



**T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA OMURİLİK YARALANMALARINDA  
COX-2 SELEKTİF İNHİBİTÖRÜ  
PARECOXİB ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. ULAŞ YÜKSEL**

**UZMANLIK TEZİ**

**KIRIKKALE**

**2016**



**T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**RATLARDA OMURİLİK YARALANMALARINDA  
COX-2 SELEKTİF İNHİBİTÖRÜ  
PARECOXİB ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DR. ULAŞ YÜKSEL**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**DOÇ. DR. BÜLENT BAKAR**

**KIRIKKALE**

**2016**

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>Sayfa</b>
KISALTMALAR	7
GRAFİK BAŞLIKLARI	9
RESİM BAŞLIKLARI	10
ŞEKİL BAŞLIKLARI	11
TABLO BAŞLIKLARI	12
ÖZET	16
ABSTRACT	18
<b>1. GİRİŞ</b>	19
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	21
<b>2.1. Epidemiyoloji</b>	21
<b>2.2. Kısa tarihçe</b>	21
<b>2.3. Omurilik embriyolojisi ve anatomisi</b>	21
<b>2.4. Omurilik yaralanmalarında deneysel modeller</b>	22
<b>2.5. Omurilik yaralanmalarında patofizyoloji</b>	24
<b>2.5.1. Primer hasar mekanizmaları</b>	24
<b>2.5.2. Sekonder hasar mekanizmaları</b>	25
<b>2.5.3. Myeloperoksidasyon mekanizmaları</b>	28
<b>2.5.4. Lipid peroksidasyon mekanizmaları</b>	29
<b>2.5.5. Siklooksijenaz (COX) yolağı</b>	30
<b>2.5.6. Apoptoz mekanizmaları</b>	31
<b>2.5.7. Omurilik yaralanmalarında bazı sitokinler</b>	32
<b>2.6. Omurilik yaralanmalarında medikal tedaviler</b>	33
<b>2.6.1. Akut tedaviler</b>	33
<b>2.6.2. Kronik tedaviler</b>	34
<b>2.6.3. Omurilik hasarında potansiyel olarak etkili olabilecek ilaçlar</b>	34
<b>2.6.4. Metilprednizolon</b>	35
<b>2.6.5. Parecoxib</b>	37
<b>3. MATERYAL VE METOT</b>	39
<b>3.1. Materyal</b>	39
<b>3.2. Omurilik yaralanması modeli</b>	40
<b>3.3. Histopatolojik inceleme</b>	42
<b>3.4. Biyokimyasal inceleme</b>	43
<b>3.5. “Real time PCR array” gen ekspresyon analizi</b>	44
<b>3.6. İstatistiksel analiz</b>	46
<b>4. BULGULAR</b>	48
<b>4.1. Akut döneme ait bulgular</b>	48
<b>4.1.1. Işık mikroskopisi</b>	48
<b>4.1.2. Histopatolojik inceleme</b>	50
<b>4.1.3. Biyokimyasal inceleme</b>	52
<b>4.1.4. PCR gen ekspresyon analizi</b>	56
<b>4.2. Subakut döneme ait bulgular</b>	59

4.2.1. Işık mikroskopisi	59
4.2.2. Histopatolojik inceleme	61
4.2.3. Biyokimyasal inceleme	63
4.2.4. PCR gen ekspresyon analizi	67
4.3. Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması	70
5. TARTIŞMA	71
5.1. Histopatolojik inceleme sonuçları	71
5.2. Biyokimyasal inceleme sonuçları	73
5.3. PCR gen ekspresyon analizi sonuçları	78
5.4. Çalışmanın limitasyonları	81
6. SONUÇLAR	82
KAYNAKLAR	86



**T.C.**  
**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**NÖROŞİRÜRJİ ANABİLİM DALI**

Nöroşirürji Anabilim Dalı uzmanlık programı çerçevesinde yürütülmüş olan “*Ratlarda omurilik yaralanmalarında COX-2 selektif inhibitörü parecoxib etkilerinin araştırılması*” isimli bu deneysel çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **UZMANLIK TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01.11.2016

Prof. Dr. M. Faik Özveren  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroşirürji Anabilim Dalı  
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Bülent Bakar  
Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroşirürji Kliniği

Yard. Doç. Dr. Ziya Asan  
Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Nöroşirürji Anabilim Dalı

## TEŞEKKÜR

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak bulunduğum süre içerisinde bilgi ve tecrübelerini bana aktaran çok değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail Semih Keskil' e, Prof. Dr. Hakan Murat Göksel' e, Prof. Dr. Mehmet Faik Özveren'e, Doç. Dr. Bülent Bakar' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa Ömür Kasımcı' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa Ögden' e, Yard. Doç. Dr. Mehmet Hüseyin Akgül' e teşekkürü borç bilirim.

Uzmanlık bitirme tezimin danışmanlığında, yürütülmesinde ve sonlandırılmasında aktardığı tecrübe ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Bülent Bakar'a teşekkür ederim. Ayrıca tezimin tamamlanmasında emekleri geçen Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü' nden Prof. Dr. Üçler Kısa' ya, Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Meslek Yüksekokulu'ndan Moleküler Biyolog Yard. Doç. Dr. Fatma Azize Budak Yıldırım' a, Aksaray Üniversitesi Eski Meslek Yüksek Okulu Laborant ve Veteriner Sağlık Programı Bölümü' nden Veteriner Patolog Yard. Doç. Dr. Güngör Çağdaş Dinçel' e teşekkür ederim.

Çalıştığım süre boyunca yardım ve desteklerini benden esirgemeyen Uzm. Dr. İbrahim Akkurt'a, Araş. Gör. Dr. Egemen Nursoy' a, Sağlık Memuru Neşet Bozbıyık'a, Hemşire Tuba Yaka' ya ve Hemşire Tuba Pamuk' a teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip bu günlere gelmemi sağlayan sevgili annem ve babama, hayatın iyi ve kötü günlerini benimle paylaşan, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Uzm. Dr. Dilek Yüksel' e teşekkür ederim.

## **KISALTMALAR**

ANOVA	: Varyans analizi (analyses of variances)
BAP	: Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi
BBB	: Kan-beyin bariyerini (blood-brain barrier)
BOS	: Beyin-omurilik sıvısı
c5a	: Kompleman-5a (compleman-5a)
COX	: Sikoloksijenaz (cyclooxygenase)
df	: Serbestlik dereceleri (degrees of freedom)
ECM	: Ekstrasellüler matriks
Gm	: Gangliozid
H&E	: Hematoksilen-eosin
HOCl	: Hipoklorik asit
IFN- $\gamma$	: Interferon-gamma
IL	: Interlökin
LT	: Lökotrien
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks metalloproteinazları
MP	: Metilprednizolon
MPO	: myeloperoksidaz
N	: Denek sayısı
NASCIS	: National Acute Spinal Cord Injury Study
NK	: Natural killer
NO	: Nitrik Oksit
PCR	: Polimerize zincir reaksiyon (Polymerized Chain Reaction)

PG	: Prostaglandin
ROS	: Reaktif oksijen ürünleri (Reactive Oxygen Species)
S1P	: Sfingosin-1-fostat
SOD	: Süperoksid dismutaz
SPSS	: Statistical Packages for the Social Science
SS	: Standart sapma
TGF- $\beta$	: Transforme edici büyüme faktörü-beta (Transforming Growth Factor-beta)
TIMP	: Metalloproteinaz doku inhibitörü (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase)
TNF- $\alpha$	: Tümör nekrozis faktör-alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha)
TXA	: Tromboksan (Thromboxane)
X <sup>2</sup>	: Ki-kare
Z	: Z puanı



## **GRAFİK BAŞLIKLARI**

**Grafik 1:** Akut döneme ait histopatolojik evreleme puanları bar grafiği

**Grafik 2:** Akut dönem gruplarına ait malondialdehid düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehit)

**Grafik 3:** Akut dönem gruplarına ait caspase-3 düzeyi değerleri grafiği

**Grafik 4:** Akut dönem gruplarına ait myeloperoksidasyon düzeyi değerleri grafiği (MPO: myeloperoksidasyon)

**Grafik 5:** Akut dönem gruplarına ait TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)

**Grafik 6:** Akut dönem gruplarına ait TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

**Grafik 7:** Subakut döneme ait histopatolojik evreleme puanları bar grafiği

**Grafik 8:** Subakut dönem gruplarına ait malondialdehid düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehit)

**Grafik 9:** Subakut dönem gruplarına ait caspase-3 düzeyi değerleri grafiği

**Grafik 10:** Subakut dönem gruplarına ait myeloperoksidasyon düzeyi değerleri grafiği (MPO: myeloperoksidasyon)

**Grafik 11:** Subakut dönem gruplarına ait TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)

**Grafik 12:** Subakut dönem gruplarına ait TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

## **RESİM BAŞLIKLARI**

**Resim 1:** Omurilik yaralanmasının deneysel olarak oluşturulma aşamaları ve deney sonunda deneğin makroskopik görüntüsü

**Resim 2:** KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

**Resim 3:** SHAM grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

**Resim 4:** MP-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

**Resim 5:** PX-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

**Resim 6:** MPPX-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

**Resim 7:** SHAM-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

**Resim 8:** MP-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

**Resim 9:** PX-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

**Resim 10:** MPPX-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1:** Metilprednizolon isimli farmakolojik ajanın moleküler yapısının şematik görünümü

**Şekil 2:** Parecoxib isimli farmakolojik ajanın moleküler yapısının şematik görünümü



## TABLO BAŞLIKLARI

**Tablo 1:** Akut döneme ait histopatolojik evreleme sonuçlarının tanımlayıcı tablosu

(N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

**Tablo 2:** Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı.

*Kruskal Wallis* testi;  $p < 0.05$  ( $X^2$ : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

**Tablo 3:** Histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında grupların verileri arasında fark saptanmadı.

*Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi;  $p < 0.005$  (Z: Z puanı)

**Tablo 4:** Akut dönemde yapılan biyokimyasal inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı

tablo (N: grup içi denek sayısı; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon; SS: standart sapma)

**Tablo 5:** Akut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarının gruplar arası

karşılaştırma sonuçları tablosu. *One-Way ANOVA* testi,  $p < 0.05$  (df: degrees of freedom; F: F değeri)

**Tablo 6:** Akut döneme ait MDA değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu *One-*

*Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi,  $p < 0.05$  (MDA: malondialdehit)

**Tablo 7:** Akut döneme ait caspase-3 değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu

*One-Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi,  $p < 0.05$

**Tablo 8:** Akut döneme ait MPO değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu *One-*

*Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi,  $p < 0.05$  (MPO: myeloperoksidasyon)

**Tablo 9:** Akut dönemde yapılan PCR gen ekspresyon inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

**Tablo 10:** Tüm grupların PCR gen ekspresyon analizi sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One Way-ANOVA* testi;  $p < 0.05$  (df: serbestlik dereceleri)

**Tablo 11:** TNF- $\alpha$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında veriler arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p < 0.05$  (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)

**Tablo 12:** TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında KONTROL/MP-A, SHAM-A/MP-A ve MP-A/ MPPX-A gruplarının verileri arasında fark olduğu saptandı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p < 0.05$  (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta).

**Tablo 13:** Subakut dönemde elde edilen histopatolojik evreleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

**Tablo 14:** Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi;  $p < 0.05$  ( $X^2$ : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

**Tablo 15:** Subakut söneme ait histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında grupların verileri arasında istatistiksel fark saptanmadı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi;  $p < 0.005$  (Z: Z puanı)

**Tablo 16:** Subakut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon; SS: standart sapma)

**Tablo 17:** Subakut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarının gruplar arası karşılaştırma sonuçları tablosu. *One-Way ANOVA* testi,  $p<0.05$ . (df: degrees of freedom; F: F değeri; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon)

**Tablo 18:** Subakut döneme ait MDA değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p<0.05$  (MDA: malondialdehit)

**Tablo 19:** Subakut döneme ait MPO değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p<0.05$

**Tablo 20:** Subakut dönemde yapılan PCR gen ekspresyon inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

**Tablo 21:** Subakut döneme ait grupların PCR gen ekspresyon analizi sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One Way-ANOVA* testi;  $p<0.05$  (df: serbestlik dereceleri; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

**Tablo 22:** TNF- $\alpha$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında SHAM-S grubu verileri ile diğer tüm grupların verileri arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. *One Way-*

*ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi; p<0.05 (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)*

**Tablo 23:** TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmadı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi; p<0.05 (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)*

**Tablo 24:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların histopatolojik evreleme verilerinin ikili karşılaştırma tablosu. *Mann Whitney U testi, p<0.05 (Z: Z skoru)*

**Tablo 25:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların biyokimyasal verilerinin ikili karşılaştırma tablosu. *Independent Samples t testi, p<0.05 (MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon)*

**Tablo 26:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının ikili karşılaştırma tablosu. *Independent Samples t testi, p<0.05 (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)*

## ÖZET

Omurilik yaralanmaları halen tedavi edilemeyen ancak rehabilite edilebilen bir süreçtir. Omurilik yaralanmalarındaki ikincil hasarın erken inflamatuvar yanıtta kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada metilprednisolon ve parecoxib isimli ilaçların olası iyileştirici etkileri araştırılmıştır.

Çalışma 300-350 gram erkek 54 Wistar Albino rat üzerinden yürütüldü. Ratlar KONTROL grubu, akut dönem ve subakut dönem olmak üzere üç ana gruba ayrıldı. KONTROL grubu hariç deneklerin omuriliğine T7-8 laminektomi sonrası 1 dakika süreyle “geçici vasküler anevrizma klibi” konulup omurilik hasarı oluşturuldu. Dört saat sonra KONTROL ve SHAM grubu hariç deneklere ilaçlar intraperitoneal verildi. Akut döneme ait denekler 72 saat ve subakut döneme ait denekler 7 gün sonunda sakrifiye edildi.

Parecoxibe ve metilprednizolonun tek başına ve diğeri ile birlikte verildiği koşulda ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait histopatolojik bulguları düzeltmediği saptandı. Biyokimyasal analizlerde iki ilacın tek başına veya birlikte kullanımının ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının akut ve subakut dönemine ait malondialdehit, caspase-3 ve myeloperoksidaz düzeylerini azaltıcı etkiye sahip olmadığı tespit edildi. Parecoxibe ve metilprednizolonun tek başına ve diğeri ile birlikte verildiği koşulda ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut döneminde TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeylerinin azalttığı ancak akut dönemde bu ilaçların bu sitokin üzerinde etkisinin olmadığı saptandı. Her ne kadar metilprednizolon yaralanmanın akut döneminde TGF-1 $\beta$  gen ekspresyonunu artırıyor olsa da bu ilaçların subakut dönemde bu sitokin üzerinde etkisinin olmadığı gözlemlendi.



Sonuç olarak ratlarda oluşturulan omurilik yaralanması modelinde her iki ilacın tek başına veya diğeri ile kombine kullanımında tedavi edici etkilerinin olmadığı düşünöldü.

**Anahtar kelimeler:** caspase-3, ikincil yaralanma, malondialdehit, metilprednizolon, myeloperoksidaz, omurilik yaralanması, parecoxib, TGF-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$



## ABSTRACT

Today spinal cord injury (SCI) could rehabilitate but not treat adequately. It has been thought secondary injury may be initiated by early inflammatory process. This study was conducted to investigate possible beneficial effects of methylprednisolone and parecoxib in treatment of SCI.

Fifty four male Wistar albino rats were divided into CONTROL, acute and subacute stage groups. Then, to develop SCI temporary aneurysm clip was attempted to their spinal cord after T7-8 laminectomy and four hours later experimental drugs were administered to rats intraperitoneally except CONTROL and SHAM groups. Acute stage animals were sacrificed 72 hours later and subacute stage animals were sacrificed 7 days later for histopathological and biochemical investigation and for gene expression analyses.

Parecoxibe and methylprednisolone and their combination could not improve histopathological grades in any stage properly. They also could not decrease malonyldialdehyde, caspase-3, myeloperoxidase levels in any stage. Parecoxib and methylprednisolone could decrease the TNF- $\alpha$  gene expression in subacute stage but not affect in acute stage. Although methylprednisolone could increase TGF-1 $\beta$  gene expression levels in acute stage, they could not effect to this cytokine in subacute stage.

As conclusion both experimental drugs or their combination had not any beneficial effect in SCI model in rat.

**Key word:** caspase-3, malonedialdehyde, methylprednisolone, myeloperoxidase, parecoxib, secondary injury, spinal cord injury, TGF-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$

## 1. GİRİŞ

Dünya üzerinde omurilik yaralanması oranı yılda 23/1.000.000 civarında olup burada sıklığı erkek cinsiyet oluşturmaktadır. Bu yaralanmaların çoğu trafik kazaları ve yüksekte düşmeler nedeniyle ortaya çıkmaktadır.

*Birincil hasar* yaralanma anında olup nöronal makaslanma, yırtılma, distraksiyon ve kompresyon gibi omurilik üzerine doğrudan uygulanan mekanik kuvvetlerin neden olduğu nöral ve glial hücre ölümünden ve vasküler yapıların rastgele parçalanmasından kaynaklanır. SKY' deki birincil hasar, daha sonra hasarlanmanın büyümesine neden olacak sekonder hasarın oluşmasında çekirdek işlevi görür. Vasküler yapıların rastgele hasarı sonrası meydana gelen kan akımı kesilmesi hipoksi ve iskemi ile birlikte lokal enfarkt oluşmasını sağlar. Hasarlanan alandan geçen nöral yapılar ve özellikle aksonlar fiziksel olarak kesintiye uğrar ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Yaralanma sonrası ilk 2 saatte ortaya çıkan interlokinler (özellikle interlökin-1 $\alpha$  ve -1 $\beta$ ) güçlü kemoatraktan maddeler olup yaralı dokuya ilk 48 saat içinde nötrofil ve monosit ağırlıklı inflamatuvar hücre infiltrasyonuna neden olur. Hem interlökinler ve hem de siklooksijenaz enzimleri yaralanma sonrası ilk 48 saatte yaralı dokuda prostaglandinlerin (özellikle PGE2) sentezini ve salınımını artırır ki bunlar da adenilat siklaz üzerinden fosfoinositolleri ve hücre içi kalsiyumu artırır. Bu artışı aspartat ve glutamat gibi nöroeksitatör aminoasitlerin ortama salınması takip eder ve bu nöral dokuda hasarı artırıcı bir faktördür. Öte yandan omurilik ve periferik sinir hasarlarında gelişen santral nöropatik ağrı fizyopatolojisinde de bu enzimin aktivasyon artışı sorumlu tutulmaktadır. Gelişen ödem ve ortama gelen makrofajlar da sinir iletiminin bozulmasına katkıda bulunur. Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşsüz hasarının ilk

saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat içerisinde geri dönüşsüz hasarlandığı düşünölmektedir. İkincil hasarın patofizyolojisini anlamaya yönelik yapılan hayvan deneyi çalışmalarından elde edilen bulgular yıkımın mikrovasküler perfüzyonda değişim, serbest radikal üretimi ve lipit peroksidasyon, nekrotik ve apoptotik hücre ölümü ve iyonik hemostazın bozulması sonucu ortaya çıktığını göstermiştir. Bu deneysel modellerde yaralanma sonrası ortaya çıkan süreçlerde en önemli rolü nötrofillerin ve makrofajların aldığı da tespit edilmiştir.

Diğer yandan omurga biyomekaniği araştırmalarında ve cerrahi tekniklerde ilerlemelere ve rehabilitasyon sürecindeki gelişmelere rağmen omurilik hasarını onaracak ve nörolojik iyileşme sağlayacak bir tedavi yöntemi konusunda henüz belirgin bir ilerleme sağlanamamıştır. Omurilik yaralanmalarında günümüze kadar uygulanan başlıca medikal tedaviler şunlardır: Akut tedaviler (antioksidanlar, nörotransmitter reseptör blokerleri, fosfokinaz stimulatörleri, fosfataz inhibitörleri); kronik tedaviler (büyüme ve büyümeyi inhibe eden faktör blokerleri, intraselüler haberci modölatörler, nakledilebilen hücreler veya materyaller) ve potansiyel olarak etkili olabilecek ilaçlar (metilprednizolon, ganglioizid (Gm-1), larazoidler, opiyat antagonistleri, eksitatör aminoasit antagonistleri, kalsiyum kanal blokerleri, potasyum kanal blokerleri, serbest radikal tutucuları, antiinflamatuvar ajanlar, nörotransmitter reseptör agonistleri, nörotropik faktörler, fetal doku transplantasyonu, nötralizan antikolar, melatonin, hiperbarik oksijen, sistemik hipotermi, minosiklin, eritropoetin, vd). Sonuç olarak omurilik yaralanmaları günümüzde halen tedavi edilemeyen ancak rehabilite edilebilen bir süreçtir.

Bu deneysel çalışma etkin bir çözüm bulmaya yönelik olarak hazırlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Epidemiyoloji

Dünya üzerinde omurilik yaralanması oranı yılda 23/1.000.000 civarında olup burada sıklığı erkek cinsiyet oluşturmaktadır. Bu yaralanmaların çoğu trafik kazaları ve yüksekten düşmeler nedeniyle ortaya çıkmaktadır (44). Omurilik yaralanmalarında en sık yaralanan bölge servikal ve torakal bölgeler olup klinikte sıklıkla tetrapleji ve parapleji ile sonuçlanmaktadır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada omurilik hasarı insidansı 12.7/1.000.000 (erkek/kadın oranı 2.5/1; tetrapleji gelişme oranı % 32.18; parapleji gelişme oranı % 67.18) olarak bildirilmektedir (24). Bir başka çalışmada ise vakaların büyük çoğunluğunu genç erkeklerin oluşturduğu (ortalama yaş: 33,4±15,0; %73 erkek, %27 kadın) ve vakalarda birincil nedenin motorlu araç kazaları (%35,1) ve ikincil nedenin ise yüksekten düşme (%18.8) olduğu tespit edilmiştir (50).

