

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ (VET) ANABİLİM DALI



**DENEYSEL SPİNAL KORD HASARINDA HESPERİDİN'İN
NÖROPROTEKTİF VE TERAPÖTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ
ZİYA YURTAL

Danışman

Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

HATAY – 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ (VET) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SPİNAL KORD HASARINDA HESPERİDİN'İN
NÖROPROTEKTİF VE TERAPÖTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

ZİYA YURTAL

Danışman

Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi tarafından 16522 nolu proje ile desteklenmiştir.

HATAY – 2018

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
CERRAHİ (VET) ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SPİNAL KORD HASARINDA HESPERİDİN'İN
NÖROPROTEKTİF VE TERAPÖTİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Ziya YURTAL

Bu tez, aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 06.07.2018 tarihinde sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Prof. Dr. Emine ÜNSALDI.....
Üye: Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ.....
Üye: Prof. Dr. Ramazan GÖNENCİ.....
Üye: Prof. Dr. İbrahim CANPOLAT.....
Üye: Prof. Dr. Fahrettin ALKAN.....
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Cafer Tayer İŞLER.....
Üye: Dr. Öğr. Üyesi Ahmet UYAR.....

Bu tez, Enstitümüz Cerrahi (Vet) Anabilim dalında hazırlanmıştır.

31.07.2018
Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması, şekillendirilmesi, uygulanması ve tamamlanması sürecindeki katkılarından dolayı danışmanım Sayın Prof. Dr. Muhammed Enes ALTUĞ'a, bu süreçte ortak doktora programı çerçevesinde başta 2. danışmanım Sayın Prof. Dr. Emine ÜNSALDI olmak üzere tüm Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine, biyokimyasal analizlerde katkı sağlayan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Altuğ KÜÇÜKGÜL'e, desteklerini ve bilimsel çalışmalarda bizlere yapmış oldukları katkıları ve paylaşımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ramazan GÖNENCİ'ye ve Dr. Öğr. Üyesi Cafer Tayer İŞLER'e; doktora sürecinde verdiği teknik desteklerden dolayı işlerimizi kolaylaştıran ılımlı yaklaşımlarıyla bizi bir arada tutan değerli mesai arkadaşım Arş. Gör. Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ'ye; değerli meslektaşlarım ve mesai arkadaşlarım Arş. Gör. İbrahim ALAKUŞ, Arş. Gör. Ömer KIRGIZ, Vet. Hek. Halil ALAKUŞ ve Vet Hek. Sara Büşra Emiroğlu'na, tez çalışmamı ciddiyetle takip eden Tez İzleme Komitesi üyesi Sayın Prof. Dr. Şule Yurdagül ÖZSOY'a, histopatolojik incelemeleri yapan Sayın Dr. Öğr. Üyesi İlke Evrim SEÇİNTİ'ye bu süreçte katkılarını esirgemeyen Patoloji Teknisyeni Işıl KÜNEFECİ'ye, birlikte çalıştığımız değerli öğrencilerim ve yardımcı personellere çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren canım anne ve babama, doktora eğitimim süresince hep yanımda olan ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Saliha Köse YURTAL'a ve biricik kızım Ela YURTAL'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR	X
ÖZET	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Nöroşirurji Tarihçesi.....	7
2.2. Spinal Kordun Nöroanatomisi	8
2.2.1. Omuriliğin Koruyucu Yapıları	8
2.2.2. Şekli ve Yeri	8
2.2.3. Yapısı.....	9
2.2.4. Gri Cevher	10
2.2.5. Beyaz Cevher.....	11
2.2.6. Nöroglia	12
2.2.7. Medulla Spinalis'in Kan Damarları.....	13
2.2.8. Spinal Meninksler.....	15
2.3. Omurilik Yaralanmalarında Görüntüleme	16
2.4. Omurilik Yaralanmalarında Hasar Mekanizmaları	16
2.4.1. Primer Hasar Mekanizmaları.....	17
2.4.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları.....	17
2.4.2.1. Sistemik Değişiklikler	19
2.4.2.2. Vasküler Değişiklikler.....	20
2.4.2.3. Biyokimyasal Değişiklikler.....	21

