artmış olarak saptanır (103). Nrf2 ve ana akım yönündeki genler SKY sonrası kompresyon ve kontüzyonda hızlıca artar (76, 104). Birçok yayın Nrf2-ARE yolağının akut SKY erken fazında, darbeden sonraki ilk 72 saat içinde aktive olduğunu göstermiştir (76, 104). Dahası Nrf2'nin indüksiyonu en az 42 gün sürmektedir ve travmanın 7. gününde geç pikini oluşturur (105). Bu araştırmalar Keap1-Nrf2-ARE yolağı artışının akut, subakut SKY ile sınırlı olmayıp iyileşmenin kronik döneminde de etkili olduğunu göstermiştir.

Nrf2 yetmezliği olan fareler SKY kompresyon ve kontüzyonu sonrası lokomotor fonksiyonda kalıcı bozulma gösterirler (76, 104, 105). SKY sonrası motor fonksiyondaki iyileşmeyi azaltan ana faktörlerden birisi oligodendrositlerin gecikmiş apoptotik ölümünden kaynaklanan demyelinizasyondur. Nrf2 gen ablasyonu demyelinizasyon artışı ile sonuçlanır (106).

İmmunhistokimyasal metodla yapılan ölçümlerde travmatik spinal kord hasarının Nrf2 düzeylerini arttırdığı (P<0.01), bu düzeylerin OLE uygulamasıyla travma grubuna göre daha

da yükseldiği belirlendi ( $P<0.001$ ). Western blot metoduyla yapılan ölçümlerde laminektomi grubu ile karşılaştırıldığında travma grubunda Nrf2 düzeylerinde daha fazla artış görülmüştür ( $P<0.001$ ). Bu durum travma sonrası oksidatif stresin artışı ve buna cevaben antioksidan sistemi aktive etmek üzere Nrf2 düzeylerinin artışıyla ilişkilidir. OLE grubunda travma grubuyla karşılaştırıldığında Nrf2 düzeylerinde anlamlı artış görülmüştür ( $P<0.001$ ). Araştırmalarımıza göre şu ana kadar spinal kord yaralanmasında oleuropein kullanımı ile Nrf2 düzeyleri arasındaki ilişki gösterilmemiştir. Çalışmamızda Oleuropein kullanımı ile Nrf2 düzeylerindeki artış ve TAS, TOS, OSI değerlerindeki antioksidan etki ortaya konmuştur.

Çalışmamızda ayrıca spinal kord doku örneklerinde ve serum örneklerinde total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksi (OSI) değerleri incelendi. Travma grubunda laminektomi grubuna göre TAS değerlerinin serum ve doku örneklerinin her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı ( $P<0.05$ ), TOS ( $P<0.01$ ) ve OSI ( $P<0.01$ ) değerlerinin ise doku örneklerinde daha anlamlı olmak üzere arttığı belirlendi. OLE grubunda travma grubunda düşük olan TAS değerlerinin doku örneklerinde daha fazla olmak üzere yükseldiği ( $P<0.001$ ), TOS ( $P<0.001$ ) ve OSI ( $P<0.001$ ) değerlerinin ise yine doku örneklerinde daha fazla olmak üzere düştüğü tespit edilmiştir.

Zeytinyağı oleuropein gibi fenolik içerikten zengin ve insan sağlığına birçok faydalı etkisi olan bir kaynaktır. Oleuropein'in hidrolizi hidroksitirozol ve tirozol gibi diğer fenoliklerin oluşumu ile sonuçlanır (93). Deneysel çalışmalar oleuropein ve hidroksitirozol gibi derivativlerinin yararlı etkilerini anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-karsinojenik, anti-mikrobiyal, anti-aterojenik ve antiviral özelliklerine bağlamaktadır (94-96). Bazı çalışmalar oleuropeinin lipoksijenaz aktivitesi ve lökotrien B4 üretimi üzerinden pro-inflamatuar sitokinlerin biyosentezini inhibe ederek anti-inflamatuar etki oluşturduğunu göstermiştir (107). Zeytinyağı fenollerinin mutlak nöroprotektif mekanizması bilinmemekle beraber anti-oksidatif anti-inflamatuar etkinin esas mekanizma olduğu kabul edilmektedir. TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$  gibi hasarlanma sonrası hemen sentezlenen güçlü pro-inflamatuar sitokinlerin travma sonrası hasarda etkin oldukları gösterilmiştir (108). TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$  damar geçirgenliği, inflammatuar hücrelerin çağrılması, hasar bölgesinde iNOS ve COX-2 indüksiyonu gibi birçok olayda etkindir. Bu bağlamda deneysel spinal kord yaralanması sonrası TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$ 'nin bloke edilmesinin fonksiyonel düzelmeye ve nöroproteksiyon sağladığı gösterilmiştir (109). TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$ 'nin diğer önemli bir rolü de iNOS indüklemesidir. iNOS NO üreten üç enzimden biridir.