### 2.2. Kısa tarihçe

Omurilik hasarı ile ilgili bulgular antik döneme kadar (M.Ö 3000-2500) uzanmakta ve Mısırlı cerrahlarca yazılan *Edwin Smith Papirüs*'de rastlanmaktadır (54). Hipokrat ise yaklaşık M.Ö 400 yıllarında paraplejiyi tarif etmiş ve sonraki yıllarda *Aulus Cornelius Celcius* tarafından bildirilen ve yaralanma sonrası oluşan spinal deformitelerin düzeltilmesi amacıyla kullanılan bir traksiyon cihazı geliştirilmiştir (33). *Galen* ise deneysel olarak kesilen medulla segmentinin altında duyu ve hareket kaybı olduğunu bildirmiştir (46).

### 2.3. Omurilik embriyolojisi ve anatomisi

Embriyonik dönemin 3. haftasında ektodermin kalınlaşmasını takiben ektodermin altında yer alan notokord ve mezodermin indüklenmesi sonrası nöral

plak oluşur ve bu plaktan nöral tüp ve krista nöralis gelişir (11). Nöral tüp merkezi sinir sistemine zemin hazırlarken krista nöralis de periferik sinir sistemine farklılaşır. Omuriliğin ortalama uzunluğu erkeklerde 45 cm, kadınlarda 42-43 cm ve ağırlığı ise yaklaşık 30 gramdır. Omurilik atlas'ın üst kenarı ile L1- L2 vertebra arasında uzanır ve vertebral kanalın üst 2/ 3'ünde yer alır. Omurilik dıştan içe doğru dura, araknoid ve pia olarak adlandırılan membranlarla örtülü olup dura ve araknoid zarlar arasında subdural aralık yer alır. Araknoid ve pia zarları arasını içinde beyin omurilik sıvısı (BOS) dolaşan subaraknoid aralık yer alır. Omurilikten 8 servikal, 12 torakal, 5 lumbar, 5 sakral ve 1 koksigeal spinal sinir çifti çıkar. Omuriliğin kendisi gri ve beyaz maddeden oluşur. **Gri madde** (*substantia grisea centralis*) simetrik iki bölüm içerir. Bunlar çıplak gözle görülebilen santral kanalın içinden geçtiği transvers komissur tarafından birleştirilir. Anterior ve posterior kolonlar olarak bölümlere ayırır. İki ventral kolu anterior gri boynuz, iki dorsal kolu posterior gri boynuz, daha küçük lateral yansımaları lateral gri boynuzlar olarak adlandırılır. Merkezindeki küçük boşluk santral kanaldır. Gri madde destek doku ve nöron hücre cisimciklerinden oluşur. Fonksiyonel olarak ventral taraf motor ve dorsal taraf duyuşal sinir liflerini içermektedir **Beyaz madde** (*substantia alba*) ise süngerimsi bir nöroglia ağının içine gömülmüş olan sinir hücrelerinden oluşmuştur. Anterior, posterior ve lateral olmak üzere 3 funikulusa ayrılır. Duyuşal liflerin asendan yolunu ve motor liflerin desendan yolunu birleştirir. Omurilik kesitlerinde bir ventral, bir dorsal ve iki lateral olmak üzere dört kolon olarak gözlenir (18).

#### **2.4. Omurilik yaralanmalarında deneysel modeller**

Günümüze kadar insan omurilik yaralanmasını taklit edebilecek, tanı ve tedavide gelişmeler sağlanmasında yardımcı olabilecek birçok deneysel omurilik

yaralanma modeli geliştirilmiştir. İlk kez *Allen* 1911 yılında omurilik üzerine yüksekten ağırlık düşürerek deneysel omurilik yaralanması oluşturmuştur. Ağırlık düşürme modelinde kinetik enerjinin tamamı omuriliğe aktarılamamaktadır. Cismin sürtünmesi, çevre dokulara enerji dağılımı, omuriliğe birden çok kere çarpması, omuriliğin farklı hayvanlarda farklı segmentlerde farklı çapa, kan akımına ve BOS dolaşımına sahip olması ağırlık düşürme yönteminin dezavantajlarıdır. *Tarlov* 1953'te epidural mesafede balon şişirerek omurilik hasarı yaratmıştır (23). 1978 yılında *Tator ve Rivlin* klip kompresyon modelini uygulamışlardır (43). Bu deneysel modelde omuriliğin tamamına yaralanma uygulanabilmesi ve kan akımının kesilmesine bağlı iskemi oluşması insanlarda meydana gelen yaralanma sonrası omurilik hasarına benzerlik sağlamaktadır (48). Diğer deneysel modeller içinde, nöronal hücre kültürleri ya da omuriliğin anatomik olarak intakt kesitleri, fotokimyasal veya termal hasar, germe kuvvetleri veya piston travma gibi çeşitli mekanik veya iskemik hasar oluşturulması sayılabilir (23). Omurilik yaralanmasının deneysel modelini oluşturmaya yönelik bazı teknik uygulamalar kısaca aşağıda özetlenmiştir:

1. Fiziksel travma ile oluşturulan hasar
  - Akut Kinetik Kompresyon (kaf, klip, balon, vertebral dislokasyon, *impactor*)
  - Akut Statik Kompresyon (ağırlık kullanılarak basınç uygulanması)
  - Ağırlık Düşürme
  - Akselerasyon-Deselerasyon
  - Distraksiyon
  - Transeksiyon (lazer, bistüri, koter vb aletlerle yapılan parsiyel ya da tam kesi)
2. Fiziksel travma harici oluşturulan hasar

- İskemi (aort oklüzyonu, selektif arter veya ven oklüzyonu)
- Tümör kompresyonu
- Kimyasal

İnsanlarda ve kemiricilerde omurilik hasarındaki morfolojik değişiklikler birbirine benzemektedir. İnsanlarda inflamatuvar komponent daha az etkilidir. Ratlarda omurilik kontüzyonunda sitokinlerin hızlı artışı insanlarla benzerdir. İnsanlarda ratlara göre astroglial yanıt belirgin şekilde azalmış ve gecikmiştir; bu nedenle de ılımlı bir astroglial skar cevabı gelişir (10, 56). Omurilik hasarında Schwann hücre yanıtı insanlarda sık kemiricilerde ise daha az sıklıkta görülür.

Omurilik hasarında yanıtları ve yeni tedavileri değerlendirmek için birçok deneysel model geliştirilmiştir. Kontüzyon modeli, insanlardaki hasara en yakın omurilik hasarı gibi görünmektedir (19).

## **2.5. Omurilik yaralanmalarında patofizyoloji**

### **2.5.1. Primer Hasar Mekanizmaları**

*Birincil hasarda* hücre ölümü yaralanma anında meydana gelir. Bu hücresel ölümler makaslanma, yırtılma, distraksiyon ve kompresyon gibi omurilik üzerine doğrudan uygulanan mekanik kuvvetlerin neden olduğu rastgele nöral ve glial hücre ölümü ve vasküler yapıların rastgele parçalanmasından kaynaklanır. Birincil hasar; omuriliğin mekanik hasarı, hemoraji, elektrolit akışı ve lizozomlar ve diğer hücresel bileşenlerin salımına bağlıdır. Omurilik içindeki kanama, mekanik hasar sonrası erken dönemde ortaya çıkarken, kan akımının kesintiye uğraması daha geç dönemde meydana gelir. Kan akımının kesilmesi hipoksi ve iskemi ile birlikte lokal enfarkt oluşmasına neden olur. Hasarlanan alandan geçen nöronal yapılar fiziksel olarak kesintiye uğrar ve myelin kalınlıklarında azalma meydana gelir. Gelişen ödem ve



makrofajların infiltrasyonu da sinir iletisinin bozulmasına katkıda bulunur (7, 36, 57). Sonuç olarak gri cevherin geri dönüşsüz hasarının ilk saatler içinde olduğu, beyaz cevherin ise 72 saat içerisinde geri dönüşsüz hasarlandığı düşünülmektedir (8).

### **2.5.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları**

İkincil omurilik hasar teorisi ilk kez 1911'de *Allen* tarafından ileri sürülmüştür (43). Primer mekanik hasar daha sonra hasarlanmanın büyümesine neden olacak sekonder mekanizmaların oluşmasında çekirdek işlevi görür. İkincil hasarın patofizyolojisini anlamaya yönelik yapılan hayvan deneyi çalışmalarından elde edilen bulgular yıkımın mikrovasküler perfüzyonda değişim, serbest radikal üretimi ve lipid peroksidasyon, nekrotik ve apoptotik hücre ölümü ve iyonik hemostazın bozulması sonucu ortaya çıktığını göstermiştir (15).

SCI genelde üç ana safhada incelenmektedir:

1. **Akut dönem**: Yaralanmayı takip eden en erken dönem (ilk 72 saat) olup bu dönemde spinal şok, aksonal yaralanma/ kopmalar, nöronal ölümler, vasküler destekte bozulmalar, iskemi, ödem, granülosit (nötrofil) infiltrasyonu, iyonik dengede bozulma ve nörotransmitter salınımları olur.
2. **Subakut dönem**: Bu dönem ara dönem olarak da bilinir ve yaralanmanın yedinci gününden sonra başlar. Bu dönem oksidatif stres, lipid peroksidasyon, superoksitlerin yapımı, sitokinleri salan makrofaj ve lenfositlerin ortama gelmesi ve inflamatuvar çevrenin oluşumu süreçlerini içerir.
3. **Kronik dönem**: Yaralanmadan birkaç hafta sonrasında ortaya çıkan ve aylarca sürebilen bir süreçtir. Bu süreçte iyonik dengede ileri derecede bozulma, oligodendrogliosit apoptozu ve demiyelinizasyon, kavite oluşumları ve

astroglial skar dokusunun yerleşmeye başlaması yer almaktadır. Bu durum aynı zamanda aksonal yeniden büyüme ve fonksiyonel iyileşme mekanizmalarının da bozulmasına neden olan bir durum olmaktadır (51).

Omurilik yaralanmalarında mekanik güçler damar yırtılmalarına sebep olur ve hafif yaralanmalarda gri cevherde vasküler ekstrevasasyon oluşurken ağır yaralanmalarda gri ve beyaz cevherde belirgin ekstrevasasyon oluşur. Bu arada akut dönemde şiddetli darbe sonrası ilk bir kaç dakika içinde ışık ve elektron mikroskopi ile 5 dakikada aksonların normal olduğu, gri cevherdeki venüllerin şiştiği, 15-30. dakikada eritrositlerin kapillerlerin ve venüllerin etrafına sızdığı görülür. Bu ekstrevasasyon birinci günün sonunda maksimuma ulaşır ve bunu ortama salınan sitokin ve kemokinlerin (tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), interlökinLER (IL-1 $\beta$ ), süperoksitler, serbest radikaller, kininler, histaminler, nitrik oksit=NO, matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) gibi) vasküler permeabiliteyi artırıcı etkileri takip eder. Böylece yaralı dokuda belirgin bir ödem ve staz oluşur. Tüm bunlar kan-beyin bariyerini (BBB) bozucu etki oluşturur. Bu sitokin ve kemokinler aynı zamanda granülosit ve monositleri de yaralı dokuya çeker (15). Yaralanma sonrası ilk 24 saat içerisinde yaralı bölgeye ulaşan ilk hücreler nötrofillerdir. Nötrofiller yaralı doku tarafından oluşturulan ve kana verilen IL-8, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) ve kompleman-5a (c5a) gibi kemoatraktan maddeler tarafından uyarılırlar ve kanda yuvarlanıp endotel hücrelerine yapışırlar ve bu hücrelerin arasından geçip yaralı dokuya ulaşırlar. Bu hücrelerin kemoatraksiyonu santral sinir sistemi inflamatuvar süreçlerinde CXCL12-CXCR4 veya CXCL1/2-CXCR2 sinyal yolları üzerinden gerçekleştirilmektedir. Bu hücreler fagositoz özelliğine sahip olup yaralı debris dokusunu fagosit ederler ve ortama TNF- $\alpha$ , proteazlar, elastazlar,

myeloperoksidazlar (MPO) ve reaktif oksijen ürünleri (reactive oxygen species=ROS) (süperoksitler, hidroksil radikalleri, kloraminler gibi) sentezleyip salarlar. Yaralanmadan bir hafta kadar sonrasında ortama monosit ve makrofajlar hakim olmaya başlarlar. Bunlar hem fagositozu devam ettirirler ve hem de ortama TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , NO, prostaglandinler (PG) ve lökotrienler sentezleyip salarlar. Tüm bunların yanı sıra mikroglial hücreler de ortamda aktif olmaya başlarlar ancak yaralanmadaki yerleri henüz tam anlayamamış olup araştırılmaktadır. Yaralanma sonrası süreçlerde en önemli rolü nötrofiller ve makrofajlar almaktadır. Özellikle makrofajlar iki kısımda incelenmektedir. Bunlardan M1 makrofajlar (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , ROS sentezleyen ve salan) fagositoz ve inflamatuvar cevabın oluşmasında yer alırlar. M2 makrofajlar (IL-10, IL-1RA, kemokinler sentezleyen ve salan) ise doku remodelling aşamasında görevlidirler. Omurilik yaralanması olan hastaların serumlarında ilk bir haftada yüksek düzeylerde ölçülen CXCL1 omurilik astrositleri tarafından IL1 reseptörleri altında sentezlenir ve salınır. Santral sinir sistemi yaralanmalarında NF- $\kappa$ B kinase- $\beta$  alt ünitesinin inhibitörünün blokajının CXCL1 sekresyonunu nötralize ettiği ve böylece nötrofil fonksiyonlarını azalttığı ve doku korunmasının ve nöronal motor fonksiyonların iyileşmesinin artırılmasında etkili olduğu gösterilmiştir (51). Ancak yapılan yeni çalışmalar nötrofillerin daha sonra gelecek olan lökositler için öncül olmalarının yaralanmanın geç dönemlerinde bu lökositler tarafından gerçekleştirilecek doku onarımı ve aksonal rejenerasyon için çok gerekli olduklarını göstermektedir. Bu doku onarımında özellikle makrofajlardan salınan doku büyüme faktörü-1beta (tissue growth factor=TGF-1 $\beta$ ) hem nöronlar için faydalı etkilere sahiptir ve hem de oligodendrosit toksisitesini azalmanda etkilidir. Santral sinir sistemi makrofajları ve mikrogliaları bir yandan glutamat

eksitotoksitesini azaltırken diğeryandan yaralı aksonun büyümesini de düzenlemektedir. Yaralanmanın kronik döneminde ortama lenfositler de gelmeye ve sitokin salmaya başlarlar ancak bunların sayısı diğeryan inflamatuvar hücrelere göre daha düşüktür. Özellikle önce gelen T lenfositler hem kemoatraktanlar sentezleyip salarlar ve hem de otoimmün bir cevabın ilk aşamalarında yer alırlar. Bu T lenfosit göçünü B lenfositler takip eder ve bunlar santral sinir sistemine karşı olan otoantikorlar sentezleyip salarlar (15).

### ***2.5.3. Myeloperoksidasyon mekanizmaları***

MPO proteini 146 kDa büyüklüğünde bir homodimer olup nötrofillerin ve monositlerin primer granüllerinde bulunur. Bu protein kemik iliğindeki promyelositler ve promonositlerde sentezlenmeye başlanır ve insanlarda MPO'nun ana hücrel kaynağı nötrofillerdir. Nötrofiller inflamatuvar sürecin oluşmasında ortama gelen ilk savunma hücreleri olup immün cevabın ve doku tamirinin oluşmasında temel etkileri vardır. Bu temel etkilerin oluşmasında ise nötrofil kökenli sitokin ve kemokinler önemli olup bu kemoatraktan maddeler makrofaj, monosit ve dentritik hücrelerin yaralı dokuya göçünde önemli yer tutar. MPO nötrofillerin primer granüllerinde yer alır ve bu granüller peroksidaz pozitif granüller olup içlerinde yüksek oranda MPO yanı sıra proteolitik enzimler (defensin, lizozomal hidrolaz, nötral serin protezlar, elastaz, proteinaz 3, katepsin-G gibi) barındırırlar. Bu enzimler granüllerdeki yüksek pH değerleri nedeni ile inaktif formda depolanırlar. Nötrofillerin aktifleştiği durumda fagolizozom duvarında ve hücre duvarında yerleşik olan NADPH oksidaz enzimi aktifleşir ve süperoksidlerin oluşumuna neden olur (4). Bu ise süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesine ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşumuna neden olur. MPO sistemi MPO proteini,  $H_2O_2$  ve bir okside olabilen

faktör (NADPH) kompleksinden oluşur. Bu sistemde MPO enzimi  $H_2O_2$  ile klorürden hipoklorik asit oluşumunu katalizler ve geniş spektrumlu bir oksidant maddeler topluluğunun (hipokloritler, kloraminler, hidroksil radikalleri, superoksitler, ozon gibi) oluşmasında birincil görev alır (27). Bu oksidantlardan en potent reaktif olanı hipoklorik asit (HOCl) olup proteinlerin sistein, nitrojen, heme, tiyol, tiyol ester, yağ asitleri gibi okside olabilen bölgelerini okside eder. Özellikle proteinlerin tirozin ve tirozin rezidüleri HOCl için hedeftir ve bunlarla reaksiyona girerek 3-klorotirozin veya 3,5-diklorotirozin molekülünün sentezlenmesine neden olur. Bu klorine olmuş tirozinler MPO aktivitesi için doku belirteci olurlar. MPO aynı zamanda makrofajlardan TNF- $\alpha$  ve IFN- $\gamma$  salınımına ve makrofajların bakteriyel ve fungal fagositoz ve öldürme aktivitelerinin artmasına neden olur. Yine bu etkileşim kronik inflamatuvar hastalıkların oluşum mekanizmalarında da yer alır. MPO ayrıca lökositlerin hücre-hücre interaksiyonlarını (migrasyon, infiltrasyon) ve hücre adhezyonlarını da etkiler. Ayrıca nötrofillerin adhezyon, aktivasyon ve yaşam sürelerinin ve inflamasyonun zamansal sürecinin belirlenmesinde de MPO aktivitesinin yeri vardır. (51)

#### ***2.5.4. Lipid peroksidasyon mekanizmaları***

Oksidatif stres lipid peroksidasyon mekanizmalarını başlatan en önemli faktörlerden birisidir ve özellikle yaralanmanın ilk birkaç gününde hücre zarlarında ciddi yıkıma neden olur. Lipid peroksidasyon mekanizmaları serbest radikallerle hücre zarı fosfolipitlerinin ilişkiye girmesi sonrası başlar (2). Burada serbest radikalın poliansature yağ asitlerinin metil karbonundan bir hidrojen atomunu koparması sonrası lipid radikali oluşur. Bu yeni oluşan lipid radikali moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve peroksil radikali oluşturur. Bu oluşan radikal ise diğer

bir poliansature yağ asidi ile reaksiyona girer ve olay bir tekrarlayan kısır döngü halini alır. Bu döngü sonunda hücre zarında yapısal ve akışkansal bozulma oluşur ve zar sahip olduğu fizyolojik görevlerini yerine getiremez ve hücre ölüm gerçekleşir. Ratlarda yapılan omurilik yaralanması modelinde yaralanmanın ilk 6 saatinde lipit peroksidasyon düzeyinde belirgin artış olduğu; bu artışın daha sonra bazal seviyeye kadar azaldığı ve 24 saatten sonra tekrar yükselmeye başlayıp bu yükselmenin 120 saat boyunca devam ettiği gösterilmiştir. Her ne kadar bu ikinci artışın sebepleri bilinmiyorsa da ortamda artan nötrofillerden ve makrofajlardan salınan sitokinlerin, reaktif oksijen ürünlerinin ve myeloperoksidaz gibi yıkıcı faktörlerin bu artışa sebep olduğu düşünülmektedir (12).