2.4.2.4. Metabolik Değişiklikler.....	22
2.4.2.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu.....	22
2.4.2.6. Omurilik İletiminin Kesintiye Uğraması.....	23
2.4.2.7. Ödem.....	23
2.4.2.8. Apoptoz.....	23
2.4.2.9. Postravmatik İnflamatuar ve İmmünolojik Yanıt.....	25
2.4.3. Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Parametreler.....	27
2.4.3.1. Kaspaz-3.....	27
2.4.3.2. GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein).....	27
2.4.3.3. TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör-alfa).....	28
2.4.3.4. İL-1 β (İnterlökin 1-beta).....	29
2.4.3.5. TAS/TOS (Total Antioksidan Seviye/Total Oksidan Seviye).....	29
2.5. Spinal Kord Hasarının Patolojisi.....	30
2.5.1. Makroskopik Görünüm.....	30
2.5.2. Mikroskopik Görünüm.....	31
2.5.2.1. Akut Faz Patolojisi.....	31
2.5.2.2. Subakut Faz Patolojisi.....	32
2.5.2.3. Kronik Faz Patolojisi.....	33
2.6. Spinal Kord Yaralanmasında Modern Farmakolojik Ve Terapötik Yaklaşımlar.....	34
2.7. Hesperidin.....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1. Gruplar.....	46
3.2. Anestezi.....	47
3.3. Cerrahi İşlem.....	47
3.4. Omurilik Travmasının Oluşturulması.....	51
3.5. Hesperidinin Hazırlanışı.....	53
3.6. İlaç Uygulanması.....	53
3.7. Antibiyoterapi ve Postoperatif bakım.....	55

3.8.	Nörolojik Muayene Sonuçlarının Değerlendirilmesi	57
3.9.	Histopatolojik Değerlendirme	58
3.9.1.	Rutin Histopatolojik Değerlendirme	58
3.10.	İmmünohistokimyasal Analiz	59
3.10.1.	Kaspaz 3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	61
3.10.2.	GFAP (Anti-gliyal fibriler asidik protein) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi	62
3.11.	Biyokimyasal Analizler	62
3.12.	Bradford Yöntemi ile Protein Tayini	62
3.13.	Total Antioksidan (TAS) Analizi	63
3.14.	Total Oksidan (TOS) Kapasite	63
3.15.	Protein Düzeyleri Analizleri	64
3.15.1.	İL-1 β Düzeyinin Ölçülmesi	64
3.15.2.	TNF- α Düzeyinin Ölçülmesi	64
3.16.	Verilerin Değerlendirilmesi	65
4.	BULGULAR	66
4.1.	Rat ağırlıkları	66
4.2.	Nörolojik muayene bulguları	66
4.2.1.	Modifiye Tarlov Skalası sonuçları	67
4.2.2.	Eğik zemin testi sonuçları	68
4.2.3.	Parmak açma testi sonuçları	69
4.3.	Biyokimyasal bulgular	70
4.4.	Histopatolojik bulgular	72
4.5.	İmmünohistokimyasal Bulgular	83
4.5.1.	Kaspaz 3'ün İmmünohistokimyasal Bulguları	83
4.5.2.	GFAP İmmünohistokimyasal bulguları	89
5.	TARTIŞMA	96
6.	SONUÇ	112
7.	KAYNAKLAR	114
	ÖZGEÇMİŞ	121