NO serbest radikaldır ve travmatik SKY sonrası apoptoz ve sekonder inflamatuvar cevabın gelişiminde çok önemli role sahiptir. SKY sonrası oleuropein tedavisinin TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$  ekspresyonunu anlamlı miktarda azalttığı ve sonuç olarak iNOS ve COX-2 ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir (110). Zeytinyağı fenolik ürünleri travmaya cevaben inflamasyonu uyaran proinflamatuvar ajan IL-6'nın dolaşımdaki konsantrasyonunu da azaltmaktadır.

Spinal kord doku örneklerinde TUNEL metoduyla apoptoz değerlendirildi ve travma grubunda, laminektomi grubuna göre belirlenen alanda bulunan ortalama apoptotik hücre sayısının arttığı ( $P<0.001$ ); OLE grubunda ise travma grubuna göre apoptotik hücre sayısının anlamlı miktarda azaldığı ( $P<0.001$ ) ve bunun HMGB1 düzeyleriyle uyumlu olduğu belirlendi.

Araştırmalarımıza göre Oleuropein'in HMGB-1 düzeyine etkisiyle ilgili şu ana kadar hiçbir çalışma yapılmamıştır. SKY sonrası Oleuropein tedavisinin TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$  ekspresyonunu anlamlı miktarda azalttığı ve sonuç olarak iNOS ve COX-2 ekspresyonunun da azaldığı gösterilmiştir (110). Primer hasar sonrası nekrotik hücrelerden ortama salınan HMGB-1; TLR-2, TLR-4 ve RAGE gibi reseptörler üzerinden hücrelerel sinyal iletilmesiyle NF- $\kappa$ B'yi aktif hale getirerek mikroglia'yı aktive eder ve aktive mikroglia TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinleri salgılar. Bu sitokinlerin etkisiyle oluşan nöroinflamasyon da HMGB-1 salınımını artırır. Bu kısır döngü nedeniyle aşırı inflamatuvar yanıt oluşur ve nöronal hasara sebep olur. Salgılanan HMGB-1 düzeyleri apoptozis ve nöronal dejenerasyon ile koreledir. Biz bu çalışmayla Oleuropein'in TNF- $\alpha$  ve IL1- $\beta$  ekspresyonu üzerine olan etkisinin HMGB-1'i azaltıcı etkisiyle oluştuğunu ve böylece azalan iNOS ve COX-2 ekspresyonunun sonucu olarak da antioksidan etki oluşturduğunu ortaya koyduk.

Çalışmamızda apoptozu değerlendirmek için ayrıca western blot metoduyla Bax, p53, Bcl-2 ve Aktif Kaspaz-3 protein ekspresyonları bakılmıştır. Bax proteini, p53 adlı tümör baskılayıcı proteinin kofaktörü olma işlevine sahip, insanda bulunan bir proteindir. Bax geni, Bcl-2 gen ailesinin bir üyesidir. Bax, p53 aracılığıyla tetiklenir ve bulunduğu hücrenin apoptoza gidişini hızlandırır. Laminektomi grubunda düşük seviyede bulunan Bax proteini, travma grubunda laminektomi grubuna göre anlamlı derecede yüksek düzeylere çıkmıştır ( $P<0.001$ ). Bu da travma sonrasında apoptozun Bax artışına bağlı olarak arttığını göstermektedir. OLE grubunda ise travma grubuna göre Bax düzeyleri anlamlı derecede düşüş göstermiştir ( $P<0.001$ ). Bcl-2 proteini antiapoptotik bir proteindir. Laminektomi grubunda bu protein miktarı normal seviyede iken, travma grubunda bu proteinin ekspresyonu