#### **2.5.5. Siklooksijenaz (COX) yolu**

Çeşitli faktörlerin etkisiyle aktive olan fosfolipaz A2 membran fosfolipitlerini hidroliz ederek araşidonik asitin salınımını sağlar. Araşidonik asit siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimleri ile sırasıyla prostanooidleri ve lökotrienleri (LT) meydana getirir. Prostanooidlerden sentaz enzimi aracılığı ile prostaglandin endoperoksit (PGG<sub>2</sub>) sentezlenir. Bu ise daha sonra peroksidaz etkisi ile PGH<sub>2</sub>' ye ve o da diğer prostanooidlere (prostasiklin=PGI<sub>2</sub>) ve trombositlerde tromboksanlara (TXA) dönüşür. PGI<sub>2</sub> trombosit adhezyonunu ve agregasyonunu önler, kuvvetli bir vazodilatör ve bronkodilatördür, böbreklerden idrar atımını artırır ve periferik sinir uçları kaynaklı hiperaljeziye neden olur. Oysa COX-1 enzimi tarafından sentezlenen TXA<sub>2</sub> trombositlerin adhezyonunu ve agregasyonunu artırır, vazokonstriktör ve bronkokonstrüktör etkilere sahiptir (52). Siklooksijenazın *konstitütif* tip (COX-1) ve *induklenebilir* tip (COX-2) olmak üzere iki tipi vardır. COX-1 enzimi dokularda hemostazdan sorumlu iken COX-2 daha çok sitokinler, büyüme faktörleri, TNF gibi

proinflamatuar stimulanlar tarafından uyarılır ve bu enzim ürünü olan prostanoidler ateş, kızarıklık, şişlik, ağrı ve fonksiyon kaybı gibi inflamasyon semptomlarının açığa çıkmasına aracılık ederler (21, 45). Olgun memelilerde COX-1 ve COX-2 sırasıyla 576 ve 587 amino asitten oluşur. Bu iki izoform birbirine benzemesine rağmen, COX-1 daha çok endoplazmik retikulumun laminal yüzeyinde, COX-2 ise çoğunlukla çekirdeğin membranında lokalize olmuştur (37). COX-2 enzimi omuriliğin lamina I, II, III–VI ve X segmentlerinde, motor nöronlarda, nöropilde, beyaz cevherin astroglialarının nükleuslarında gösterilmiştir. Ancak mikrogial hücrelerde COX-2 enzim ekspresyonu gösterilememiştir (53). Öte yandan aktive olmuş nötrofillerden ve makrofajlardan da COX-2 enzimi eksprese olur ve bu da COX-2 enzim seviyesinin artışına katkıda bulunur. İnflamasyon ve oksidatif stres basamaklarında önemli bir rol oynadığı ve yaralanmalarda süperoksit anyonlarını (hidroksil radikalleri gibi) oluşturarak ve bunlar üzerinden lipid peroksidasyon, protein ve DNA yıkımlarına sebep olarak nöronal hücrelerde hasar ve ölüme katkıda bulunduğu gösterilmiştir (4)

#### **2.5.6. Apoptozis mekanizmaları**

Apoptoz canlılarda hem gelişim sürecinde, hem hemostazda ve hem de hastalıklarda istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması için çalışan ve programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan biyolojik bir sistemdir. Ekstrinsik ve intrinsik yollar üzerinden bu sistem aktive olabilmektedir. Ekstrinsik sistemde TNF ailesinden olan ölüm reseptörleri aktive olmaktadır. İntrinsik yolak ise mitokondrial apoptoz olarak adlandırılmakta ve mitokondrial hasar sonrası ortaya çıkan substratlarla (sitokrom c, Bcl-2 gibi) aktive olmaktadır. Bu aktivasyonu başlatan caspase-9 (sistein-aspartik asit proteaz; caspase) proteininin aktivasyonu

için de sitokrom c' nin mitokondriden ortama salınması gerekmektedir. Caspase-3 bir caspase proteini olup caspase-8 ve caspase-9 ile yakın ilişkilidir ve hücre apoptozunda çok önemli görevler alır. Bu protein oligodendrositlerde ve glial hücrelerde glutamatin varlığında caspase-8, caspase-9 ve caspase-10 tarafından aktive edilir ya da sitokrom c, Bcl-2 gibi moleküller üzerinden direkt ya da indirekt olarak aktive olur. Aktive olan caspase-3 ise caspase-6 ve caspase-7' yi aktive eder. Bu aktivasyon da sitoplazmik ve nükleer apoptotik süreci başlatır. Burada hem sitoplazmik proteinlerde ve hem de nükleer DNA' da kesilmeler (cleavage) ve fragmentasyonlar olur ve hücre yaşamsal aktivitesini devam ettiremeyerek programlanmış ölüme gider. Caspase-3 aynı zamanda bir interlökin-dönüştürücü proteazdır (40, 55).

#### **2.5.7. Omurilik yaralanmalarında bazı sitokinler**

Omurilik yaralanmalarında bazı sitokinleri aşağıda sıralanmıştır:

- **TGF-1 $\beta$** : Bu sitokin dimerik bir protein olup alt tipleri vardır ve bu protein ailesinin embriyonik gelişim, hemostaz, yara iyileşmesi, kemotaksis ve hücre siklusu üzerinde etkileri vardır. Trombositlerde, makrofajlarda, mast hücrelerinde, fibrositlerde ve fibroblastlarda sentezlenir ve salınır. Yaralanma sonrası TGF-1 $\beta$  salınımı olur ve bu nötrofilleri, makrofajları ve fibroblastları uyarır. Bu ise ortama ulaşan bu hücrelerin daha fazla TGF-1 $\beta$  salmasına ve fibroblastlarda TGF-1 $\beta$  reseptörlerinin artmasına neden olur. Böylece fibrotik işlemlerin başlaması da sağlanmış olur. Sonuç olarak TGF-1 $\beta$  yara iyileşmesinde fibrozisi artırıcı bir profibrotik proteindir. Mezenkimal hücreleri uyararak hem bu hücrelerin proliferasyonunu ve hem de neovaskülarizasyonu, ekstrasellüler matriks (ECM) depolanmasını ve



özellikle kollajen (kollajen tip I, kollajen tip III, kollajen tip VI), fibronektin, matriks glikoproteinleri (osteopontin, osteonektin, kondroitin/ dermetan sulfat) ve proteoglikan (dekorin, biglikan) sentezini artırır (29). Ayrıca bu protein matriks metalloproteinazların aktivitelerini baskılar ve proteaz inhibitörlerini (plazminojen aktivatör inhibitör-1 ve metalloproteinaz doku inhibitörü=TIMP gibi) indükler (22).

- **IFN- $\gamma$** : Pleotropik bir protein olup T lenfositlerden ve “natural killer (NK)” hücrelerinden salınır ve immün cevabın oluşmasında görev alır. Bu protein aynı zamanda antifibrotik olarak ECM depolanmasını azaltır. Aynı zamanda TGF-1 $\beta$  ile etkileşime girerek bu proteinin etkilerini azaltmada da görevler alır ve kollajen sentezini de azaltır (29).
- **TNF- $\alpha$** : Bu molekül bir proinflamatuvar sitokindir. Yaralanma esnasında ve sonrasında trombositlerden, mast hücrelerinden, nötrofillerden, makrofajlardan ve fibrositlerden salınır. İnflamasyon oluşumunda, reepitelizasyonda, ECM depolanmasının azaltılmasında, neovaskülarizasyonda ve kollajen sentezinin azaltılmasında görevler alır. Özellikle TGF-1 $\beta$  üzerindeki baskılayıcı etkilerini NF-KB hücreleri üzerinden gösterir (29).

## **2.6. Omurilik yaralanmalarında medikal tedaviler**

### **2.6.1. Akut tedaviler**

Akut tedaviler nöroprotektif ilaçları içerir ve dört gruba ayrılır:

- Antioksidanlar,
- Nörotransmitter reseptör blokerleri,
- Fosfokinaz stimulatörleri,

- Fosfataz inhibitörleri

### **2.6.2. Kronik tedaviler**

Rejenerasyon ve remyelinizasyon yoluyla fonksiyonların iyileşmesini sağlayan iyileştirici tedavi üç kategoride incelenir:

- Büyüme faktör blokerleri ve büyümeyi inhibe eden faktör blokerleri,
- İntraselüler haberci modülatörler,
- Nakledilebilen hücreler veya materyaller

### **2.6.3. Omurilik Hasarında Potansiyel Olarak Etkili Olabilecek İlaçlar**

- Metilprednizolon (MP)
- Gangliozid (Gm-1)
- Larazoidler (trilazad mesilat)
- Opiyat antagonistleri (naloksan)
- Eksitator aminoasit antagonistleri
- Kalsiyum kanal blokerleri
- Potasyum kanal blokerleri
- Serbest radikal tutucuları
- Antiinflamatuvar ajanlar
- Nörotransmitter reseptör agonistleri
- Nörotropik faktörler
- Fetal doku transplantasyonu
- Nötralizan antikorlar
- Melatonin
- Hiperbarik oksijen
- Sistemik hipotermi

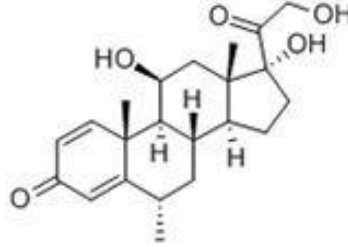
-Minosiklin

-Eritropoietin (47)

#### **2.6.4. Metil prednizolon**

MP molekül ağırlığı 374.48 g/mol ve kimyasal formülü  $C_{22}H_{30}O_5$  olan sentetik bir glukokortikoiddir. Asetat, sodyum süksinat ve hemisüksinat tuzları bulunmaktadır ( Şekil 1).

Türkiye’de asetat ve sodyum süksinat tuzlarını içeren enjeksiyonluk preparatları bulunmaktadır. Metil prednizolon sodyum süksinat enjeksiyonluk bir kortikosteroid elde etmek amacıyla metilprednizolona iyonize olabilen hemisüksinat grubunun eklenmesi ile elde edilen suda çözünür bir ön-ilaçtır. Metil prednizolon sodyum süksinat sulu ortamdayken açıl migrasyonu ile izomerik 17-esterine dönüştüğünden sudaki çözeltisi dayanıksızdır (20)



**Şekil 1:** Metilprednizolon isimli farmakolojik ajanın moleküler yapısının şematik görünümü

Literatürde daha önce yapılan deneysel çalışmalarda yüksek dozda uygulanan metilprednizolonun lipid peroksidasyon mekanizmalarını baskıladığı ve yaralı hayvanlarda fonksiyonel iyileşmeyi kontrol grubuna göre belirgin arttırabildiği

gösterilmiştir. Bu etkisini lipit peroksil radikallerini azaltarak ve böylece lipit peroksidasyon mekanizmalarını baskılayarak göstermektedir. Ayrıca doku COX-1 ve COX-2 aktivitelerini ve bunların oluşturduğu prostaglandinleri azalttığı da bilinmektedir. Sonuç olarak MP, 1990 yılında ABD’de ilk Ulusal Akut Omurilik Hasarı Çalışması (National Acute Spinal Cord Injury Study - NASCIS) sonuçlarının yayınlanmasından itibaren omurilik hasarı olan hastalarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (38). Ancak daha sonraki yapılan araştırmalarda MP’nin yaralanmanın subakut döneminde belirgin iyileştirici etkinliğinin olmadığı gösterilmiştir. Hasar sonrası ilk 24 saatte yüksek doz MP ile tedavi edilen hastalarda 2.6 kat daha fazla yaygın pnömoni ve sepsis gözleendiği, yara enfeksiyonu insidansının arttığı, solunum cihazına bağlı geçirilen gün sayısının ve yoğun bakımda kalış süresinin arttığı gösterilmiştir. Bu komplikasyonların steroidle indüklenmiş immün baskılanmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Bunun yanısıra yüksek doz glukokortikoid tedavisine eşlik edecek steroidle indüklenmiş hiperglisemi ve sepsis-bağlantılı hipotansiyonun da muhtemel komplikasyonlar arasında olduğu ve bazı omurilik hasarı araştırmalarında başarısızlık nedenleri arasında bu teorik komplikasyonların da yer alabileceği bildirilmiştir (26).

Ayrıca klinik araştırmalarda da MP’nin iyileşme üzerinde belirgin etkinliğinin olmadığı tartışılmaya ve kabul görmeye başlamıştır (12). Tüm bu yan etki potansiyeline rağmen hasar sonrası ilk 8 saatte başlandığında yüksek doz MP ile steroid tedavisinin etkililiği faz 3 randomize çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca bir çalışmada ilk 3-8 saat içinde MP tedavisine başlanılmayan durumlarda steroid tedavisinin 24 saatten 48 saate uzatılmasının ek yararlar sağladığı gösterilmiştir. Bu

nedenle eleştirilmesine rağmen omurilik hasarının tedavisine yönelik olarak klinikte halen kullanılan tek tedavi seçeneği yüksek doz sistemik MP olmuştur (12)

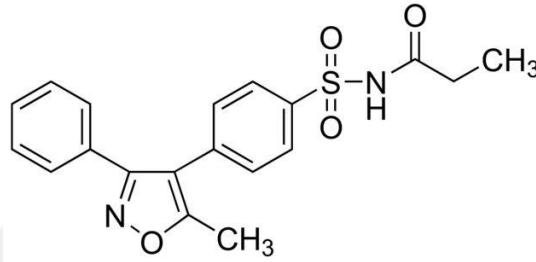
### **2.6.5. Parecoxib**

Yapılan deneysel araştırmalarda omurilikteki nöronlarda, motor nöronlarda ve astrositik glial hücrelerde yaygın şekilde COX enzimlerinin varlığı tespit edilmiştir. Omurilik yaralanmalarının dördüncü saatinde COX-2 gen ekspresyonunun başladığı ve yaralanmadan sonraki sekizinci saatte COX-2 enziminin gen ekspresyonunda belirgin artış olduğu ve bu artmış düzeyin en az 48 saat devam ettiği saptanmıştır. Yaralanma sonrası beyin omurilik sıvısında PGI<sub>2</sub>, IL-1 $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  ve bunu takiben COX-2 düzey artışları saptanmıştır. Prostaglandin düzeylerindeki artış glutamat, aspartat, nitrik oksit, bradikinin, substance-P artışına neden olur (1, 42, 53).

Selektif COX-2 inhibitörleri hasarlı dokuda proinflamatuvar PG'lerin üretimini düşürüp antiinflamatuvar etki yaparlar. Bu farmakolojik ajanlar klasik antiinflamatuvar ilaçlar kadar kuvvetli analjezik ve antiinflamatuvar etki sağlar ve daha az gastrointestinal yan etkilere neden olurlar. Bu bileşiklerin ana yapılarında COX-2'nin aktif bölgesinin hidrofilik yan cebindeki Arg-513 ile etkileşebilen sulfon veya sulfonamid grupları taşırlar. Bu ilaç grubunda "celecoxib", "rofecoxib", "valdecoxib", "eterocoxib", "lumiracoxib" ve "**parecoxib**" gibi bileşikler klinik çalışmalarda değerlendirilmektedir (5, 13, 34) (Şekil 2). Selektif COX-2 inhibitörü ilaçlar, mukoza hasarına bağlı Gİ yan etkiler oluşturmaları açısından genel olarak güvenilir ilaçlardır. Ancak bu ilaçlar böbreğin hemodinamik ve su-tuz atımıyla ilgili işlevleri üzerinde olumsuz etkiler yapabilirler. Ayrıca selektif COX-2 inhibitörleri vücutta doğal PGI<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub> oranını bozarak trombotik etki (tromboembolik olaylar,

hipertansiyon, myokard iskemisi ve trombotik inme) potansiyelleri nedeni ile ciddi kardiyovasküler yan etkilere de neden olabilirler (25).

Bir COX-2 selektif inhibitörü olan parecoxib intravenöz ve intramusküler kullanılabilen bir ön ilaç olup moleküler formülü N-{{4-(5-metil-3-fenilizosakzol-4-il) fenil} sulfonil} propanamid şeklindedir.



**Şekil 2:** Parecoxib isimli farmakolojik ajanın moleküler yapısının şematik görünümü

Bu etken madde klinikte henüz yeni araştırılan ve kullanılmaya başlanmış olan bir ilaç olup farmakolojik ayrıntılı bilgi birikimi kısıtlıdır. Bu etken madde analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkiye sahip olup etkisini prostaglandinlerin sentezinin inhibisyonu üzerinden gösterir. Büyük oranda karaciğerde enzimatik hidrolize uğrayıp farmakolojik olarak etkin formu olan valdecoxib (4-(5-metil-3-fenilizosakzol -4-il)benzenesulfonamid) ve propionik asite dönüşür. Valdecoxibin serum yarılanma ömrü yaklaşık 8 saattir ve büyük oranda karaciğerde metabolize edilip yıkılır ve yine büyük oranda karaciğerden ve bir miktar da böbreklerden vücut dışına atılır. Bu ilacın solunum depresyonu yapmadığı, trombosit fonksiyonlarını bozmadığı, gastrointestinal çok düşük düzeyde yan etkiye sahip olduğu ve sedatif etkisinin bulunmadığı gösterilmiştir. Ancak orta-ağır düzey karaciğer yetmezliği olanlarda, inme ve myokard enfarktüsü geçirmiş hastalarda, kardiyak by-pass cerrahisi

geçirmiş hastalarda, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalarda, alerjik bünyeye sahip olan hastalarda kullanımı önerilmemektedir (39).

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Materyal

Çalışmanın tamamı Kırıkkale Üniversitesi Etik Kurulu tarafından deneysel araştırmalar için belirlenen kurallar ve prosedürler doğrultusunda, gerekli onay alındıktan sonra yürütüldü (Karar tarihi: 13.02.2014 ve Karar numarası: 14/ 23).

Ayrıca bu tez çalışması Kırıkkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından finansal açıdan desteklendi (BAP Proje Numarası: 2014/ 075)

Deneysel araştırma protokolunda iki farmakolojik ajan test edildi ve isimleri aşağıda sıralandı:

- Metil prednizolon (Depo-Medrol®, Pharmacia & Upjohn Company, Kalamazoo, USA),
- Parecoxib (Dynastat, Pfizer Australia Pty Ltd, Australia)

Yukarıda adı geçen farmakolojik ajanların omurilik yaralanmasının fizyopatogenezine etkilerinin test edilmesi için bu deneysel çalışma 300-350 gram ağırlığında ve erkek cinsiyette 48 adet Wistar Albino rat üzerinden yürütüldü. Ratlar randomize şekilde kontrol grubu, akut dönem ve subakut dönem olmak üzere üç ana gruba ayrıldı. Gruplar aşağıda belirtildi:

- KONTROL grubu (hiçbir omurilik yaralanması ve/ veya farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 5)

Akut dönem (omurilik yaralanmasının ilk 3 günü) 4 alt grupta incelendi:

- SHAM-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 5)
- MP-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve 30 mg/kg dozda metil prednisolon intraperitoneal yoldan verildi; n: 5)
- PX-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve parecoxib 6 mg intraperitoneal yoldan verildi; n: 5)
- MPPX-A grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve parecoxib 6 mg ve metil prednisolon 30 mg/kg intraperitoneal yoldan verildi; n: 5)

Subakut dönem (omurilik yaralanmasının ilk 7 günü) 4 alt grupta incelendi:

- SHAM-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ancak deneysel farmakolojik ajan uygulanmadı; n: 6)
- MP-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve 30 mg/kg dozda metil prednisolon intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)
- PX-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve parecoxib 6 mg intraperitoneal yoldan verildi; n: 6)
- MPPX-S grubu (omurilik yaralanması modeli uygulandı ve parecoxib 6 mg ve metil prednisolon 30 mg/kg intraperitoneal yoldan verildi; n: 5)

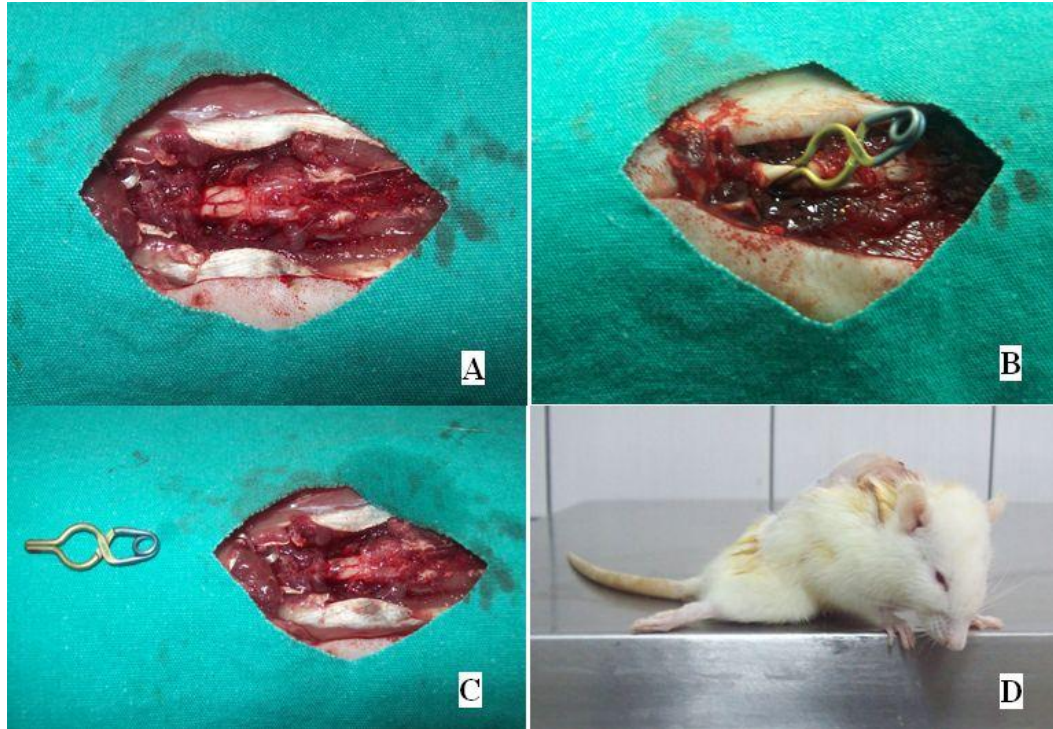
Sedasyon anestezi için intraperitoneal yoldan 40 mg/ kg ketamine HCl (KetalarR; Pfizer Inc, USA) ve 5 mg/ kg xylazine HCl (RompunR %2; Bayer HealthCare AG, Germany) kullanıldı.