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Türkiye’de görülen travmatik omurilik yaralanmasının etiyolojik nedenlere göre oranları	3
Şekil 2.2.3.1. Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü	10
Şekil 2.2.5.1. Medulla spinalis’in transvers kesit görünümü.....	12
Şekil 2.2.6.1. Sinir sisteminde bulunan nöroglia görünümü.....	13
Şekil 2.2.7.1. Medulla spinalis’in arterleri.....	14
Şekil 2.2.7.2. Medulla spinasli’in venleri	15
Şekil 2.2.8.1. Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı	15
Şekil 2.4.2.9.1. Omurilik hasar mekanizması	26
Şekil 2.5.2.3.1. Spinal kord hasarı sonrası şekillenen fazlar	34
Şekil 2.7.1. Hesperidin’in formülasyonu	43
Şekil 2.7.2. Hesperidin’in yapısı.....	44
Şekil 3.3.1. Sırt bölgesinin povidon iyot ile antisepsisinin sağlanması.....	48
Şekil 3.3.2. Cerrahi alanın steril serviyet ile sınırlandırılması.....	49
Şekil 3.3.3. İnterskapular mesafenin belirlenmesi	50
Şekil 3.3.4. Dorsal laminektomi ile spinal kordun açığa çıkarılması	50
Şekil 3.4.1. Spinal kordun üzerine ağırlık düşürme.....	51
Şekil 3.4.2. 10 gr ağırlığında metal çubuk	52
Şekil 3.4.3. Cerrahi alanın dikişlerle kapatılması	52
Şekil 3.5.1. Hesperidin'in hassas terazide tartılması.....	53
Şekil 3.6.1. Ratlara oral gavaj yoluyla hesperidin içirilmesi	54
Şekil 3.6.2. Hesperidin ticari preperatı	55
Şekil 3.7.1. Ratların idrar keselerinin manuel olarak boşaltılması	56
Şekil 3.7.2. Postoperatif şekillenen hematüri	56
Şekil 3.8.1. Eğik zemin testi uygulaması.....	57
Şekil 4.4.1. A-B: Kontrol (Grup 1) grubunda medulla spinalisin normal histolojik yapısının korunduğu izlendi. (Ok işareti: nissle cisimlerinin görüldüğü nöron).....	73
Şekil 4.4.2. A: Kontrol (Grup 2) grubunda medulla spinalisin normal histolojik yapısının korunduğu izlendi (HEX40) B: Nükleusu ve nissle cisimcikleri seçilen nöron (Ok işareti) HEX400.....	73
Şekil 4.4.3. A: Sham (Grup 3) grubunda belirgin laserasyon, kanama ve hemorajik nekroz (Yıldız ile işaretli) izlendi (HEX40). B: Ödem, aksonal dejenerasyon, vakuolizasyon ve sferüller görüldü (Ok ile işaretli) (HEX200).....	74
Şekil 4.4.4. A. Sham (Grup 4) grubunda özellikle episantral lokalizasyonda belirgin nekroz (yıldız ile işaretli), aksonal dejenerasyon ve ödem görülmekte HEX40. B. Sham B grubunda nekroz ve yoğun makrofaj infiltrasyonu (Ok ile işaretli) görülmekte HEX200.....	75
Şekil 4.4.5. A: Ön koşullama (Grup 5) grubunda ödem, laserasyon, hemorajik nekroz daha hafif olarak görüldü (Yıldız ile işaretli) HEX40. B: Hafif nöronal ve aksonal dejenerasyon (Uzun ok işareti gri cevher nöronları, kısa ok beyaz cevher) HEX200	76
Şekil 4.4.6. A. Ön koşullama (Grup 6) grubu nekroz ve makrofaj infiltrasyonu orta	