## 6) SONUÇ

Bu çalışmada anti-enflamatuar ve antioksidan özelliği bilinen Oleuropein'in spinal kord yaralanması travma modelinde enflamasyonun önemli bir medyatörü olan HMGB-1 proteinini anlamlı düzeyde azalttığı ve antioksidan sistemi harekete geçiren Nrf2 proteinini anlamlı düzeyde arttırdığı bulunmuştur. Bunların neticesinde sekonder hasarın önemli sebeplerinden enflamasyon baskılanmakta ve oksidatif stres düzeyi düşmektedir. Böylece apoptoz miktarının azaldığı TUNEL metoduyla ve apoptoz belirteçlerinin düzeyleri ölçülerek gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada Oleuropein HMGB-1 üzerinden anti-enflamatuar; Nrf2 üzerinden antioksidan etki göstererek apoptoz ve sekonder hasarı azalttığı spinal kord ve serum örnekleri incelenerek gösterilmiştir. Bu sonuçlar Oleuropein'in spinal kord yaralanması tedavisinde etkin olabileceğini göstermiştir. Sonuçlarımız klinik çalışmalara ışık tutacaktır.



## 7) KAYNAKLAR

1. Kang N, Hai Y, Yang J, Liang F, Gao CJ. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF-kappaB signaling pathway. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(2):1141-53.
2. van den Berg ME, Castellote JM, Mahillo-Fernandez I, de Pedro-Cuesta J. Incidence of spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Neuroepidemiology*. 2010;34(3):184-92; discussion 92.
3. Chiu WT, Lin HC, Lam C, Chu SF, Chiang YH, Tsai SH. Review paper: epidemiology of traumatic spinal cord injury: comparisons between developed and developing countries. *Asia-Pacific journal of public health / Asia-Pacific Academic Consortium for Public Health*. 2010;22(1):9-18.
4. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999;44(5):1027-39; discussion 39-40.
5. Jazayeri-Shooshtari S, Namdar Z, Owji S, Mehrabani D, Mohammadi-Samani S, Tanideh N, et al. Healing effect of lamotrigine on repair of damaged sciatic nerve in rabbit. *Journal of Applied Animal Research*. 2009;36(2):243-9.
6. Rakei S, Abodolkarim R, Safarian A, Azarpira N, Mehrabani D. The Effect of BioGlue® on Cerebral Cortex in Experimental Rats. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2009;2009(1):61-5.
7. Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery*. 2006;59(5):957-82; discussion 82-7.
8. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2011;71(2):281-99.
9. Tator CH. Biology of neurological recovery and functional restoration after spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1998;42(4):696-707; discussion -8.
10. Tanhoffer RA, Yamazaki RK, Nunes EA, Pchevozniki AI, Pchevozniki AM, Nogata C, et al. Glutamine concentration and immune response of spinal cord-injured rats. *J Spinal Cord Med*. 2007;30(2):140-6.
11. Rossignol S, Schwab M, Schwartz M, Fehlings MG. Spinal cord injury: time to move? *J Neurosci*. 2007;27(44):11782-92.
12. Young W. Methylprednisolone and spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 2002;96(1 Suppl):141-2.
13. Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT. Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Experimental neurology*. 1999;158(2):351-65.
14. Ditor DS, Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. A therapeutic time window for anti-CD 11d monoclonal antibody treatment yielding reduced secondary tissue damage and enhanced behavioral recovery following severe spinal cord injury. *Journal of neurosurgery Spine*. 2006;5(4):343-52.
15. Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, et al. Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci*. 2000;20(14):5283-91.
16. Turrin NP, Rivest S. Molecular and cellular immune mediators of neuroprotection. *Molecular neurobiology*. 2006;34(3):221-42.
17. Hendrix S, Nitsch R. The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *Journal of neuroimmunology*. 2007;184(1-2):100-12.
18. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Kushimoto S, Johno M, et al. Role of neutrophils in spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*. 1997;79(4):1177-82.
19. Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH. Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *The European journal of neuroscience*. 1999;11(10):3648-58.
20. Anderson AJ. Mechanisms and pathways of inflammatory responses in CNS trauma: spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2002;25(2):70-9; discussion 80.