### **3.2. Omurilik yaralanması modeli**

Deney modeli olarak medikal literatürde Rivlin ve Tator (1978) tarafından tarif edilmiş ve omurilik hasarı oluşturulmasında metot olarak kabul görmüş olan omuriliğin geçici vasküler anevrizma klip (temporary vascular aneurysm clip) ile



kliplenmesi yoluyla oluşturulan “omurilik kompresyonu metodu” kullanıldı (43). KONTROL grubu hariç tüm deney hayvanları sedasyonel anestezide sokulduktan sonra prone pozisyonda yatırılarak operasyon bölgesi hazırlandı. Hayvanların sırt kısımlarının orta hattı derisine (izdüşümsel olarak omurga aksının tam üstüne gelecek şekilde) yaklaşık 5 cm’lik bir kesiyi takiben omurga etrafını saran kaslar diseksiyon ile omurgadan sıyrılarak torakal 7 ve 8 omurgalar ortaya kondu ve bu omurgalara “dorsal total laminektomi” yapıldı. Dura matere zarar verilmeden yapılan laminektomi sonrası açığa çıkarılan omurilik segmentine omuriliğin tamamını komprese edecek şekilde 1 dakika süre ile “geçici vasküler anevrizma klipi” konuldu ve böylece omurilik kompresyon yaralanması oluşturuldu. Yaralanma oluşturulduktan ve beklenen süre tamamlandıktan sonra vasküler klip yerinden çıkarılıp cerrahi katlar anatomiye uygun olacak şekilde kapatıldı (Resim 1).



**Resim 1:** Omurilik yaralanmasının deneysel olarak oluşturulma aşamaları ve deney sonunda deneğin makroskopik görüntüsü

Deney hayvanları kendi kafeslerinde yaşatıldı ve hayvanların kafesleri içinde 12 saat gündüz ve 12 saat gece ritminde serbest su ve yiyecek ulaşımına ve serbest dolaşımına izin verildi. Takiplerinde tüm deney hayvanlarının deneye katılmasında lökomotor kayıp oluşması ön koşul olarak kabul edildi. Deney sonrası yara iyileşmesi sürecinde olumsuz ve bozucu etki oluşturma olasılığı nedeni ile deney hayvanlarına antibiyotik ve/ veya ek doz analjezik/ anti-inflamatuar ilaç verilmedi. Cerrahi alanda veya organizmanın başka yerinde ortaya çıkacak enfeksiyon, genel vücut ağırlığında azalma (yiyecek ve su alımında azalma), cerrahi alanın izlem sırasında açılması, diğer hayvanlar tarafından cerrahi alana veya diğer vücut bölgelerine zarar verilmesi (doku kaybına neden olabilecek kadar ciddi düzeyde dişlenmesi, tırnaklanması yada yenmesi) durumunda denekler deney protokolünden çıkarıldı.

İşlemden 72 saat sonra akut dönem ait ve 7 gün sonra subakut döneme ait deney hayvanları ve KONTROL grubundaki hayvanlar tekrar sedasyon anestezisine sokuldu ve uygulanan laparotomi sonrası abdominal aortadan tüm vücut kanı alımı yöntemi ile ötenazi uygulandı. Ötenaziyi takiben denekler prone pozisyonda iken eski orta hat insizyonu tekrar açıldı ve laminektomi sınırları diğer komşu omurgalara kadar genişletildi ve omuriliğin yaralanma oluşturulan segmenti en az 1.5 cm uzunluğunda seyri boyunca total olarak çıkarıldı.

Elde edilen dokular histopatolojik, biyokimyasal ve “real time PCR” inceleme yöntemleri uygulanarak incelendi.

### **3.3. Histopatolojik inceleme**

Histopatolojik inceleme için ayrılan dokular 48 saat süre ile fosfat tamponlu salin (pH=7.4) içinde %4 lük paraformaldehit ile fikse edildi. Ardından dokular alkol

ve xylene serilerinden geçirilerek dehidrate edildi, parafin bloklar içine gömüldü ve daha sonra bu dokulardan 4-5 µm kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler poli-lizin kaplı lamlara aktarıldı. Bu preparatlar rutin hematoksilin-eosin (H&E) boyama yöntemi kullanılarak boyandı ve boyama sonrası elde edilen preparatlar çalışma gruplarına ve araştırılan etken maddelere kör veteriner patolog tarafından binoküler mikroskop (Olympus BX51; Olympus, Tokyo, Japan) altında incelendi. İncelemede Black ve arkadaşları tarafından tarif edilen ve Dincel ve arkadaşları tarafından modifiye edilen puanlama tablosu kullanılarak omurilik hasarının düzeyi belirlendi (6, 14).

- Düzyey 0-1: omurilikte histopatolojik düzeyde doku hasarı yok.
- Düzyey 2-4: omurilikte hafif düzeyde nöral doku hasarı var; nöral hücre kaybına neden olmayan hafif düzeyde polimorfonükleer hücre infiltrasyonu var ve omurilik arka kolonu yaralanmadan etkilenmiş.
- Düzyey 5-7: omurilikte orta düzeyde nöral doku hasarı var ve beyaz cevher kaybına ve santral kavitasyona neden olan makrofaj ve/ veya histiyosit infiltrasyonu var.
- Düzyey 8-10: omurilikte ağır nöral doku kaybı var ve omurilik beyaz cevherinde kistik nekroz ve gliosis var.

### **3.3. Biyokimyasal inceleme:**

Biyokimyasal analiz çalışmaları için ayrılan dokular kuru hava ortamında - 80 °C' de hemen dondurularak saklandı. Takiben yaralı dokulardaki malondialdehit (MDA), myeloperoksidaz (MPO) ve apoptoz (caspas-3) düzeyleri incelenmek üzere dokular fosfat tampon salin solusyonu ile yıkandı ve buz içindeki %0.9 NaCl solusyonu ile homojenize edildi (Labor Technique, Germany). Homojenize edilmiş

dokular 1500 g uygulanarak 10 dakika süre ile +4 ° C ortamda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant materyalde MDA değerlerini tespit etmeye yönelik Armstrong and Al-Awadi tarafından tariflenen ve Yagi tarafından modifiye edilen teknik uygulandı (3). Sonuçların kalibrasyon eğrisini ölçmeye yönelik standart dilüsyonlarda 1–25 nM “1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane” (Sigma, USA) kullanıldı ve elde edilen değerler “nmol/g protein” şeklinde yorumlandı (32). Ayrıca yine elde edilen süpernatant materyalde MPO ve Caspas-3 düzeyleri orjinal ELİSA kitleri kullanılarak (Sunred Biological Technology Co., Ltd; Shanghai) çalışıldı ve sonuçlar “ng/ mg protein” olarak hesaplandı.

### **3.4. “Real time PCR array” gen ekspresyon analizi**

Bir kısım omurilik dokusu ise gerçek zamanlı polimerize zincir reaksiyon (real time PCR) analizi için kuru hava ortamında -80 °C’ de hemen dondurularak saklandı. Takiben yaralı dokularda TGF-β, TNF-α, IFN-γ düzeyleri araştırılarak inflamasyon düzeylerinin kantitatif analizi yapıldı. Bu amaçla TGF-β, TNF-α, IFN-γ gen ekspresyon setleri (Elips Sağlık Ürünleri İthalat ve İhracat Limited Şirketi, Ankara, Türkiye) kullanıldı. Örnekler, deney aşamasına kadar -20° C’de muhafaza edildi. İzolasyon için örnekler sıvı azot ile parçalandı ve homojenizatörde homojen hale getirildi ve 400 µl lysis/binding buffer eklendi. Ardından 15 saniye vortekslendi ve karışım filtre-koleksiyon tüpünün üst kısmına maksimum 700 µl olacak şekilde konuldu ve 15 saniye 8.000 g ile santrifüj yapıldı. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp filtre tekrar tüpe konuldu. Her bir örnek için 90µl DNase incubation buffer, 10µl DNase I karıştırıldı. Rezarvuvarın üst kısmına her bir örneğe 100µl konuldu ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı (+15°-+25°). 500 µl yıkama solüsyonu I üst rezervuara eklendi ve 8000 g ile 15 saniye santrifüj yapıldı. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp

koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve 500 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklendi. 8000 g ile 15 saniye santrifüj yapıldıktan sonra alt rezervuara çöken sıvı dökülüp koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu. 200 µl yıkama solüsyonu II üst rezervuara eklendi ve 2 dakika maksimum hızda santrifüj yapıldı. Alt rezervuara çöken sıvı dökülüp koleksiyon tüpü tekrar filtre tüpünün altına konuldu ve maksimum hızda (13000 g) 2 dakika boş santrifüj yapıldı. Yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştırılması sağlandıktan sonra filtre tüpü 1.5 ml' lik ependorflara konuldu ve 50-100 µl elution solüsyonu üst rezervuara eklenip 8000 g ile 1 dakika santrifüj yapıldı. Çöken kısım RNA' nın olduğu kısım olup ependorf cDNA' ya çevirene kadar -20 °C' ye konuldu. cDNA sentezi için DNA örnekleri izolasyondan sonra gerçek zamanlı PCR' a konuldu ve böylece RNA cDNA çevrildi. Çevrilme işlemi Qubit cihazında RNA miktarına bakıldıktan sonra kit protokolüne uygun olarak yapıldı. Örnek başına kitin içindeki iki farklı primer 1 µl olarak konuldu. Total RNA miktarı gerçek zamanlı PCR' a (LightCycler® 480, Roche Diagnostics, ) konulup her bir örnek için 50-100 ng mRNA düşecek şekilde hesaplandı ve cDNAya çevrilirken değişken olarak RNA maksimum 11µl olacak şekilde konuldu. Oluşan 13 µl'lik karışım opsiyonel olarak 65 °C 10 dakika PCR' a konuldu.

Çıkan örneklerin üstüne her bir örnek için aşağıdaki malzemeler eklendi:

Kimyasallar	Volum	Son konsantrasyon
- Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction buffer	4µl	1x 8 mM MgCl <sub>2</sub>
- Deoxynucleotide mix	2µl	1 mM (her biri)
- Protector RNase Inhibitor	0.5µl	20 U
- Transcriptor Reverse Transcriptase	0.5µl	10 U

Toplamda her bir örnek için 7 µl olacak şekilde karışım hazırlanıp vorteks yapılmadan iyice pipetaj yapıldı ve PCR' dan çıkan örneklerin üzerine 7 µl konuldu.

Örnek toplamda 20 µl'lik bir karışım halinde PCR cihazına tekrar konuldu ve Anchored-oligo(dt) primer veya spesifik primer için hedef mRNA uzunluğuna göre 4 kb 30 dakika 55°C veya >4 kb 60 dakika 50°C bekletildi. Random primer için 4 kb 10 dakika 25°C veya 30 dakika 55°C; >4 kb 10 dakika 25° C veya 60 dakika 50°C ve devamında 5 dakika 85° bekletildi. Çıkan cDNA' lar buz üstüne alındı veya -20 °C'de saklandı. Gerçek zamanlı PCR gen ekspresyonu çalışmalarında Hydrolysis Probes Master kullanıldı. PCR karışımı hazırlanırken her bir örnek için su (4µl), LightCycler 480 Probes Master (10µl), Real Time Ready Assay (1µl) toplam hacim 15 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım vorteks kullanılmadan pipetle yukarı aşağı yapılarak karıştırıldı. "LightCycler 480 multiwell plate" in her kuyucuğuna PCR karışımından 15 µl ve üzerine 5µl cDNA eklendi ve 2 dakika 1500 g ile santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirildi ve LightCycler 480 PCR başlatıldı. PCR data analizi SABiosciences'a ait online PCR Array Data analizi yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm örnekler beş "housekeeping" genin (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, *RPLP0*) düzeylerine göre normalize edildi.

### **3.5. İstatistiksel analiz:**

Çalışmadan elde edilen tüm sayısal veriler ve skorlar "Statistical Packages for the Social Science" (SPSS) 20.0 kullanılarak istatistiksel yönden analiz edildi. Tanımlayıcı istatistiksel analizler yapıldı. Etik kural gereği istatistiksel analiz yapılmasına izin verebilecek minimum sayıda deney hayvanı kullanılması amaçlanmış olduğundan her gruba ait örneklem sayısı küçük tutuldu. Ancak grup sayısının fazla olması rastgele istatistiksel sonuç elde etme riskini taşıdığından dolayı bu riski ortadan kaldırmaya yönelik deneyden elde edilen veriler akut dönem grupları

için kendi içinde ve yine subakut dönem grupları için kendi içinde istatistiksel olarak incelendi.

Akut ve subakut döneme ait histopatolojik derecelendirme sonuçlarının karşılaştırılmasında değerlerin normal dağıldığı ancak homojen olmadığı gözlemlendi (*Kolmogorov-Smirnov* test,  $p>0.05$ , *Levene's* test,  $p<0.05$ ). Bu nedenle grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Kruskal Wallis* testi kullanıldı ve  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi kullanıldı. Tüm testlerde  $p<0.005$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Tüm gruplarda biyokimyasal analiz ve PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının homojen olduğu ve normal dağılıma uğradığı gözlemlendi (*Kolmogorov-Smirnov* test,  $p>0.05$ ; *Levene's* test,  $p>0.05$ ). Bu nedenle grupların istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (*One-Way Analysis of Variance; One-Way ANOVA*) testi kullanıldı ve  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların ikili karşılaştırmalarında Tukey çoklu karşılaştırma analizi (*Tukey HSD Multiple Comparisons*) testi kullanıldı. Tüm testlerde  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

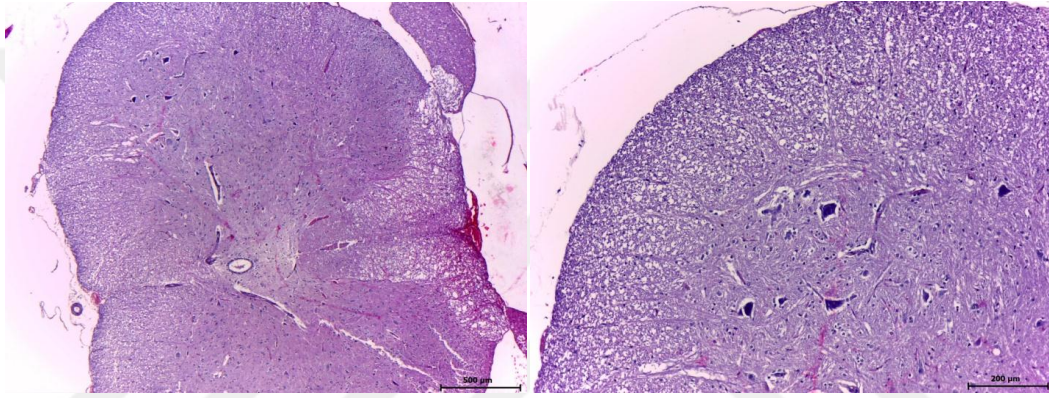
Benzer grupların (örneğin SHAM-A ve SHAM-S gibi) akut ve subakut dönemlere ait histopatolojik evreleme verilerinin istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında *Mann Whitney U* testi kullanıldı ve  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi. Ayrıca benzer grupların akut ve subakut dönemlere ait biyokimyasal analiz sonuçları ve PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında bağımsız değişkenler t (*Independent Samples t*) testi kullanıldı ve  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Akut döneme ait bulgular

#### 4.1.1. Işık mikroskopisi

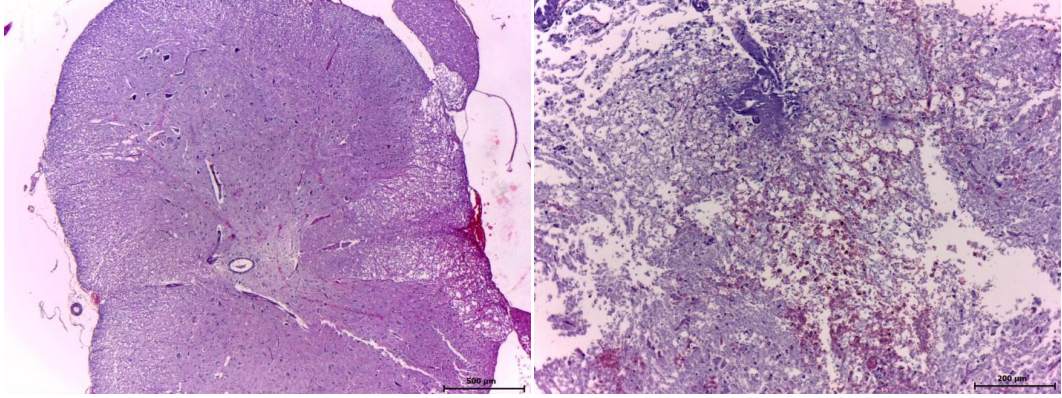
Sağlıklı KONTROL grubunda omuriliğin beyaz madde yapısı ve burada yer alan aksonlar/miyelin kılıfları ile gri maddede bulunan multipolar motor nöronlarda belirgin çekirdek/çekirdekçik yapısı ve sağlıklı hücre morfolojisi gözlemlendi (Resim 2).



**Resim 2:** KONTROL grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

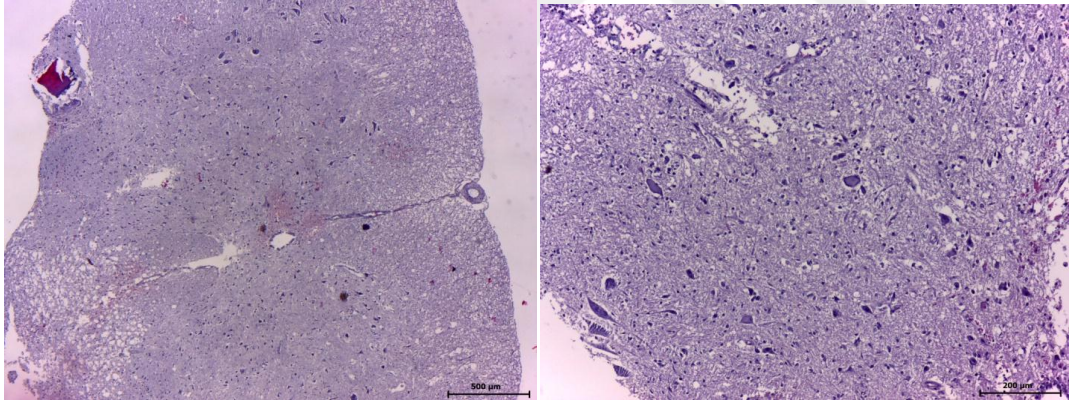
SHAM-A grubunda gri ve beyaz maddede şiddetli kistik kavitasyonlar görüldü. Neredeyse tüm bölgeyi saran yoğun kanama alanları tespit edildi. Çok yoğun mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Doku bütünlüğünün bozulmuş olduğu dikkati çekti. Beyaz maddede de kaybın şekillendiği görüldü (Resim 3).





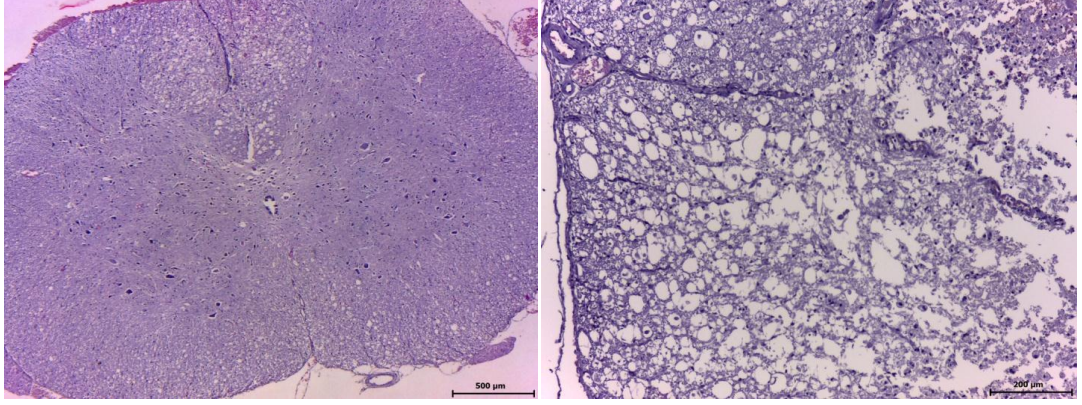
**Resim 3:** SHAM grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

MP-A grubunda genel durumun PX-A grubuna göre daha iyi olduğu görüldü. Yaygın nöronal nekroz tespit edildi ancak kistik kavitasyonların çok daha hafif olduğu dikkati çekti. Yine çok hafif düzeyde kanama alanları görüldü (Resim 4).



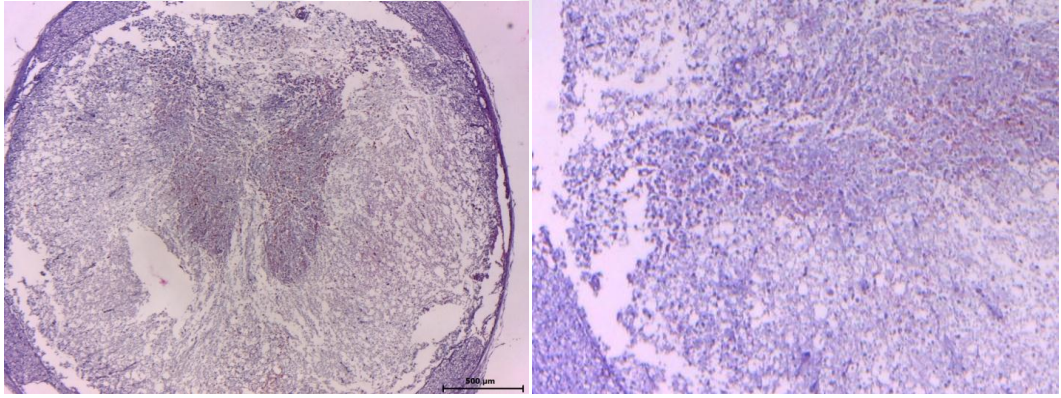
**Resim 4:** MP-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

PX-A grubunda bazı deneklerde doku bütünlüğünün çok iyi korunduğu tespit edildi. Ancak bu hayvanlarda yaygın nöronal nekroz dikkati çekti. Hafif hücre infiltrasyonları görüldü. Genel olarak beyaz maddede erime ve kistik kavitasyonlar dikkat çekiciydi (Resim 5).