şiddette (Yıldız ile işaretli alan) HEx40. B. Aksonal dejenerasyon ve hemosiderin yüklü makrofajlar izlendi (Ok ile işaretli) HEx200.	78
Şekil 4.4.7. Tedavi (Grup 7) grubu: A: ödem, laserasyon, hemorajik nekroz daha hafif olarak görüldü (Yıldız ile işaretli) HEX40. B: Aksonal dejenerasyon ve sferül oluşumu hafif düzeyde HEX200.....	80
Şekil 4.4.8. A. Tedavi (Grup 8) grubunda hasar bulguları hafifti HEX40. B. Hemosiderin yüklü makrofajlar ok işaretli. HEX200.	82
Şekil 4.5.1.1. Kontrol (Grup 1) grubu. Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyamasında nükleusları kahverenkli işaretlenen hücreler apoptotik hücrelerdir. Kaspaz 3 x400	84
Şekil 4.5.1.2. Kontrol (Grup 2) grubu, Kaspaz 3 ile nükleer boyanan az sayıda apoptotik hücre görülmekte. Kaspaz 3 x400.	85
Şekil 4.5.1.3. Sham (Grup 3) grubu, belirgin derecede artmış apoptozis. Kaspaz 3 x400.	85
Şekil 4.5.1.4. Ön Koşullama (Grup 5) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.....	86
Şekil 4.5.1.5. Tedavi (Grup 7) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.....	86
Şekil 4.5.1.6. Sham (Grup 4) grubu, belirgin derecede artmış apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.	87
Şekil 4.5.1.7. Ön Koşullama (Grup 6) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.....	88
Şekil 4.5.1.8. Tedavi (Grup 8) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.....	88
Şekil 4.5.2.1. Kontrol (Grup 1) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrosit görülmemekte. Normal (Ok ile işaretli) morfolojide astrositler izlenmektedir. GFAPX200	90
Şekil 4.5.2.2. Kontrol (Grup 2) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrosit görülmemekte. Normal morfolojide astrositler izlenmektedir. GFAPX200	90
Şekil 4.5.2.3. Sham (Grup 3) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrogliozis görülmekte (ok ile işaretli yıldızlı uzantıları olan astrositler) . GFAPX200	91
Şekil 4.5.2.4. Ön koşullama (Grup 5) grubunda GFAP ile boyanan hafif şiddette reaktif astrogliozis görülmektedir. GFAPX200.....	92
Şekil 4.5.2.5. Tedavi (Grup 7) grubunda GFAP ile boyanan hafif şiddette reaktif astrogliozis görülmektedir. GFAPX200.....	92
Şekil 4.5.2.6. Sham (Grup 4) grubunda GFAP ile boyanan şiddetli astrogliozis görülmektedir. GFAPX200	93
Şekil 4.5.2.7. Ön koşullama (Grup 6) grubunda hafif şiddette astrogliozis alanı. GFAPX200.....	94
Şekil 4.5.2.8. Tedavi (Grup 8) grubunda GFAP ile boyanan orta şiddette reaktif astrogliozis görülmekte (ok ile işaretli yıldızlı uzantıları olan astrositler) .GFAPX200.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ülkelere göre travmatik omurilik yaralanmasının etiyolojik nedenleri.....	2
Çizelge 3.5.1. Pratik doz hesaplama çizelges	53
Çizelge 3.8.1 Modifiye Tarlov Skalası	58
Çizelge 4.1.1 Ratların vücut ağırlık ortalamaları.....	66
Çizelge 4.2.1.1 Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Modifiye Tarlov Testi Üzerindeki Etkileri	67
Çizelge 4.2.2.1 Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Eğik Zemin Testi Üzerindeki Etkileri	68
Çizelge 4.2.3.1 Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Parmak Açma Testi Üzerindeki Etkileri	69
Çizelge 4.3.1 Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in İL-1 β ve TNF- α düzeyleri üzerindeki etkileri.....	70
Çizelge 4.3.2 Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in TAS ve TOS düzeyleri üzerindeki etkileri.....	71
Çizelge 4.4.1 Histopatolojik bulgulardaki verilerin istatistikleri.....	72
Çizelge 4.5.1.1 Kaspaz 3'ün istatistiki verileri.....	83
Çizelge 4.5.2.1 GFAP değerlerinin istatistiki verileri	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