21. Popovich PG, Jones TB. Manipulating neuroinflammatory reactions in the injured spinal cord: back to basics. *Trends in pharmacological sciences*. 2003;24(1):13-7.
22. Schwartz M, Kipnis J. Protective autoimmunity: regulation and prospects for vaccination after brain and spinal cord injuries. *Trends in molecular medicine*. 2001;7(6):252-8.
23. Kipnis J, Mizrahi T, Hauben E, Shaked I, Shevach E, Schwartz M. Neuroprotective autoimmunity: naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells suppress the ability to withstand injury to the central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15620-5.
24. Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2009;47(4):333-43.
25. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Journal of Investigative Surgery*. 2003;16(3):127-40.
26. Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *Neurosurgery*. 1990;27(1):1-11.
27. Marzatico F, Cafe C. Oxygen radicals and other toxic oxygen metabolites as key mediators of the central nervous system tissue injury. *Functional neurology*. 1992;8(1):51-66.
28. Braughler JM, Hall ED. Central nervous systems trauma and stroke: I. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radical Biology and Medicine*. 1989;6(3):289-301.
29. Manwaring JD, Csallany AS. Malondialdehyde-containing proteins and their relationship to vitamin E. *Lipids*. 1988;23(7):651-5.
30. Hall ED, Springer JE. Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2004;1(1):80-100.
31. McTigue DM. Potential Therapeutic Targets for PPARgamma after Spinal Cord Injury. *PPAR research*. 2008;2008:517162.
32. 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.
33. Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT, Ellegala DB, et al. Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical neuropharmacology*. 2001;24(5):254-64.
34. Xu W, Chi L, Xu R, Ke Y, Luo C, Cai J, et al. Increased production of reactive oxygen species contributes to motor neuron death in a compression mouse model of spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2005;43(4):204-13.
35. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(14):1365-75.
36. Roseborough G, Lin R, Gao D, McHale A, Chen L, Williams GM, et al. DNA damage and repair in human spinal cord following ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research*. 2006;1(2):141-5.
37. Adams JM, Cory S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends in biochemical sciences*. 2001;26(1):61-6.
38. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2004;52(6):821-31.
39. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cellular signalling*. 2003;15(11):983-92.
40. Büki A, Povlishock J. All roads lead to disconnection?—Traumatic axonal injury revisited. *Acta neurochirurgica*. 2006;148(2):181-94.
41. Lewén A, Fujimura M, Sugawara T, Matz P, Copin J-C, Chan PH. Oxidative stress-dependent release of mitochondrial cytochrome c after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2001;21(8):914-20.
42. Schuler M, Green D. Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*. 2001;29(6):684-7.