**Resim 5:** PX-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

MPPX-A grubunda beyaz maddenin geniş bir kaybı ve kistik genişlemeler oldukça dikkat çekiciydi. Yaygın kanama alanları görüldü. Orta düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi (Resim 6).



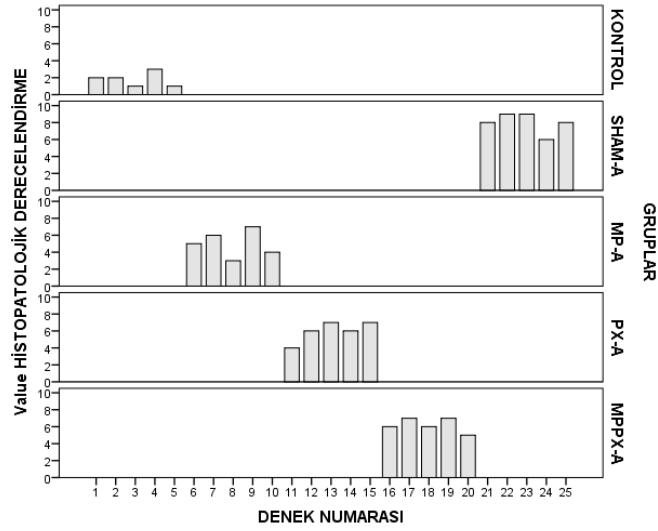
**Resim 6:** MPPX-A grubuna ait histopatolojik görüntüleme (H&E, X100 ve X400)

#### ***4.1.2. Histopatolojik inceleme***

Çalışmanın akut dönem gruplarının histopatolojik değerlendirme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo ve dağılım grafiği aşağıda sunuldu (Tablo 1, Grafik 1).

**Tablo 1:** Akut döneme ait histopatolojik evreleme sonuçlarının tanımlayıcı tablosu (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

GRUP	N	Minimum	Maksimum	Medyan	SS
KONTROL	5	1	3	2	0.84
SHAM-A	5	6	9	8	1.22
MP-A	5	3	7	5	1.58
PX-A	5	4	7	6	1.22
MPPX-A	5	5	7	6	0.84



**Grafik 1:** Akut döneme ait histopatolojik evreleme puanları bar grafiği

Elde edilen histopatolojik düzeylerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında anlamlı düzeyde farklılık olduğu ( $X^2=17.033$ ,  $p=0.002$ ) tespit edildi (Tablo 2).

**Tablo 2:** Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi;  $p<0.05$  ( $X^2$ : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

Değişken	df	$X^2$	p
Histopatolojik evre	4	17.033	<b>0.002</b>



Grupların ikili karşılaştırılması sonrasında gruplar arasında istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi (Tablo 3).

**Tablo 3:** Histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında grupların verileri arasında fark saptanmadı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi;  $p < 0.005$  (Z: Z puanı)

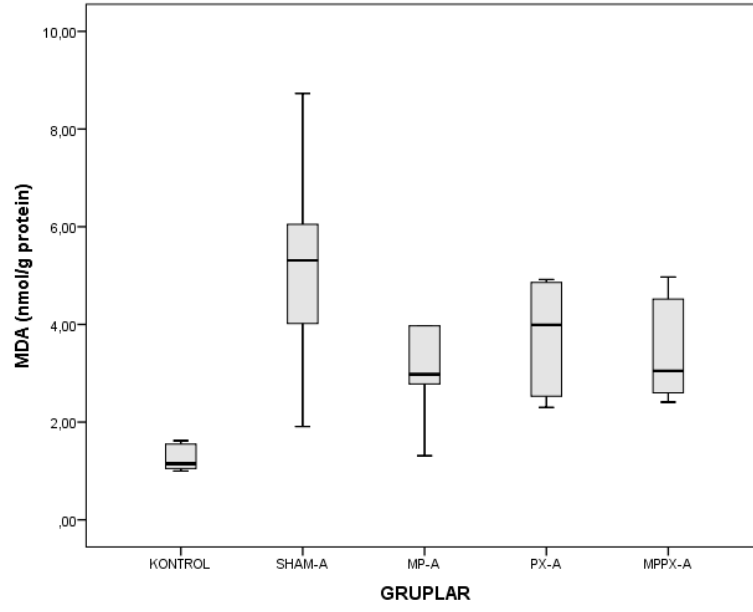
Gruplar	Z	p
KONTROL/ SHAM-A	-2.643	0.008
KONTROL/MP-A	-2.530	0.011
KONTROL/ PX-A	-2.643	0.008
KONTROL/ MPPX-A	-2.643	0.008
SHAM-A/ MP-A	-2.319	0.020
SHAM-A/ PX-A	-2.028	0.043
SHAM-A/ MPPX-A	-2.028	0.043
MP-A/ PX-A	-1.074	0.283
MP-A/ MPPX-A	-1.289	0.197
PX-A/ MPPX-A	-0.111	0.911

#### 4.1.3. Biyokimyasal inceleme

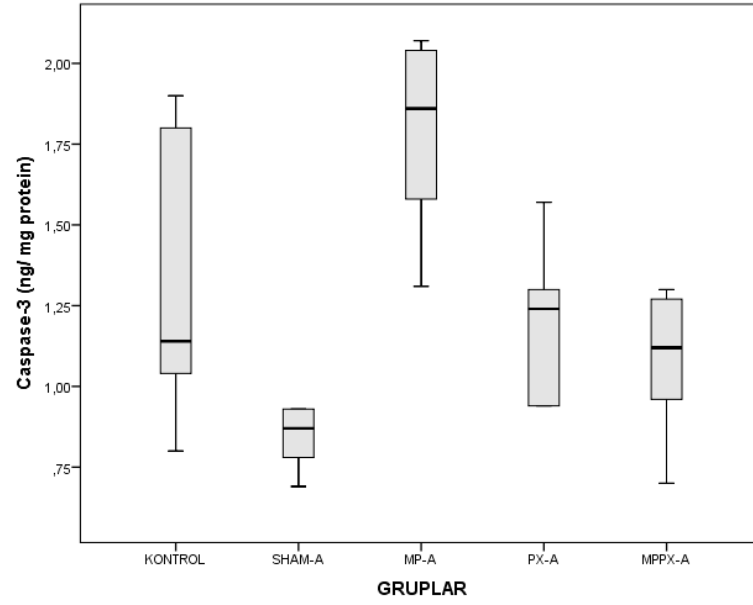
Çalışmanın akut dönemine ait biyokimyasal inceleme sonuçları aşağıdaki tanımlayıcı tabloda ve dağılım grafiklerinde ayrıntılı olarak verildi (Tablo 4, Grafik 2, Grafik 3, Grafik 4).

**Tablo 4:** Akut dönemde yapılan biyokimyasal inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon; SS: standart sapma)

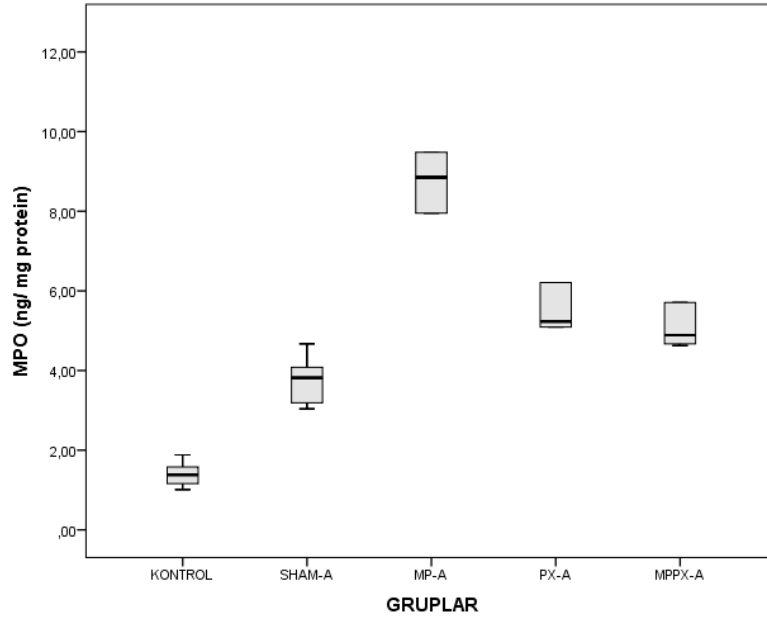
Gruplar	Değişken	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
KONTROL	MDA	5	1.000	1.620	1.274	0.29
	Caspase-3	5	0.800	1.900	1.336	0.49
	MPO	5	1.012	1.880	1.402	0.34
SHAM-A	MDA	5	1.910	8.730	5.204	2.52
	Caspase-3	5	0.690	1.230	0.900	0.21
	MPO	5	3.040	4.670	3.760	0.67
MP-A	MDA	5	1.310	5.950	3.398	1.71
	Caspase-3	5	1.310	2.070	1.772	0.32
	MPO	5	5.250	12.290	8.764	2.55
PX-A	MDA	5	2.300	4.920	3.720	1.25
	Caspase-3	5	0.940	1.570	1.198	0.27
	MPO	5	3.280	7.940	5.550	1.70
PXMP-A	MDA	5	2.410	4.970	3.510	1.16
	Caspase-3	5	0.700	1.300	1.070	0.25
	MPO	5	4.630	7.910	5.562	1.38



**Grafik 2:** Akut dönem gruplarına ait MDA düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehit)



**Grafik 3:** Akut dönem gruplarına ait caspase-3 düzeyi değerleri grafiği



**Grafik 4:** Akut dönem gruplarına ait myeloperoksidasyon düzeyi değerleri grafiği (MPO: myeloperoksidasyon)

Bu verilere uygulanan tek yönlü varyans analizi test sonuçları tüm gruplar arasında MDA ( $F=4.011$ ,  $p=0.015$ ), caspase-3 ( $F=5.301$ ,  $p=0.004$ ) ve MPO ( $F=14.410$ ,  $p<0.001$ ) değerleri bakımından istatistiksel anlamlı farklılık olduğunu gösterdi (Tablo 5).

**Tablo 5:** Akut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarının gruplar arası karşılaştırma sonuçları tablosu. *One-Way ANOVA* testi,  $p<0.05$  (df: degrees of freedom; F: F değeri; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon)

Değişken	df	F	p
MDA	4	4.011	<b>0.015</b>
Caspase-3	4	5.301	<b>0.004</b>
MPO	4	15.410	<b>&lt;0.001</b>

Akut döneme ait verilerin ikili gruplar halinde yapılan karşılaştırmalarında MDA açısından KONTROL/ SHAM-A arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu ( $p=0.006$ ) tespit edildi (Tablo 6).

**Tablo 6:** Akut döneme ait MDA değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu *One-Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi*,  $p<0.05$  (MDA: malondialdehit)

MDA			
Gruplar	Ortalama Fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-A	-3.930	0.991	<b>0.006</b>
KONTROL/ MP-A	-2.124	0.991	0.242
KONTROL/ PX-A	-2.446	0.991	0.138
KONTROL/ MPPX-A	-2.236	0.991	0.201
SHAM-A/ MP-A	1.806	0.991	0.389
SHAM-A/ PX-A	1.484	0.991	0.576
SHAM-A/ MPPX-A	1.694	0.991	0.451
MP-A/ PX-A	-0.322	0.991	0.997
MP-A/ MPPX-A	-0.112	0.991	1.000
PX-A/ MPPX-A	0.210	0.991	1.000

Öte yandan caspase-3 açısından SHAM-A/ MP-A ( $p=0.003$ ) ve MP-A/ MPPX-A arasında istatistiksel anlam fark olduğu ( $p=0.019$ ) tespit edildi (Tablo 7).

**Tablo 7:** Akut döneme ait caspase-3 değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu *One-Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi*,  $p<0.05$

Caspase-3			
Gruplar	Ortalama Fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-A	0.436	0.203	0.240
KONTROL/ MP-A	-0.436	0.203	0.240
KONTROL/ PX-A	0.138	0.203	0.959
KONTROL/ MPPX-A	0.266	0.203	0.689
SHAM-A/ MP-A	-0.872	0.203	<b>0.003</b>
SHAM-A/ PX-A	-0.298	0.203	0.594
SHAM-A/ MPPX-A	-0.170	0.203	0.916
MP-A/ PX-A	0.574	0.203	0.070
MP-A/ MPPX-A	0.702	0.203	<b>0.019</b>
PX-A/ MPPX-A	0.128	0.203	0.968

Akut dönem gruplara ait MPO değerlerinin ikili karşılaştırmalarında ise KONTROL/ MP-A ( $p<0.001$ ), KONTROL/ PX-A ( $p=0.003$ ), KONTROL/ MPPX-A ( $p=0.003$ ), SHAM-A/ MP-A ( $p<0.001$ ), MP-A/PX-A ( $p=0.026$ ) ve MP-A/ MPPX-A

( $p=0.027$ ) grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı farklılık olduğu saptandı (Tablo 8).

**Tablo 8:** Akut döneme ait MPO değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu *One-Way ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi*,  $p<0.05$  (MPO: myeloperoksidasyon)

Gruplar	MPO		
	Ortalama Fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-A	-2.358	0.974	0.151
KONTROL/ MP-A	-7.362	0.974	<0.001
KONTROL/ PX-A	-4.148	0.974	0.003
KONTROL/ MPPX-A	-4.160	0.974	0.003
SHAM-A/ MP-A	-5.004	0.974	<0.001
SHAM-A/ PX-A	-1.790	0.974	0.381
SHAM-A/ MPPX-A	-1.802	0.974	0.375
MP-A/ PX-A	3.214	0.974	0.026
MP-A/ MPPX-A	3.202	0.974	0.027
PX-A/ MPPX-A	-0.012	0.974	1.000

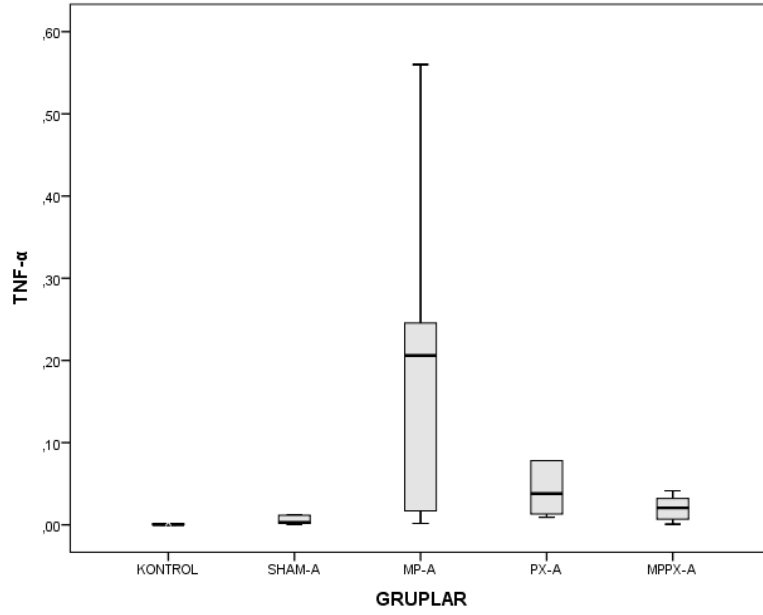
#### 4.1.4. PCR gen ekspresyon analizi

Çalışmanın akut dönemine ait PCR gen ekspresyon inceleme sonuçları aşağıdaki tanımlayıcı tabloda ve dağılım grafiğinde ayrıntılı olarak verildi (Tablo 9, Grafik 5, Grafik 6).

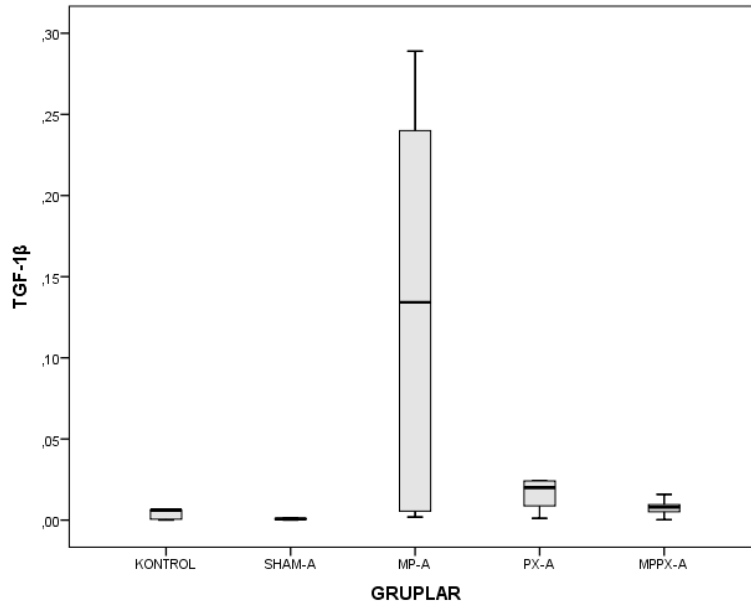
**Tablo 9:** Akut dönemde yapılan PCR gen ekspresyon inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Değişken	Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
TNF- $\alpha$	KONTROL	0.000	0.003	0.001	0.00
	SHAM-A	0.001	0.037	0.010	0.02
	MP-A	0.002	0.560	0.206	0.23
	PX-A	0.009	0.212	0.070	0.08
	MPPX-A	0.001	0.041	0.020	0.02
TGF-1 $\beta$	KONTROL	0.000	0.019	0.006	0.01
	SHAM-A	0.000	0.001	0.001	0.00
	MP-A	0.002	0.289	0.134	0.13
	PX-A	0.001	0.063	0.023	0.02
	MPPX-A	0.000	0.016	0.008	0.01





**Grafik 5:** Akut dönem gruplarına ait TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)



**Grafik 6:** Akut dönem gruplarına ait TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Bu verilerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında TNF- $\alpha$  (F=3.076, p=0.040) ve TGF-1 $\beta$  (F=4.421, p=0.010) gen ekspresyon değerlerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi (Tablo 10).

**Tablo 10:** Tüm grupların PCR gen ekspresyon analizi sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One Way-ANOVA* testi;  $p < 0.05$  (df: serbestlik dereceleri; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Değişken	df	F	p
TNF- $\alpha$	4	3.076	<b>0.040</b>
TGF-1 $\beta$	4	4.421	<b>0.010</b>

Akut döneme ait verilerin ikili gruplar halinde yapılan karşılaştırmalarında TNF- $\alpha$  sonuçları bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı saptandı (Tablo 11).

Ayrıca TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon değerleri açısından KONTROL/ MP-A ( $p=0.023$ ), SHAM-A/ MP-A ( $p=0.016$ ) ve MP-A/ MPPX-A ( $p=0.024$ ) gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu tespit edildi (Tablo 12).

**Tablo 11:** TNF- $\alpha$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında veriler arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p < 0.05$  (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)

Gruplar	TNF- $\alpha$		
	Ortalama fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-A	-0.010	0.069	1.000
KONTROL/ MP-A	-0.205	0.069	0.050
KONTROL/ PX-A	-0.069	0.069	0.849
KONTROL/ MPPX-A	-0.019	0.069	0.999
SHAM-A/ MP-A	-0.195	0.069	0.067
SHAM-A/ PX-A	-0.059	0.069	0.906
SHAM-A/ MPPX-A	-0.010	0.069	1.000
MP-A/ PX-A	0.136	0.069	0.309
MP-A/ MPPX-A	0.186	0.069	0.088
PX-A/ MPPX-A	0.050	0.069	0.948

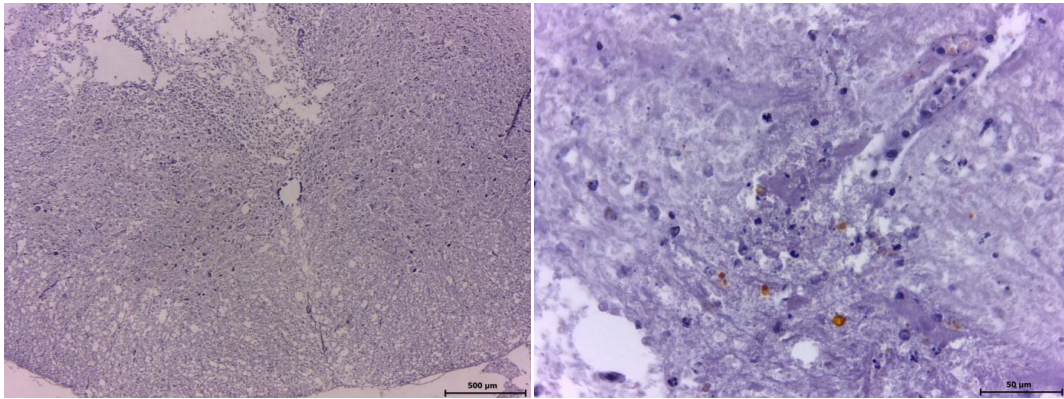
**Tablo 12:** TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında KONTROL/MP-A, SHAM-A/ MP-A ve MP-A/ MPPX-A gruplarının verileri arasında fark olduğu saptandı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi*;  $p < 0.05$  (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta).