AEC	:3- amino-9-ethyl karbazol
ASK	:Apoptoz sinyal düzenleyici kinaz
BBB	:Basso, Beattie ve Bresnahan
BOS	:Beyin omurilik sıvısı
CAT	:Katalaz
COX	:Siklooksijenaz
CP	:Sisplatin
CSF	:Koloni stimulan faktörlerin
DNA	:Deoksiribo Nükleik Asit
EAE	:Otoimmün ensefalomyelit
EMG	:Elektromiyografik
EPO	:Eritropoetin
ESC	:Embriyonik kök hücre
GABA	:Gamma-aminobutirik asit
GFAP	:Glial Fibriler Asidik Protein
GPx	:Glutatyon peroksidaz
GR	:Glutatyon redüktaz
GSH	:Glutatyon
HE	:Hematoksilen-Eozin
HES	:Hesperidin
HRP	:Horseradish peroxidase
I/R	:İskemi-reperfüzyon
İL-1 β	:İnterlökin 1-beta
iPSC	:Türetilen uyarılmış pluripotent kök hücrelere
KBB	:Kan-beyin bariyeri
MCAO	:Orta serebral arter oklüzyonu
M-CSF	:Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MDA	:Malondialdehit
MPSS	:Metilprednizolon sodyum süksinat
MS	:Multiple sklerozis
MSC	:Mezenkimal kök hücre
MTS	:Modifiye Tarlov Skalası
NADH	:Nikotinamid adenin dinükleotit
NK	:Naturel Killer
NMDA	:N-metil-D-aspartat
NPC	:Nöral prekürsör hücre
PBS	:Fosfat buffered solüsyonu

PMNL	:Polimorf nötrofil lökositleri
PO	:Peros-oral
PUFA	:Çoklu doymamış yağ asidi
ROM	:Reaktif oksijen metabolitleri
ROS	:Reaktif oksijen türleri
SH	:Sham
SOD	:Süperoksit dismutaz
SR	:Serbest radikal
TAS	:Total Antioksidan Seviye
TGF- β	:Transforming büyüme faktörü- β
TM	:Tirilazad mesilat
TMB	:Tetramethylbenzidine
TNFR	:Tümör Nekrozis Faktör Resetörü
TNF- α	:Tümör Nekrozis Faktör-alfa
TOS	:Total Oksidan Seviye
TRH	:Tirotropin Salıcı Hormon
TSH	:Tirotropin salıcı hormon
UV	:Ultraviole

ÖZET

DeneySEL Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Nöroprotektif ve Terapötik Etkisinin Araştırılması

Bu çalışmada, travmatik spinal kord yaralanması sonrası ortaya çıkacak sekonder hasara karşı hesperidinin nöroprotektif ve terapötik etkinliğinin ortaya konması amaçlandı.

Çalışmada, 250-300 g ağırlığında 64 adet Wistar albino erkek rat rastgele 8 gruba ayrıldı (n:8). Çalışma ön koşullu bir çalışma idi. Gruplar; Grup I ve II; kontrol grubu, Grup III ve IV; sham grubu, Grup V ve VI; ön koşullama grubu, Grup VII ve VIII ise Tedavi grubu olarak belirlendi. Ön koşullama gruplarına travma öncesi 7 gün 200 mg/kg/gün hesperidin içirildi, grup V travma sonrası 1. günde sakrifiye edilirken grup VI travma sonrası 200 mg/kg/gün oral hesperidin devam edilerek 7. günde sakrifiye edildi. Travma (Tedavi) gruplarından grup VII'ye travma sonrası 200 mg/kg/gün hesperidin içirildi ve 1. günde sakrifiye edildi. Grup VIII'e ise travma sonrası 7 gün 200 mg/kg/gün hesperidin içirilerek 7. günde sakrifiye edildi. Bütün ratlarda kan ve doku örnekleri alınarak histopatolojik, biyokimyasal ve immunohistokimyasal olarak hesperidinin etkinliği değerlendirildi. Ratlarda T7-T10 dorsal laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kord üzerine ağırlık düşürme metodu ile (100g/cm) spinal kord hasarı oluşturuldu. Nörolojik muayenede; eğik zemin testi, Modifiye Tarlov Skalası ve parmak açma testi kullanıldı.