43. 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. *Urological research*. 2004;32(3):204-8.
44. Rachmany L, Tweedie D, Rubovitch V, Yu Q-S, Li Y, Wang J-Y, et al. Cognitive impairments accompanying rodent mild traumatic brain injury involve p53-dependent neuronal cell death and are ameliorated by the tetrahydrobenzothiazole PFT- $\alpha$ . *PLoS one*. 2013;8(11):e79837.
45. Hains BC, Black JA, Waxman SG. Primary cortical motor neurons undergo apoptosis after axotomizing spinal cord injury. *The Journal of comparative neurology*. 2003;462(3):328-41.
46. 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.
47. Grossman SD, Rosenberg LJ, Wrathall JR. Temporal-spatial pattern of acute neuronal and glial loss after spinal cord contusion. *Exp Neurol*. 2001;168(2):273-82.
48. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1997;86(3):483-92.
49. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2004;4(4):451-64.
50. Kaymaz M, Emmez H, Bukan N, Dursun A, Kurt G, Pasaoglu H, et al. Effectiveness of FK506 on lipid peroxidation in the spinal cord following experimental traumatic injury. *Spinal Cord*. 2005;43(1):22-6.
51. Taoka Y, Okajima K, Uchiba M, Murakami K, Harada N, Johno M, et al. Activated protein C reduces the severity of compression-induced spinal cord injury in rats by inhibiting activation of leukocytes. *J Neurosci*. 1998;18(4):1393-8.
52. Guly HR, Bouamra O, Lecky FE. The incidence of neurogenic shock in patients with isolated spinal cord injury in the emergency department. *Resuscitation*. 2008;76(1):57-62.
53. Paterniti I, Genovese T, Crisafulli C, Mazzon E, Di Paola R, Galuppo M, et al. Treatment with green tea extract attenuates secondary inflammatory response in an experimental model of spinal cord trauma. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 2009;380(2):179-92.
54. Yakovlev AG, Faden AI. Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF- $\alpha$ , and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid*. 1994;23(2-3):179-90.
55. Chi L, Yu J, Zhu H, Li X, Zhu S, Li Z, et al. Dual neuronal response to tumor necrosis factor- $\alpha$  following spinal cord injury. *Neural Regeneration Research*. 2010;5:917-26.
56. Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  as a neuroprotective agent in the brain. *Acta neurobiologiae experimentalis*. 2008;68(4):526-34.
57. Genovese T, Mazzon E, Muià C, Patel NS, Threadgill MD, Bramanti P, et al. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;312(2):449-57.
58. Bianchi ME, Manfredi AA. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein at the crossroads between innate and adaptive immunity. *Immunological reviews*. 2007;220:35-46.
59. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine*. 2014;40:1-116.
60. Celona B, Weiner A, Di Felice F, Mancuso FM, Cesarini E, Rossi RL, et al. Substantial histone reduction modulates genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS biology*. 2011;9(6):e1001086.
61. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(2):170-8.

62. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192(4):565-70.
63. van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, Meijers JC, Akira S, Arnold B, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo. *Shock (Augusta, Ga)*. 2009;31(3):280-4.
64. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5425):248-51.
65. Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine & growth factor reviews*. 2006;17(3):189-201.
66. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81(1):1-5.
67. Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, Herbst R, Coyle AJ. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annual review of immunology*. 2010;28:367-88.
68. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual review of immunology*. 2011;29:139-62.
69. Esposito E, Genovese T, Caminiti R, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Melatonin reduces stress-activated/mitogen-activated protein kinases in spinal cord injury. *Journal of pineal research*. 2009;46(1):79-86.
70. Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, Souda M, Yoshida H, Kawahara K-i, et al. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. *Spine*. 2010;35(11):1109-15.
71. Huang Y, Xie K, Li J, Xu N, Gong G, Wang G, et al. Beneficial effects of hydrogen gas against spinal cord ischemia–reperfusion injury in rabbits. *Brain research*. 2011;1378:125-36.
72. Wang Q, Ding Q, Zhou Y, Gou X, Hou L, Chen S, et al. Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2009;110(6):1279-86.
73. Kikuchi K, Kawahara K-i, Biswas KK, Ito T, Tanchaen S, Morimoto Y, et al. Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;385(2):132-6.
74. Faraco G, Fossati S, Bianchi M, Patrone M, Pedrazzi M, Sparatore B, et al. High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry*. 2007;103(2):590-603.
75. Mao L, Wang H, Wang X, Liao H, Zhao X. Transcription factor Nrf2 protects the spinal cord from inflammation produced by spinal cord injury. *Journal of Surgical Research*. 2011;170(1):e105-e115.
76. Mao L, Wang HD, Wang XL, Tian L, Xu JY. Disruption of Nrf2 exacerbated the damage after spinal cord injury in mice. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2012;72(1):189-98.
77. Kanninen K, Heikkinen R, Malm T, Rolova T, Kuhmonen S, Leinonen H, et al. Intrahippocampal injection of a lentiviral vector expressing Nrf2 improves spatial learning in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(38):16505-10.
78. Leinonen HM, Kansanen E, Polonen P, Heinaniemi M, Levonen AL. Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Advances in cancer research*. 2014;122:281-320.
79. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007;39(1):44-84.
80. Kensler TW, Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 2010;31(1):90-9.
81. Padmanabhan B, Tong KI, Ohta T, Nakamura Y, Scharlock M, Ohtsuji M, et al. Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Molecular cell*. 2006;21(5):689-700.