Gruplar	TGF-1 $\beta$		
	Ortalama fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-A	0.006	0.038	1.000
KONTROL/ MP-A	-0.128	0.038	<b>0.023</b>
KONTROL/ PX-A	-0.017	0.038	0.991
KONTROL/ MPPX-A	-0.001	0.038	1.000
SHAM-A/ MP-A	-0.133	0.038	<b>0.016</b>
SHAM-A/ PX-A	-0.023	0.038	0.974
SHAM-A/ MPPX-A	-0.007	0.038	1.000
MP-A/ PX-A	0.111	0.038	0.058
MP-A/ MPPX-A	0.126	0.038	<b>0.024</b>
PX-A/ MPPX-A	0.016	0.038	0.993

## 4.2. Subakut döneme ait bulgular:

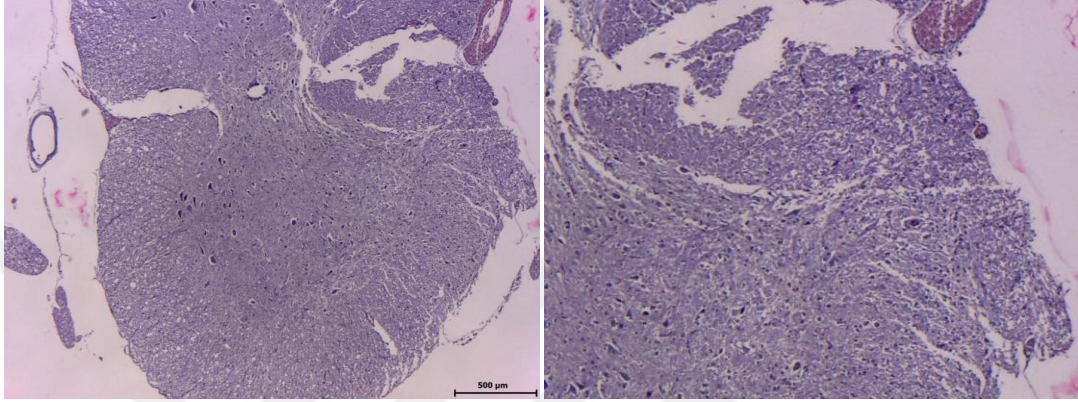
### 4.2.1. Işık mikroskopisi

SHAM-S grubunda yer yer hemosiderin yüklü makrofajların varlığı dikkati çekti. Herhangi bir kanama alanına rastlanmadı. Ancak geniş kistik kavitasyonlarla birlikte yaygın nöronal nekrozların varlığı tespit edildi. Akut gruba göre hücre infiltrasyonlarının daha hafif olduğu olduğu görüldü (Resim 7).



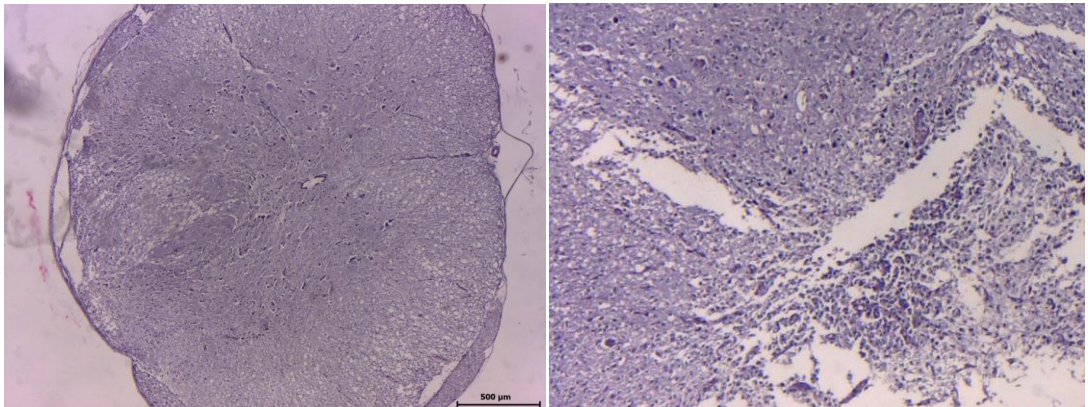
**Resim 7:** SHAM-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

MP-S grubunda nöronal nekroz alanları tespit edildi ancak doku bütünlüğünün oldukça iyi olduğu tespit edildi. Kistik kavitasyonların akut gruba göre oldukça az ve küçük olduğu dikkati çekti. Damarlarda hiperemi görüldü (Resim 8).



**Resim 8:** MP-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

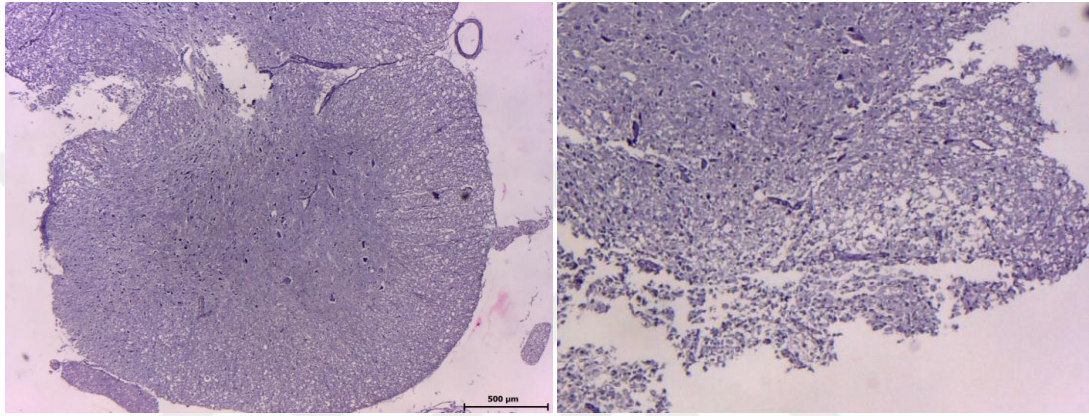
PX-S grubunda genel durumun biraz akut gruba göre daha iyi olduğu görüldü. Ama yine dikkat çekici düzeyde kistik kavitasyonlar ve daha hafif mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü (Resim 9).



**Resim 9:** PX-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)



MPPX-S grubunda akut gruba göre doku bütünlüğünün oldukça iyi bir durumda olduğu görüldü. Orta şiddette nöronal nekrozlar tespit edildi. Bazı deneklerde kistik kavitasyonların akut gruba göre daha az ve küçük yapıda olduğu görüldü ve beyaz maddede kayıp saptandı ancak akut gruba göre önemli düzeyde azdı (Resim 10).



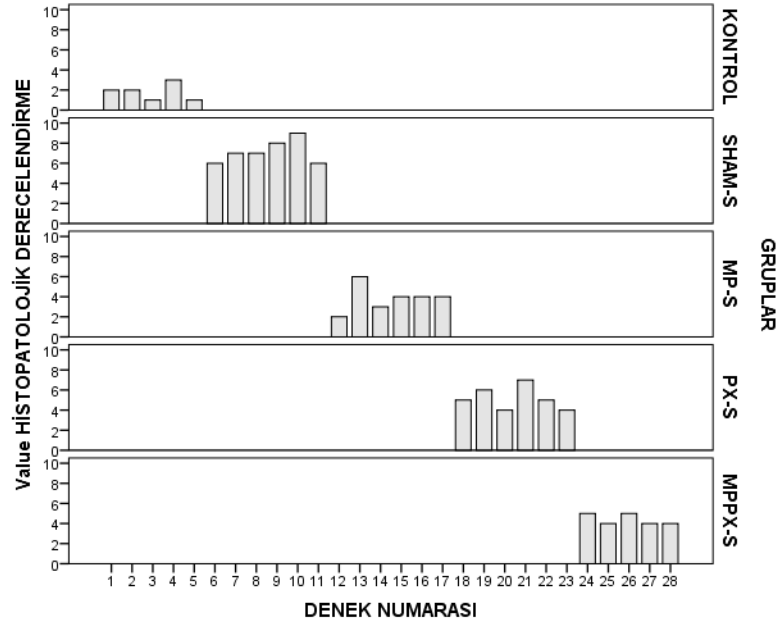
**Resim 10:** MPPX-S grubuna ait histopatolojik görünüm (H&E, X100 ve 40X)

#### 4.2.2. Histopatolojik inceleme

Çalışmanın subakut dönemine ait histopatolojik inceleme sonuçlarının tanımlayıcı tablo ve dağılım grafiği aşağıda sunuldu (Tablo 13, Grafik 7):

**Tablo 13:** Subakut dönemde elde edilen histopatolojik evreleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma)

Gruplar	N	Minimum	Maksimum	Medyan	SS
KONTROL	5	1	3	2	0.84
SHAM-S	6	6	9	7	1.17
MP-S	6	2	6	4	1.33
PX-S	6	4	7	5	1.17
MPPX-S	5	4	5	4	0.55



**Grafik 7:** Subakut döneme ait histopatolojik evreleme puanları bar grafiği

Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı ( $X^2=18.304$ ,  $p<0.001$ ) (Tablo 14)

**Tablo 14:** Tüm grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *Kruskal Wallis* testi;  $p<0.05$  ( $X^2$ : ki-kare, df: serbestlik dereceleri)

Değişken	df	$X^2$	p
Histopatolojik düzey	4	18.304	<0.001

Grupların ikili karşılaştırması sonrası histopatolojik evreleme sonuçlarının gruplar arasında farklı olmadığı gözlemlendi (Tablo 15).

**Tablo 15:** Subakut söneme ait histopatolojik evreleme sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında grupların verileri arasında istatistiksel fark saptanmadı. *Mann Whitney U* testi ve *Bonferroni düzeltme* testi;  $p < 0.005$  (Z: Z puanı)

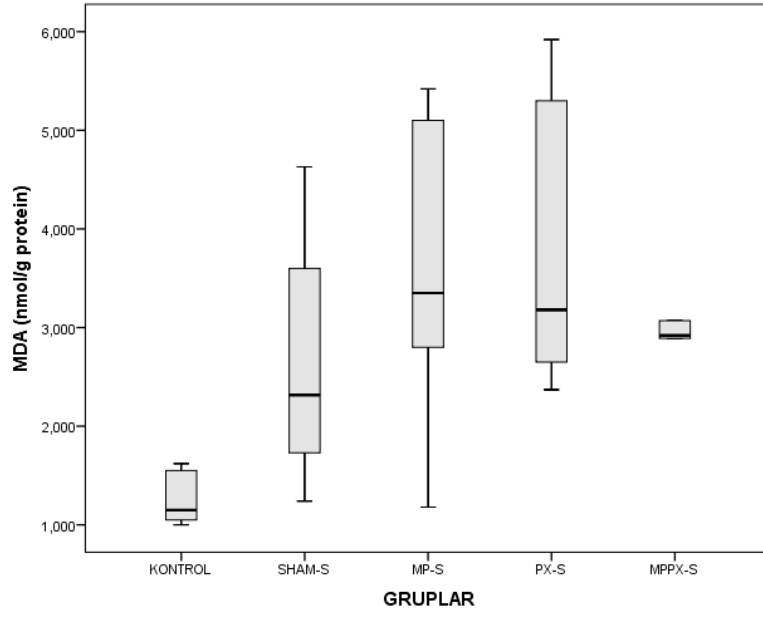
Gruplar	Z	p
KONTROL/ SHAM-S	-2.764	0.006
KONTROL/ MP-S	-2.336	0.019
KONTROL/ PX-S	-2.764	0.006
KONTROL/ MPPX-S	-2.668	0.008
SHAM-S/ MP-S	-2.766	0.006
SHAM-S/ PX-S	-2.282	0.022
SHAM-S/ MPPX-S	-2.783	0.005
MP-S/ PX-S	-1.750	0.080
MP-S/ MPPX-S	-1.098	0.272
PX-S/ MPPX-S	-1.179	0.238

#### 4.2.3. Biyokimyasal inceleme

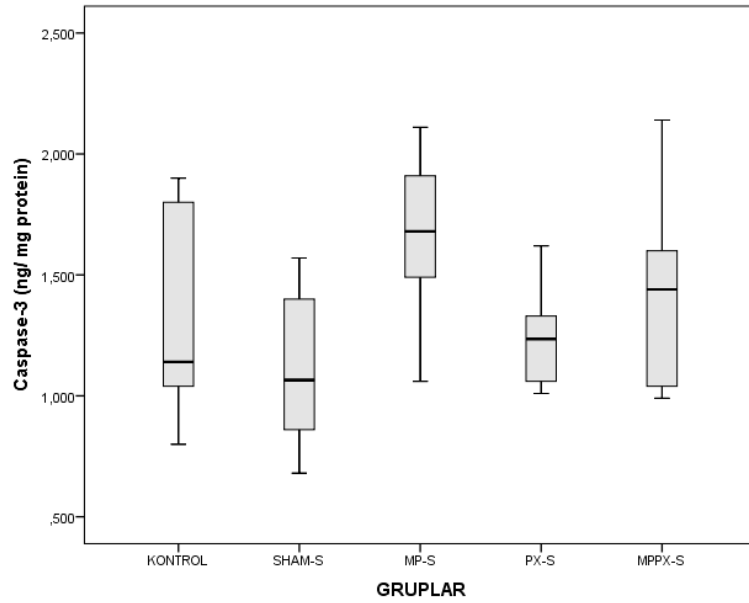
Çalışmanın subakut dönem gruplarına ait biyokimyasal inceleme sonuçlarının tanımlayıcı tablosu ve bu değerlerin dağılım grafikleri aşağıda sunuldu (Tablo 16, Grafik 8, Grafik 9, Grafik10).

**Tablo 16:** Subakut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon; SS: standart sapma)

GRUP		N	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
KONTROL	MDA	5	1.000	1.620	1.274	0.29
	Caspase-3	5	0.800	1.900	1.336	0.49
	MPO	5	1.012	1.880	1.402	0.34
SHAM-S	MDA	6	1.240	4.630	2.638	1.26
	Caspase-3	6	0.680	1.570	1.107	0.34
	MPO	6	4.250	7.500	5.471	1.23
MP-S	MDA	6	1.180	5.420	3.533	1.56
	Caspase-3	6	1.060	2.110	1.655	0.36
	MPO	6	3.950	10.970	7.503	2.28
PX-S	MDA	6	2.370	5.920	3.766	1.50
	Caspase-3	6	1.010	1.620	1.248	0.22
	MPO	6	4.530	7.310	5.810	0.91
MPPX-S	MDA	5	1.860	3.750	2.898	0.68
	Caspase-3	5	0.990	2.140	1.442	0.47
	MPO	5	4.550	8.910	6.438	1.82

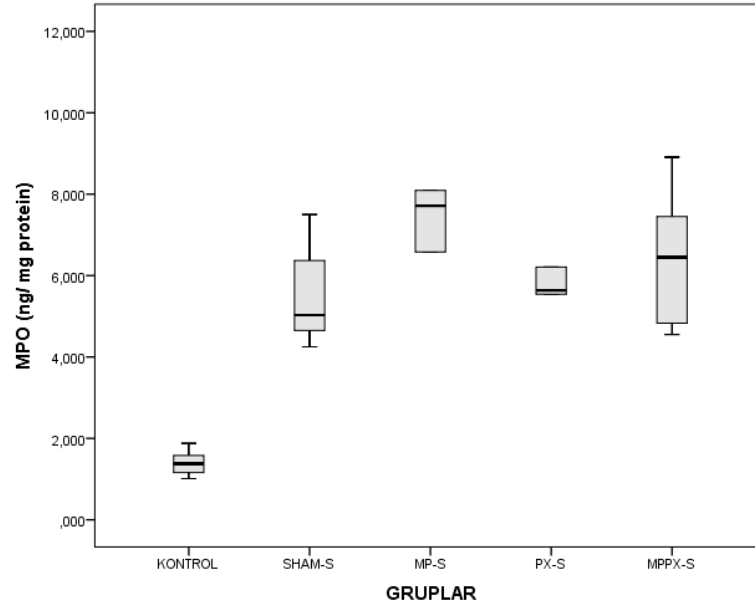


**Grafik 8:** Subakut dönem gruplarına ait malondialdehid düzeyi değerleri grafiği (MDA: malondialdehit)



**Grafik 9:** Subakut dönem gruplarına ait caspase-3 düzeyi değerleri grafiği





**Grafik 10:** Subakut dönem gruplarına ait myeloperoksidasyon düzeyi değerleri grafiği (MPO: myeloperoksidasyon)

Bu verilere uygulanan tek yönlü varyans analizi test sonuçları tüm gruplar arasında sadece MDA ( $F=3.507$ ,  $p=0.022$ ) ve MPO ( $F=12.595$ ,  $p<0.001$ ) değerleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğunu gösterdi (Tablo 17).

**Tablo 17:** Subakut dönemde elde edilen biyokimyasal inceleme sonuçlarının gruplar arası karşılaştırma sonuçları tablosu. *One-Way ANOVA* testi,  $p<0.05$ . (df: degrees of freedom; F: F değeri; MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon)

Değişken	df	F	p
MDA	4	3.507	<b>0.022</b>
Caspase-3	4	1.772	0.169
MPO	4	12.595	<b>&lt;0.001</b>

Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda MDA düzeylerinin KONTROL/ MP-S ( $p=0.038$ ) ve KONTROL/ PX-S ( $p=0.019$ ) grupları arasında farklı olduğu gözlemlendi. (Tablo 18).

Diğer yandan gruplar arası ikili karşılaştırmalarda MPO düzeylerinin KONTROL/ SHAM-S (p=0.001), KONTROL/ MP-S (p<0.001), KONTROL/ PX-S (p=0.001) ve KONTROL/ PXMP-S (p<0.001) grupları arasında farklı olduğu gözlemlendi (Tablo 19).

**Tablo 18:** Subakut döneme ait MDA değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi; p<0.05 (MDA: malondialdehit)*

MDA			
Gruplar	Ortalama Fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-S	-1.364	0.732	0.364
KONTROL/ MP-S	-2.259	0.732	<b>0.038</b>
KONTROL/ PX-S	-2.493	0.732	<b>0.019</b>
KONTROL/ MPPX-S	-1.624	0.765	0.245
SHAM-S/ MP-S	-0.895	0.698	0.705
SHAM-S/ PX-S	-1.128	0.698	0.503
SHAM-S/ MPPX-S	-0.260	0.732	0.996
MP-S/ PX-S	-0.233	0.698	0.997
MP-S/ MPPX-S	0.635	0.732	0.906
PX-S/ MPPX-S	0.869	0.732	0.759

**Tablo 19:** Subakut döneme ait MPO değerlerinin ikili grup karşılaştırma tablosu. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma testi; p<0.05 (MPO: myeloperoksidasyon)*

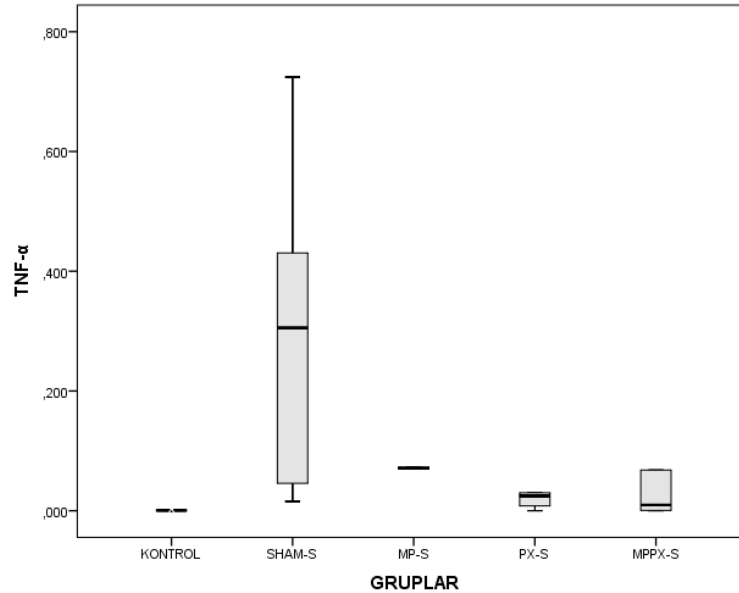
MPO			
Gruplar	Ortalama Fark	Standart Hata	p
KONTROL/ SHAM-S	-4.069	0.906	<b>0.001</b>
KONTROL/ MP-S	-6.101	0.906	<b>&lt;0.001</b>
KONTROL/ PX-S	-4.408	0.906	<b>0.001</b>
KONTROL/ MPPX-S	-5.036	0.947	<b>&lt;0.001</b>
SHAM-S/ MP-S	-2.032	0.864	0.165
SHAM-S/ PX-S	-0.338	0.864	0.995
SHAM-S/ MPPX-S	-0.966	0.906	0.822
MP-S/ PX-S	1.693	0.864	0.316
MP-S/ MPPX-S	1.065	0.906	0.765
PX-S/ MPPX-S	-0.628	0.906	0.956

#### 4.2.4. PCR gen ekspresyon analizi

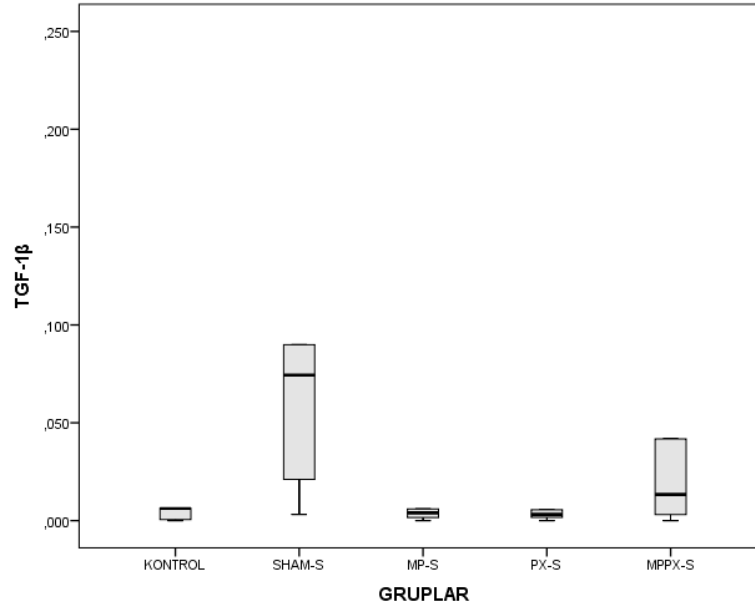
Çalışmanın subakut dönemine ait PCR gen ekspresyon inceleme sonuçları aşağıdaki tanımlayıcı tabloda ve dağılım grafiklerinde ayrıntılı olarak verildi (Tablo 20, Grafik 11, Grafik 12).

**Tablo 20:** Subakut dönemde yapılan PCR gen ekspresyon inceleme sonuçlarına ait tanımlayıcı tablo (N: grup içi denek sayısı; SS: standart sapma; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Değişken	Gruplar	Minimum	Maksimum	Ortalama	SS
TNF- $\alpha$	KONTROL	0.000	0.003	0.001	0.00
	SHAM-S	0.015	0.724	0.305	0.26
	MP-S	0.001	0.138	0.070	0.05
	PX-S	0.000	0.088	0.029	0.03
	MPPX-S	0.000	0.237	0.063	0.10
TGF-1 $\beta$	KONTROL	0.000	0.019	0.006	0.01
	SHAM-S	0.003	0.228	0.082	0.08
	MP-S	0.000	0.017	0.005	0.01
	PX-S	0.000	0.014	0.005	0.01
	MPPX-S	0.000	0.146	0.041	0.06



**Grafik 11:** Subakut dönem gruplarına ait TNF- $\alpha$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)



**Grafik 12:** Subakut dönem gruplarına ait TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeyi değerleri grafiği (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Bu verilerin istatistiksel karşılaştırmasında tüm gruplar arasında TNF- $\alpha$  (F=4.940, p=0.005) ve TGF-1 $\beta$  (F=3.294, p=0.028) gen ekspresyon değerlerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi (Tablo 21).

**Tablo 21:** Subakut döneme ait grupların PCR gen ekspresyon analizi sonuçlarının istatistiksel anlamlılık karşılaştırmalarında gruplar arasında belirgin istatistiksel fark saptandı. *One Way-ANOVA* testi; p<0.05 (df: serbestlik dereceleri; TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Değişken	df	F	p
TNF- $\alpha$	4	4.940	<b>0.005</b>
TGF-1 $\beta$	4	3.294	<b>0.028</b>

Subakut döneme ait grupların ikili karşılaştırmasında TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçları bakımından KONTROL/ SHAM-S (p=0.007), SHAM-S/ MP-S (p=0.038), SHAM-S/ PX-S (p=0.011) ve SHAM-S/ MPPX-S (p=0.043) grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptandı (Tablo22).

Subakut döneme ait grupların ikili karşılaştırmasında TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon sonuçları bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı (Tablo23).

**Tablo 22:** TNF- $\alpha$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında SHAM-S grubu verileri ile diğer tüm grupların verileri arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p < 0.05$  (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha)

Gruplar	TNF- $\alpha$		
	Ortalama fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-S	-0.303	0.079	<b>0.007</b>
KONTROL/ MP-S	-0.069	0.079	0.904
KONTROL/ PX-S	-0.028	0.079	0.996
KONTROL/ MPPX-S	-0.062	0.083	0.943
SHAM-S/ MP-S	0.234	0.076	<b>0.038</b>
SHAM-S/ PX-S	0.275	0.076	<b>0.011</b>
SHAM-S/ MPPX-S	0.241	0.079	<b>0.043</b>
MP-S/ PX-S	0.041	0.076	0.982
MP-S/ MPPX-S	0.007	0.079	1.000
PX-S/ MPPX-S	-0.034	0.079	0.993

**Tablo 23:** TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon analizi sonuçları bakımından grupların ikili istatistiksel anlamlılık karşılaştırmasında anlamlı fark saptanmadı. *One Way-ANOVA-Tukey çoklu karşılaştırma* testi;  $p < 0.05$  (TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Gruplar	TGF-1 $\beta$		
	Ortalama fark	Standart hata	p
KONTROL/ SHAM-S	-0.076	0.027	0.075
KONTROL/ MP-S	0.001	0.027	1.000
KONTROL/ PX-S	0.002	0.027	1.000
KONTROL/ MPPX-S	-0.034	0.029	0.749
SHAM-S/ MP-S	0.076	0.026	0.053
SHAM-S/ PX-S	0.077	0.026	0.050
SHAM-S/ MPPX-S	0.041	0.027	0.572
MP-S/ PX-S	0.001	0.026	1.000
MP-S/ MPPX-S	-0.035	0.027	0.698
PX-S/ MPPX-S	-0.036	0.027	0.681

### 4.3. Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması

Akut ve subakut dönemlere ait grupların histopatolojik evreleme verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında MPPX-A/ MPPX-S ( $Z=-2.479$ ,  $P=0.013$ ) grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. (Tablo 24).

**Tablo 24:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların histopatolojik evreleme verilerinin ikili karşılaştırma tablosu. *Mann Whitney U* testi,  $p<0.05$  ( $Z$ :  $Z$  skoru)

Gruplar	Z	p
SHAM-A/ SHAM-S	-1.129	0.259
MP-A/ MP-S	-1.220	0.222
PX-A/ PX-S	-1.129	0.259
MPPX-A/ MPPX-S	-2.479	<b>0.013</b>

Diğer yandan biyokimyasal verilerin ikili grup karşılaştırmalarında sadece SHAM-A/ SHAM-S ( $t=-2.782$ ,  $p=0.021$ ) grupları arasında MPO düzeyleri bakımından farklılık saptandı (Tablo 25).

**Tablo 25:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların biyokimyasal verilerinin ikili karşılaştırma tablosu. *Independent Samples t* testi,  $p<0.05$  (MDA: malondialdehit; MPO: myeloperoksidasyon)

Gruplar	MDA		Caspase-3		MPO	
	t	p	t	p	t	p
SHAM-A/ SHAM-S	2.199	0.055	-1.184	0.267	-2.782	<b>0.021</b>
MP-A/ MP-S	-0.137	0.894	0.558	0.590	0.866	0.409
PX-A/ PX-S	-0.055	0.957	-0.345	0.738	-0.324	0.753
MPPX-A/ MPPX-S	1.018	0.339	-1.570	0.155	-0.856	0.417

Ayrıca PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının ikili grup karşılaştırmalarında SHAM-A/ SHAM-C grupları arasında TNF- $\alpha$  ( $t=-2.482$ ,  $p=0.035$ ) ve MP-A/ MP-S grupları arasında TGF-1 $\beta$  ( $t=2.422$ ,  $p=0.039$ ) gen ekspresyon düzeylerinin farklı olduğu saptandı (Tablo 26).

**Tablo 26:** Akut dönem ile subakut döneme ait grupların PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının ikili karşılaştırma tablosu. *Independent Samples t* testi,  $p < 0.05$  (TNF- $\alpha$ : Tumor Necrosis Factor-alpha; TGF-1 $\beta$ : Tissue Growth Factor-1beta)

Gruplar	TNF- $\alpha$		TGF-1 $\beta$	
	t	p	t	p
SHAM-A/ SHAM-S	-2.482	<b>0.035</b>	-2.260	0.050
MP-A/ MP-S	1.452	0.180	2.422	<b>0.039</b>
PX-A/ PX-S	1.113	0.295	1.897	0.090
MPPX-A/ MPPX-S	-0.929	0.380	-1.209	0.261

## 5. TARTIŞMA

### 5.1. Histopatolojik inceleme sonuçları

Omurilik yaralanmalarının klinik tedavisinde steroid kökenli ilaçlar ilk kez 1969 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra 1984 yılında çok merkezli yapılan çalışmalarda (NASCIS; National Acute Spinal Cord Injury Study) bu steroidlerin yüksek dozda kullanımının (30 mg/kg bolus ve takiben 5.4 mg/kg/ saat idame dozu intravenöz infüzyon ile) omurilik yaralanmasının erken dönemlerinde (yaralanmanın ilk 3-8 saatlik döneminde) belirgin klinik düzelmeye sağlayabileceği önerilmiştir (9). Ancak 2006 yılında yapılan çok merkezli çalışmalarda (North American Spine Surgeons) steroid tedavisi uygulanan omurilik yaralanmalı hastaların ancak %24.1' lik kısmında klinik düzelmeye olduğu ve bunların da büyük kısmını hafif düzey omurilik yaralanmalı hastaların oluşturduğu rapor edilmiştir (16, 49). Ayrıca yüksek doz steroid kullanımının klinik düzelmeye sağlayamadığı ve aksine infeksiyon riskini (özellikle akciğer infeksiyonları, sepsis gibi) arttırdığı da savunulmuştur (17, 35, 41). Ayrıca bu çalışmalarda pediatrik yaş grubu hastalarında steroid tedavisinin etkilerinin belirsiz olduğu savunulmuştur. Bu arada yapılan birçok deneysel çalışmada steroid tedavisinin omurilik yaralanmalarında ne histopatolojik

düzyede ne de fonksiyonel düzeyde (motor ve duyusal kayıpları azaltıcı yönde) tedavi edici etkinliğinin olmadığı savunulmuştur.

Bizim çalışmamızın akut dönem gruplarında sadece travma uygulanan deneklerde gri ve beyaz maddede şiddetli kistik kavitasyonlar, yoğun kanama alanları ve mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. Metilprednizolon uygulanan deneklerde yaygın nöronal nekrozla beraber daha hafif kistik kavitasyonların ve kanama alanlarının olduğu dikkati çekti. Parecoxib verilen bazı deneklerde doku bütünlüğünün çok iyi korunduğu ancak kistik kavitasyonlarla ve yaygın nöronal nekrozla beraber hafif düzeyde hücre infiltrasyonlarının olduğu görüldü. Metilprednizolon ve parecoxib birlikte verilen deneklerde ise beyaz maddede yaygın kanama alanları ile beraber kistik kavitasyonlar ve orta düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi.

Diğer yandan bu döneme ait grupların histopatolojik evreleme sonuçlarının istatistiksel analizleri sonunda gruplar arasında evre farkının olmadığı saptandı. Ancak sayısal verilere bakıldığında sadece travma uygulanan grubun evreleme puanlarının diğer gruplardan daha yüksek olduğu görüldü. Bu koşulda da parecoxib ve metilprednizolonun tek başına ya da birlikte kullanıldığı koşulda omurilik yaralanmasında histopatolojik düzeyde az da olsa faydalı etkilerinin olabileceği düşünöldü.

Çalışmanın subakut dönemine ait travma uygulanan ancak ilaç verilmeyen deneklerde geniş kistik kavitasyonlarla birlikte yaygın nöronal nekroz ve yer yer hemosiderin yüklü makrofajların varlığı ve akut gruba göre daha hafif hücre infiltrasyonlarının olduğu dikkati çekti. Metilprednizolon verilen deneklerde ise doku bütünlüğünün oldukça iyi olduğu, nöronal nekroz ve kistik kavitasyon alanlarının



akut döneme göre oldukça az ve küçük olduğu dikkati çekti. Parecoxib verilen deneklerde ise genel durumun akut gruba göre biraz daha iyi olduğu ancak dikkat çekici düzeyde kistik kavitasyonların ve daha hafif mononükleer hücre infiltrasyonlarının olduğu görüldü. Kombine tedavi uygulanan deneklerde ise akut gruba göre doku bütünlüğünün oldukça iyi bir durumda olduğu, orta şiddette nöronal nekroz olduğu tespit edildi.

Histopatolojik evreleme verilerinin istatistiksel analiz sonuçlarına bakıldığında ise parecoxibe ve metilprednizolonun tek başına ve diğeri ile birlikte verildiği koşulda ratlarda oluşturulan omurilik yaralanmasının subakut dönemine ait histopatolojik bulguları düzeltmediği saptandı. Ancak sayısal veriler incelendiğinde her iki etken maddenin de omurilik yaralanmasının histopatolojik evreleme puanlarını bir miktar azaltabildiği ve bu bulgularla omurilik yaralanmasının tedavisinde az da olsa tedavi edici faydalı etkilerinin olabileceği düşünüldü.

Akut ve subakut dönemlere ait grupların histopatolojik evreleme verilerinin ikili istatistiksel karşılaştırılmasında MPPX-A/ MPPX-S grupları arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı. Bu grupların medyan değerlerine bakıldığında subakut dönemde deneklerin histopatolojik evre puanlarının kombine ilaç kullanımı sonrası belirgin azaldığı tespit edildi. Diğer gruplarda bu azalmanın olmadığı gözlemlendi.

### ***5.2. Biyokimyasal inceleme sonuçları***

Primer yaralanma sonrası ortaya çıkan iskemi ve takiben gelişen reperfüzyon hasarı omurilikteki yaralanmanın şiddetini artırmaktadır. Özellikle iskemi/ hipoksi sonrası ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri hücre membranındaki fosfolipitlerle reaksiyona girerek araşidonik asit ve lipit peroksitlerin ortama

salınmasına neden olmaktadır. Bu ise siklooksijenaz yolağını tetikleyerek tromboksan ve lökotrienlerin yaralı dokudaki sentez ve salınımlarını artırarak fizyolojik dengenin bozulmasını tetiklemekte ve bu bozulma kısır döngü haline gelerek yıkımın daha da artmasına neden olmaktadır. Daha önce literatürde tedavi amaçlı kullanılan metilprednizolonun bazı yararlı etkilerinin olabileceği bildirilmiştir. Özellikle yaralı nöral dokuda kan dolaşımını artırarak vazojenik ödemi ve iskeminin etkilerini azaltabileceği, kan-beyin bariyerini düzeltebileceği, hipofiz kökenli endorfin salınımını inhibe edebileceği, lizozomal membranları stabilize ederek hem inflamatuvar cevabı azaltabileceği ve hem de doku yıkımını engelleyebileceği savunulmuştur. Bu etkilerin büyük çoğunluğunun lipit peroksitleri azaltıcı antioksidan kapasitelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca bu ajanın tüm hücre membranlarından geçebilmesi ve daha az kemik iliği supresyonu yapması kullanım avantajları arasında değerlendirilmiştir (2).

Bizim çalışmamızın hipotezinde COX-2 enzimini selektif inhibe etmeye yönelik olarak kullanılan parecoxib ve non-selektif COX inhibitörü metilprednizolon isimli farmakolojik ajanların araşidonik asit metabolizması ürünü olan tromboksan ve lökotrien sentezini azaltarak yaralı dokudaki serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltacağı ve indirekt yoldan lipit peroksidasyon döngüsünü inhibe edebileceği varsayıldı. Ancak çalışma sonuçlarına bakıldığında akut döneme ait tüm çalışma grupları arasında MDA değerleri açısından farklılık saptanmadı. Her ne kadar sadece travma uygulanan ancak ilaç verilmeyen grubun MDA değerleri sayısal olarak diğer gruplardan daha yüksek bulunsa da bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Subakut döneme ait çalışma grubu sonuçlarına bakıldığında da sonuçların değişmediği görüldü. Subakut döneme ait grupların MDA düzeylerinin SHAM-S grubu düzeylerinden farklı olmaması bu iki etken maddenin lipid peroksidasyon düzeylerini azaltma ve serbest oksijen radikali oluşumunu baskılama yönünde etkili olmadığını düşündürdü. Böylece ne metilprednizolonun, ne parecoxibin ne de bunların birlikte kullanımının ratlarda omurilik yaralanması modelinde MDA düzeylerini azaltıcı, lipid peroksidasyonu engelleyici ve serbest radikal oluşumunu baskılayıcı etkiye sahip olmadığı düşünüldü.

Liu ve ark omurilik yaralanmalarının ilk 4 saatinde lezyon içinde kalan nöronlarda apoptoz geliştiğini ve bu sürecin ilk 8 saatinde maksimuma ulaştığını rapor etmişlerdir. Ayrıca yaralanmadan birkaç gün sonrasında dejenerasyona uğramış aksonlarla birlikte oligodendrositlerde de apoptozun olduğunu gözlemlemişlerdir. Steroidlerin glial hücrelerin apoptozunu ve yaralı dokuda meydana gelen inflamatuvar süreçleri azalttığı ancak nöronal kaybı engelleyemediği savunulmuştur (30, 31).

Bizim çalışmamızda metilprednizolon isimli farmakolojik ajanın omurilik yaralanmasının akut döneminde yaralı dokudaki caspase-3 düzeyini azaltmadığı aksine arttırdığı saptandı. Ayrıca her ne kadar metilprednizolon uygulanan grup hariç diğer grupların kontrol grubu değerlerine göre sayısal olarak daha düşük caspase-3 ölçüm değerleri olsa da bu düşük değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Öte yandan omurilik yaralanmasının akut döneminde parecoxib isimli ajanın tek başına ya da metilprednizolon ile kombine uygulanması sonrası caspase-3 düzeyleri üzerinde değiştirici etkiye sahip olmadığı ve bu nedenle de apoptozu baskılayıcı ya da azaltıcı etkiye sahip olamadığı sonucuna ulaşıldı.

Çalışmanın subakut dönemine ait gruplar arasında da caspase-3 düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık saptanmadı. Böylece subakut dönemde parexocib, metilprednizolon ya da bunların birlikte kullanımının apopitoz belirteci olan caspase-3 proteini üzerinde değiştirici etkinliğinin olmadığı sonucuna ulaşıldı.

Diğer yandan her bir grubun akut dönem ve subakut döneme ait sayısal verilerine geri dönüp bakıldığında da caspase-3 düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık saptanmadı. Sonuç olarak her iki farmakolojik ajanın hem tek başına ve hem de kombine kullanımı sonrası apopitozun belirteci olan caspase-3 düzeylerini azaltıcı ya da değiştirici etkiye sahip olmadıkları ve apopitozu baskılayıcı ya da azaltıcı etki oluşturamadıkları sonucuna ulaşıldı.

Omurilik yaralanmalarında yaralanan dokuya ilk gelen savunma hücreleri nötrofiller olup bu hücrelerden ortama proinflamatuvar sitokinler, kemokinler, proteolitik enzimler ve reaktif oksijen parçaları salgırlar. MPO proteini nötrofillerin ve monositlerin primer granüllerinde bulunur ve ortama hipoklorik asit salınımında major etkindir. Bu sitotoksik ürünler ve hipoklorik asit omurilikte hem lipid peroksidasyonu tetikleyerek myelin yıkımına, hem proteazları aktive ederek hücre iskelet ve membran proteinlerinin parçalanmasına ve hücrel nekroza ve hem de  $Ca^{2+}$ -ATPase enzimini bozarak hücre içi kalsiyum birikime neden olur. Bu kalsiyum birikimi ve hipoklorik asitin kendisi hem proteazları aktive ederek, hem glutatyon yıkımı yaparak ve hem de antiapoptotik Bcl-2 proteinini yıkarak devamında apopitozise gidişe neden olur. Ayrıca hipoklorik asit hem caspase proteinlerini ve hem de mitokondrial yıkım sonrası ortaya çıkan sitokrom-c proteini üzerinden apopitozis mekanizmalarını başlatır. Yukarıda bahsedilen bu durumlar ise nöronal yaralanmanın daha da artmasına ve daha fazla nörolojik kayba neden olur. Ayrıca

MPO nötrofillerin CD11b/CD18 integrin molekülüne bağlanarak nötrofillerin damar duvarına yapışıp (*adherence*) damar dışına çıkışlarını (*extravasation*) da artırır. Toplamda MPO hem kemoatraksiyonla nötrofillerin yaralı dokuya gelişini ve ortamda artışını, hem de HOCl üzerinden ve kendi başına yaralı dokunun düzenlenip ölü dokuların ortamdaki temizlenmesini sağlayan bir proteaz proteindir (27).

Bu çalışmada omurilik yaralanmasının akut ve subakut döneminde MPO aktivitesinin düzeyi araştırılmaya çalışılmış ve böylece hem nötrofilik aktivitenin düzeyi indirekt yoldan değerlendirilmek ve hem de oluşan sekonder yaralanmanın düzeyi yine indirekt yoldan ölçülmek istendi. Çalışmanın akut döneme ait MPO düzeylerine bakıldığında metilprednizolon isimli farmakolojik ajanın doku MPO düzeyi değerlerini arttırdığı (MP-A grubu değerlerinin SHAM-A grubu ve diğer grupların değerlerinden daha yüksek olması nedeni ile) düşünüldü. Öte yandan her ne kadar istatistiksel olarak anlamlılık ispatlanmamış olsa da parecoxib uygulanan grubun da KONTROL ve SHAM-A grubu değerlerine göre sayısal olarak daha yüksek MPO düzeyi değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu bulgularla her iki etken maddenin de myeloperoksidaz aktivitesi üzerinde baskılayıcı etkisinin olmadığı, indirekt yoldan bakıldığında ise her iki etken maddenin de inflamatuvar hücre göçünü, lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikal oluşumunu azaltmadığı/baskılayamadığı düşünüldü.

Diğer yandan çalışmanın subakut döneme ait gruplarının MPO düzeylerine bakıldığında ise KONTROL grubu verileri hariç tüm grupların MPO değerlerinin benzer olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla omurilik yaralanmasının subakut döneminde her iki etken maddenin de myeloperoksidaz düzeylerini azaltma konusunda etkisiz olduğu; indirekt yoldan bakıldığında ise her iki etken maddenin de inflamatuvar

hücre göçünü, lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikal oluşumunu azaltmadığı/ baskılayamadığı düşünüldü.