82. Zhang M, An C, Gao Y, Leak RK, Chen J, Zhang F. Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection. *Progress in neurobiology*. 2013;100:30-47.
83. Bunge RP, Puckett W, Becerra J, Marcillo A, Quencer R. Observations on the pathology of human spinal cord injury. A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination. *Advances in neurology*. 1993;59:75.
84. Bunge RP, Puckett WR, Hiester ED. Observations on the pathology of several types of human spinal cord injury, with emphasis on the astrocyte response to penetrating injuries. *Advances in neurology*. 1997;72:305.
85. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*. 2006;129(12):3249-69.
86. McTigue DM, Popovich PG, Jakeman LB, Stokes BT. Strategies for spinal cord injury repair. *Progress in brain research*. 2000;128:3-8.
87. Metz GA, Curt A, van de Meent H, Klusman I, Schwab ME, Dietz V. Validation of the weight-drop contusion model in rats: a comparative study of human spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2000;17(1):1-17.
88. Gerber AM, Corrie WS. Effect of impounder contact area on experimental spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1979;51(4):539-42.
89. Wrathall JR, Pettegrew RK, Harvey F. Spinal cord contusion in the rat: production of graded, reproducible, injury groups. *Exp Neurol*. 1985;88(1):108-22.
90. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical neurology*. 1978;10(1):38-43.
91. Krishna V, Andrews H, Jin X, Yu J, Varma A, Wen X, et al. A contusion model of severe spinal cord injury in rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(78).
92. Anderson TE. A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion. *Journal of neuroscience methods*. 1982;6(4):327-33.
93. Visioli F, Bernardini E. Extra virgin olive oil's polyphenols: biological activities. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(8):786-804.
94. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Medicinal research reviews*. 2002;22(1):65-75.
95. Cicerale S, Lucas L, Keast R. Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International journal of molecular sciences*. 2010;11(2):458-79.
96. Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia pharmaceutica*. 2010;78(2):133-54.
97. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2004;58(1):39-46.
98. Ferreira MES, de Vasconcelos AS, da Costa Vilhena T, da Silva TL, da Silva Barbosa A, Gomes ARQ, et al. Oxidative stress in Alzheimer's disease: should we keep trying antioxidant therapies? *Cellular and molecular neurobiology*. 2015;35(5):595-614.
99. Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular medicine*. 2014;16(2):217-30.
100. Bains M, Hall ED. Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1822(5):675-84.
101. Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochemistry international*. 2013;62(5):712-8.
102. Hall ED, Wang JA, Bosken JM, Singh IN. Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 2015.
103. Bastani NE, Kostovski E, Sakhi AK, Karlsen A, Carlsen MH, Hjeltnes N, et al. Reduced antioxidant defense and increased oxidative stress in spinal cord injured patients. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2012;93(12):2223-8.e2.
104. Wang X, de Rivero Vaccari JP, Wang H, Diaz P, German R, Marcillo AE, et al. Activation of the nuclear factor E2-related factor 2/antioxidant response element pathway is neuroprotective after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(5):936-45.

105. Pomeshchik Y, Kidin I, Savchenko E, Rolova T, Yamamoto M, Levonen A-L, et al. Does Nrf2 gene transfer facilitate recovery after contusion spinal cord injury? *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(8):1313-23.
106. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, McTigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.
107. de la Puerta R, Ruiz Gutierrez V, Hoult JR. Inhibition of leukocyte 5-lipoxygenase by phenolics from virgin olive oil. *Biochemical pharmacology*. 1999;57(4):445-9.
108. Hayashi M, Ueyama T, Nemoto K, Tamaki T, Senba E. Sequential mRNA expression for immediate early genes, cytokines, and neurotrophins in spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2000;17(3):203-18.
109. Genovese T, Mazzon E, Crisafulli C, Di Paola R, Muia C, Bramanti P, et al. Immunomodulatory effects of etanercept in an experimental model of spinal cord injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;316(3):1006-16.
110. Khalatbary AR, Zarrinjoei GR. Anti-inflammatory effect of oleuropein in experimental rat spinal cord trauma. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2012;14(4):229-34.