Her bir grubun akut ve subakut döneme ait biyokimyasal verilerinin ikili karşılaştırması sonrasında sadece SHAM-A/ SHAM-S grupları arasında MPO düzeyleri bakımından farklılık saptandı. Ortalama MPO değerlerine bakıldığında akut döneme ait grupta MPO düzeyinin daha yüksek olduğu tespit edildi ve MPO düzeylerinin yaranmanın subakut döneminde belirgin azaldığı ancak çalışmada incelenen farmakolojik ajanların MPO düzeyleri üzerinde yaranmanın her iki döneminde de belirgin değiştirici etki oluşturamadığı düşünüldü.

### **5.3. PCR gen ekspresyon analizi sonuçları**

Bilindiği üzere TGF-1 $\beta$ ' nın proinflamatuvar özellikleri olup potent bir kemoatraktan moleküldür ve monositleri, astrositleri uyarır. Bu molekül başlıca inflamatuvar reaksiyonları yönetirken TGF-2 $\beta$  daha çok skar oluşumunda roller alır. TGF-1 $\beta$  aynı zamanda anti-inflamatuvar özelliklere de sahip olup sitokinlerin modülasyonunda, kemokinlerin sentezinde, hidrojen peroksit ve nitrik oksit oluşumunun engellenmesinde önemli görevler alır. Bu molekülün spesifik antikörlerle nötralize edildiği koşulda skar oluşumunun azaldığı gösterilmiştir. Ancak bu nötralizasyonun aynı zamanda büyüme hormonlarını da baskılaması nedeni ile aksonal rejenerasyonu da engellediği düşünülmektedir. Öte yandan bu iki molekülün de Wallerian dejenerasyon oluşmasında etkilerinin olmadığı ispatlanmıştır. Öte yandan TNF- $\alpha$ ' nın omurilik yaralanmalarının ilk 1-3 gününde artış gösterdiği ve proinflamatuvar etki oluşturduğu bilinmektedir. Oysa TGF-1 $\beta$ ' nın yaranmanın beşinci gününden sonra belirgin artış göstermeye başladığı da gösterilmiştir (10).

Yapılan bu çalışmanın akut ve subakut dönemlerinde tüm gruplar arasında TNF- $\alpha$  ve TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon değerlerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu tespit edildi. Akut döneme ait grupların ikili gruplar halinde yapılan karşılaştırmalarında TNF- $\alpha$  sonuçları bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı saptandı. Sayısal verilere bakıldığında ise metilprednizolon verilen grupta en fazla TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunun olduğu tespit edildi. Bu bulgularla her iki deneysel etken maddenin de omurilik yaralanmasının akut döneminde TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunu azaltmadığı düşünüldü. TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon değerleri açısından ise MP-A grubu ile KONTROL grubu, SHAM-A grubu, MPPX-A grubu arasında istatistiksel anlamlı fark olduğu tespit edildi. Sayısal verilere bakıldığında ise TGF-1 $\beta$  gen ekspresyonunun en fazla metilprednizolon verilen grupta olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla metilprednizolonun omurilik yaralanmasında TGF-1 $\beta$  gen ekspresyonunu arttırdığı düşünüldü.

Subakut döneme ait grupların ikili karşılaştırmasında SHAM-S grubu ile diğer tüm grupların TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçları arasında belirgin istatistiksel farklılık saptandı. Diğer yandan SHAM-S grubu dışındaki diğer grupların TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçları arasında farklılık gözlenmedi. Sayısal verilere bakıldığında TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçlarının SHAM-S grubunda en yüksek olduğu, parecoxib grubunun değerlerinin ise KONTROL grubundan sonra en düşük değere sahip olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla parecoxib ve metilprednizolonun omurilik yaralanmasının subakut döneminde TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunu belirgin düzeyde azalttığı sonucuna varıldı. TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon sonuçları bakımından ise gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı saptandı. Sayısal verilere bakıldığında ise SHAM-S grubunun TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon sonuçlarının diğer gruplara göre

belirgin yüksek olduğu gözlemlendi. Bu bulgularla omurilik yaralanmasının subakut döneminde TGF-1 $\beta$  gen ekspresyonunun henüz yeterli düzeye ulaşmadığı ve bu nedenle de gruplar arasında belirgin farklılık gözlenmediği düşünüldü.

Ayrıca yine her bir grubun akut ve subakut döneme ait PCR gen ekspresyon analiz sonuçlarının ikili karşılaştırmasında SHAM-A/ SHAM-C grupları arasında TNF- $\alpha$  ve MP-A/ MP-S grupları arasında TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin farklı olduğu saptandı. Bu sonuçlarla sayısal verilere dönüp bakıldığında omurilik yaralanmasının subakut döneminde omurilik yaralanması olan ancak deneysel etken madde verilmeyen gruba ait deneklerde TNF- $\alpha$  düzeyinin artış gösterdiği, diğer gruplarda ise bu sitokin düzeyinin benzer olduğu saptandı. Bu bulgularla TNF- $\alpha$ 'nın omurilik yaralanmasının subakut döneminde artış göstermeye başladığı, bunun da nedeninin ortama gelen inflamatuvar hücre miktarında artıştan kaynaklanabileceği düşünüldü. Yine her bir grubun akut ve subakut dönemine ait biyokimyasal verilerinin ikili karşılaştırması sonuçlarına geri dönüp bakıldığında sadece SHAM-A/ SHAM-S grupları arasında MPO düzeyleri bakımından farklılık olduğu görüldü. Ortalama MPO değerlerinin akut döneme ait grupta daha yüksek olduğu gözlemlendi. Yaralanmanın subakut döneminde ise MPO düzeylerinin belirgin azaldığı saptandı. Buradan yola çıkarak subakut dönemde artış gösteren TNF- $\alpha$  düzeyinin nötrofil ya da makrofaj kökenli olmayacağı; belki kronik dönemde gözlenen lenfosit kökenli inflamatuvar cevaba ikincil olabileceği düşünüldü. Diğer yandan TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin akut döneme ait metilprednizolon verilen grupta daha yüksek olduğu ancak diğer gruplar için bu sitokin değerinin çok değişmediği düşünüldü. Oysa literatürde yapılan bir çalışmada metilprednizolonun yaralanmanın geç döneminde nöral rejenerasyona zemin hazırlayıcı etkilerinin olduğu ileri



sürülmektedir (30). Nitekim bizim çalışmamızda TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin omurilik yaralanmasının akut dönemine ait metilprednizolon verilen grupta artmış olması ve subakut dönemde azalma göstermesi literatürle uyumsuz görünse de metilprednizolonun yukarıda belirtilen nöral rejenerasyona zemin hazırlayıcı özelliğini TGF-1 $\beta$  sitokini üzerinden oluşturabileceğini destekler niteliktedir.

#### **5.4. Çalışmanın limitasyonları**

Bu deneysel çalışmanın birkaç yönden kısıtlılıkları vardır:

- Bu çalışmada elde edilen dokuların immunhistokimyasal ve diğer ileri düzey histopatolojik analizleri (floresan mikroskopi gibi) finansal yetersizlikler nedeni ile yapılamamıştır.
- Yine finansal yetersizlikler nedeni ile ileri düzey biyokimyasal analiz yöntemleri (western blood, TUNEL gibi) kullanılarak bu çalışmanın sonuçları desteklenememiştir.
- Çalışma sonuçları teknik ve finansal yetersizlikler nedeni ile ultrastrüktürel yönden (elektron mikroskopisi) ayrıntılı analize de tabi tutulamamıştır.
- Deneysel süresinin kısalığı ve deneklerin omurilik yaralanması sonrası yaralanmaya ikincil olarak yaşam kalitelerinin düşük olması nedeni ile deneyin uygulandığı hayvanlara ötenazi öncesi motor aktiviteyi değerlendirmeye yönelik testler uygulanmamıştır.
- Deneysel omurilikte oluşturulan yaralanmanın morfolojik düzeyini ve etken meddelerin uygulanması sonrası olası rejenerasyonu/ morfolojik

düzelmeyi göstermeye yönelik radyolojik görüntüleme yöntemleri kullanılmamıştır.

## **6. SONUÇLAR**

### **Akut döneme ait inceleme sonuçları**

1. Histopatolojik evreleme değerleri yönünden gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuçlarla her iki ilacın hem tek başına ve hem de birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde akut dönemde histopatolojik iyileşmeye katkısının olmadığı düşünüldü.
2. Biyokimyasal analiz sonuçları incelendiğinde MDA düzeyleri bakımından SHAM grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bu sonuçlarla her iki ilacın hem tek başına ve hem de birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde akut dönemde lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltıcı etkisinin olmadığı düşünüldü. Diğer yandan metilprednizolon verilen gruba ait caspase-3 ve MPO değerlerinin diğer gruplara göre belirgin yüksek olduğu saptandı. Ancak bu parametreler bakımından SHAM grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olması hem metilprednizolonun, hem parecoxibin hem de bu iki ilacın birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde ikincil yaralanmayı azaltmada, inflamatuvar süreci baskılamada ve apoptozu engellemede başarılı olamadığı sonucuna ulaştırdı.
3. PCR gen analizi sonuçlarına bakıldığında ise TNF- $\alpha$  gen ekspresyonunun gruplar arasında farklı olmadığı ancak metilprednizolon verilen grupta TGF- $1\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin diğer gruplara göre artmış olduğu saptandı.

Ancak bu parametreler bakımından SHAM grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olması hem metilprednizolonun, hem parecoxibin hem de bu iki ilacın birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde akut dönemde bu sitokinlerin üzerinde etkilerinin olmadığını düşündürdü.

### **Subakut döneme ait inceleme sonuçları**

1. Histopatolojik evreleme değerleri yönünden gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Bu sonuçlarla her iki ilacın hem tek başına ve hem de birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde subakut dönemde histopatolojik iyileşmeye katkısının olmadığı düşünüldü.
2. Biyokimyasal analiz sonuçları incelendiğinde MDA, caspase-3 ve MPO düzeyleri bakımından SHAM grubu ile diğer gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bu sonuçlarla her iki ilacın hem tek başına ve hem de birlikte kullanımının omurilik yaralanması modelinde akut dönemde lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltmada, ikincil yaralanmayı baskılamada, inflamatuvar süreci yavaşlatmada ve apoptozu engellemede başarılı olamadığı sonucuna ulaşıldı.
3. PCR gen analizi sonuçlarına bakıldığında subakut döneme ait grupların ikili karşılaştırmasında SHAM-S grubu ile diğer tüm grupların TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçları arasında belirgin istatistiksel farklılık saptandı. Diğer yandan SHAM-S grubu dışındaki diğer grupların TNF- $\alpha$  gen ekspresyon sonuçları arasında farklılık gözlenmedi. Bu bulgularla parecoxib ve metilprednizolonun omurilik yaralanmasının subakut döneminde TNF- $\alpha$  gen

ekspresyonunu belirgin düzeyde azalttığı sonucuna varıldı. TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon sonuçları bakımından ise gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık olmadığı saptandı.

### **Her bir grubun akut ve subakut döneme ait verilerinin ikili karşılaştırması**

1. Metilprednizolon ve parecoxib birlikte kullanımı sonrası subakut dönemde deneklerin histopatolojik evre puanlarının akut dönem grubunun puanlarına göre belirgin düzeyde azaldığı tespit edildi.
2. Ortalama MPO değerlerine bakıldığında akut döneme ait SHAM grubunun MPO düzeyinin subakut dönemdeki SHAM grubu değerlerine göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Bu sonuçlarla da MPO düzeylerinin yaralanmanın subakut döneminde belirgin azaldığı ancak çalışmada incelenen farmakolojik ajanların MPO düzeyleri üzerinde yaralanmanın her iki döneminde de belirgin değiştirici etki oluşturamadığı düşünüldü.
3. Subakut döneme ait SHAM grubunun TNF- $\alpha$  düzeylerinin akut dönem SHAM grubunun düzeylerinden daha yüksek olduğu, diğer gruplarda ise bu sitokin düzeyinin benzer olduğu saptandı. Bu bulgularla TNF- $\alpha$ 'nın omurilik yaralanmasının subakut döneminde artış göstermeye başladığı, bunun da nedeninin ortama gelen inflamatuvar hücre miktarında artıştan kaynaklanabileceği düşünüldü.
4. Akut döneme ait metilprednizolon verilen grupta TGF-1 $\beta$  gen ekspresyon düzeylerinin subakut dönem metilprednizolon grubuna göre belirgin artmış olduğu tespit edildi. Buradan yola çıkarak metilprednizolonun TGF-1 $\beta$

sitokini üzerinden nöral rejenerasyona zemin hazırlayıcı özelliğinin olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak ratlarda oluşturulan omurilik yaralanması modelinde her iki ilacın tek başına veya diğeri ile kombine kullanımında tedavi edici etkilerinin olmadığı düşünüldü.



## KAYNAKÇA

1. Adachi K, Yimin Y, Satake K, Matsuyama Y, Ishiguro N, Sawada M, Hirata Y, Kiuchi K. Localization of cyclooxygenase-2 induced following traumatic spinal cord injury. *Neurosci Res* 2005; 51: 73-80.
2. Amar AP, Levy ML. Pathogenesis and pharmacological strategies for mitigating secondary damage in acute spinal cord injury. *Neurosurgery*. 1999; 44: 1027-1040.
3. Armstrong D, al-Awadi F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 433-436.
4. Bao F, Chen Y, Dekaban GA, Weaver LC. An anti-CD11d integrin antibody reduces cyclooxygenase-2 expression and protein and DNA oxidation after spinal cord injury in rats. *J Neurochem* 2004; 90: 1194-1204.
5. Bayly CI, Black WC, Leger S, Ouimet N, Ouellet M, Percival MD. Structure-based design of cox-2 selectivity into flurbiprofen. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters* 1999; 9: 307-12.
6. Black P, Markowitz RS, Cooper V, Mechanic A, Kushner H, Damjanov I. Models of spinal cord injury: Part 1. Static load technique. *Neurosurgery* 1986; 19: 752-762.
7. Blight AR, Zimber MP. Acute spinal cord injury: pharmacotherapy and drug development perspectives. *Curr Opin Investig Drugs* 2001; 2: 801-808.
8. Blight AR, Young W. Central axons in injured cat spinal cord recover electrophysiological function following remyelination by schwann cells. *J Neurol Sci* 1989; 91: 15-34.

9. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, Fehlings M, Herr DL, Hitchon PW, Marshall LF, Nockels RP, Pascale V, Perot PL Jr, Piepmeier J, Sonntag VK, Wagner F, Wilberger JE, Winn HR, Young W. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury. Results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. National Acute Spinal Cord Injury Study. JAMA 1997; 277: 1597-1604.
10. Buss A, Pech K, Kakulas BA, Martin D, Schoenen J, Noth J, Brook GA. TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 2 expression after traumatic human spinal cord injury. Spinal Cord 2008; 46: 364-371
11. Christie SD, Comeau B, Myers T, Sadi D, Purdy M, Mendez I. Duration of lipid peroxidation after acute spinal cord injury in rats and the effect of methylprednisolone. Neurosurg Focus 2008; 25: E5.
12. Çavdar S. Omurga ve Omurilik Anatomisi ve Embriyolojisi. Zileli M, Özer AF. Omurilik ve Omurga Cerrahisi. İzmir, Meta Basım 2.baskı 2002; 15-17.
13. Dannhardt G, Laufer S. Structural Approaches to Explain the Selectivity of COX-2 Inhibitors: Is There a Common Pharmacophore? Current Medicinal Chemistry 2000; 7: 1101-1112
14. Dincel GC, Atmaca HT. Nitric oxide production increases during Toxoplasma gondii encephalitis in mice. Exp Parasitol 2015; 156: 104–112.
15. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. Exp Neurol. 2008; 209: 378-388.

16. Eck JC, Nachtigall D, Humphreys SC, Hodges SD. Questionnaire survey of spine surgeons on the use of methylprednisolone for acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31: E250-E253.
17. Gerndt SJ, Rodriguez JL, Pawlik JW, Taheri PA, Wahl WL, Micheals AJ, Papadopoulos SM. Consequences of high-dose steroid therapy for acute spinal cord injury. *J Trauma* 1997; 42:279-284.
18. Gray's Anatomy of the Human Body-Find-in depth information on the anatomy and physiology of the human body a yahoo education. Philadelphia, Lea&Febiger,1918, Newyork Bartleby.com.2000
19. Hagg T, Oudega M. Degenerative and spontaneous regenerative processes after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2006; 23(3-4): 264-280.
20. Herman BD, Sinclair BD, Milton N, Nail SL. The effect of bulking agent on the solid-state stability of freeze-dried methylprednisolone sodium succinate. *Pharm Res* 1994; 11: 1467-1473.
21. Hoffmann C. COX-2 in brain and spinal cord-implications for therepeutic use. *Current Medicinal Chemistry* 2000; 7: 1113-1120.
22. Honghai X, Peng, Mengting, Cong L, Zhengming S, Xiong G, Yuelin Z. CCN2 and CCN5 exerts opposing effect on fibroblast proliferation and transdifferentiation induced by TGF-b. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2015; 42: 1207-1219.
23. Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanmaları sonrası nöral korunma stratejileri. Zileli M, Özer AF. *Omurilik ve Omurga Cerrahisi*. İzmir, Meta Basım 2.baskı 2002; 813



24. Karacan I, Koyuncu H, Pekel O, Sümbüloğlu G, Kirnap M, Dursun H, Kalkan A, Cengiz A, Yalınkılıç A, Unalan HI, Nas K, Orkun S, Tekeoğlu I. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord*. 2000; 38: 697-701.
25. Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Ankara, Hacettepe-Taş Yayınları, 2005.
26. Koszdin KL, Shen DD, Bernards CM. Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of Pglycoprotein. *Anesthesiology* 2000; 92: 156-163.
27. Kubota K, Saiwai H, Kumamaru H, Maeda T, Ohkawa Y, Aratani Y, Nagano T, Iwamoto Y, Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012 Jul 15; 37:1363-9.
28. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *Spine J* 2004; 4: 451-464.
29. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
30. Leask A, Abraham DJ. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* 2004; 18: 816-827.
31. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, Dong HX, Wu YJ, Fan GS, Jacquin MF, Hsu CY, Choi DW. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci*. 1997; 17: 5395-5406.

32. Liu WL, Lee YH, Tsai SY, Hsu CY, Sun YY, Yang LY, Tsai SH, Yang WC. Methylprednisolone inhibits the expression of glial fibrillary acidic protein and chondroitin sulfate proteoglycans in reactivated astrocytes. *Glia*. 2008; 56: 1390-1400.
33. Marketos SG, Skiadas P. *Hippocrates*. *Spine* 1999; 24: 1381-1391.
34. Marnett LJ. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2002; 68-69: 153-164.
35. Matsumoto T, Tamaki T, Kawakami M, Yoshida M, Ando M, Yamada H. Early complications of high-dose methylprednisolone sodium succinate treatment in the follow-up of acute cervical spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001; 26: 426-430.
36. Merola A, O'Brien MF, Castro BA, Smith DA, Eule JM, Lowe TG ve diğ erleri. Histologic characterization of acute spinal cord injury treated with intravenous methylprednisolone. *J Orthop Trauma* 2002; 16: 155-161.
37. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 10902-10908.
38. NSCISC. *Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance*. University of Alabama: National Spinal Cord Injury Statistical Center. 2012.
39. Parecoxib Sodium, NDA 21-294, Medical Officer Review. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4090B1\\_28\\_CC-FDA-Tab-Q.htm](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/05/briefing/2005-4090B1_28_CC-FDA-Tab-Q.htm)
40. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999; 6: 99-104.

41. Poynton AR, O'Farrell DA, Shannon F, Murray P, McManus F, Walsh MG. An evaluation of the factors affecting neurological recovery following spinal cord injury. *Injury* 1997; 28: 545-548.
42. Resnick DK, Nguyen P, Cechvala CF. Selective cyclooxygenase 2 inhibition lowers spinal cord prostaglandin concentrations after injury. *Spine J.* 2001; 1: 437-441.
43. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol.* 1978; 10: 38-43.
44. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine* 2001; 26(24 Suppl): S2-12.
45. Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases) -1 and -2, *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 33157-33160.
46. Sonntag VKH. History of degenerative and traumatic disease of the spine. Greenblat SH. In a history of neurosurgery. American Association of Neurological Surgeons, 1997, 355-357.
47. Tatlı M, Güzel A, Ökten AI, Çaylı S. Omurilik yaralanmalarının medikal tedavisi. *Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 27: 165-172.
48. Tator CH. Review of treatment trials in human spinal cord injury: Issues, difficulties, and recommendations. *Neurosurgery* 2006; 59: 957-982.
49. Tsutsumi S, Ueta T, Shiba K, Yamamoto S, Takagishi K: Effects of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study of high-dose

- methylprednisolone therapy on acute cervical spinal cord injury-results in spinal injuries center. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; 31: 2992-2997.
50. Tugcu I, Tok F, Yilmaz B, Goktepe AS, Alaca R, Yazicioglu K, Mohur H. Epidemiologic data of the patients with spinal cord injury: Seven years' experience of a single center. *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi-Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, 2011; 17: 533-538.
51. van der Veen BS, de Winther MP, Heeringa P. Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 2899-2937.
52. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenase-1 and -2. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1998; 38: 97-120.
53. Vanegas H, Schaible H. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Progress in Neurobiology* 2001; 64: 327-363
54. Xarchas K, Bourandas J. Injuries and disease of the Spine in ancient times. *Spine* 2003; 8: 1481-1484
55. Xu GY, Liu S, Hughes MG, McAdooa DJ. Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 2008; 153: 1034-1047.
56. Yang L, Blumbergs PC, Jones NR. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in human traumatic spinal cord injury. *Spine* 2004; 29: 966-967
57. Young W. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord injury. *J Emerg Med*. 1993; 11(Suppl 1): 13-22.