Hesperidin ile yapılan birçok çalışma olmasına rağmen, spinal kord travması sonrası ortaya çıkan sekonder hasara karşı etkinliği ilk defa bu çalışmada değerlendirilmiştir. Hesperidinin, nörolojik muayene testlerinde özellikle subakut dönemde fayda sağladığı belirlendi. Hesperidin, biyokimyasal olarak Grup V ve VII' de 1. günde İL-1 β ve TNF- α düzeylerini azaltarak, TAS düzeylerini ise arttırarak etki göstermiştir. Histopatolojik olarak Grup V ve VII'de hemoraji, laserasyon, aksonal ve nöronal dejenerasyon, nekroz, inflamatuvar reaksiyon ve ödemi azaltmıştır. İmmunohistokimyasal olarak Grup V, VI, VII ve VIII'de kaspaz 3 ile boyalı apoptotik hücre sayısını azaltmıştır. Grup V, VI, VII ve VIII'de GFAP ile boyanan reaktif hücre sayısını azaltmıştır. Sonuç olarak; hesperidinin spinal kord hasarı sonrası akut dönemde antioksidan ve antiinflamatuvar etkisi ortaya konarak nöroprotektif ve terapötik etkinliği olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Hesperidin, Spinal kord hasarı, Rat

ABSTRACT

Investigation of Neuroprotective and Therapeutic Effect of Hesperidin in Experimental Spinal Cord Injury

In this study, it was aimed to reveal the neuroprotective and therapeutic efficiency of hesperidin against a secondary injury which occurs after traumatic spinal cord injury.

In the study, 64 Wistar albino male rats 250-300 g in weight, divided randomly into 8 groups (n:8). The study was a prerequisite study. Groups were as; Groups I and II; control groups, Groups III and IV; sham groups, Groups V and VI prerequisite groups; Group VII and VIII were designed as the treatment group. Prerequisite groups were given 200 mg/kg/day of hesperidin for 7 days before the trauma. Group V was sacrificed on the first post-traumatic day, whereas group VI was continued 200 mg/kg/day oral hesperidin and sacrificed on the 7th day after trauma. Trauma (Treatment) groups received 200 mg/kg/day of hesperidin after trauma to group VII and were sacrificed on 1st day. Group VIII was given 200 mg/kg/day hesperidin 7 days after trauma and sacrificed on 7th day. Histopathological, biochemical and immunohistochemical evaluation of the efficacy of hesperidin were made for all rats by taking blood and tissue samples. In the rats, spinal cord injury was generated by weight reduction method (100 g/cm) on the spinal cord, which was exposed after T7-T10 dorsal laminectomy. Inclined plane test, Modified Tarlov Scale and finger tap test were used for neurological examination.

Although there have been many studies with hesperidin, it's the efficacy against the secondary damage after spinal cord trauma was evaluated for the first time in this study. Hesperidin has been shown to be beneficial with neurological examination tests, especially in the subacute period. Hesperidin was decreased the levels of IL-1 β and TNF- α and increased TAS levels on day 1 in groups V and VII biochemically. Histopathologically, hemorrhage, laceration, axonal and neuronal degeneration, necrosis, inflammatory reaction and edema were reduced in Group V and VII. Immunohistochemically, it was reduced the number of caspase 3-stained apoptotic cells in Groups V, VI, VII and VIII. In Group V, VI, VII and VIII, the number of reactive cells stained with GFAP was reduced. As a result; hesperidin has been shown to have antioxidant and antiinflammatory effects in the acute phase after spinal cord injury, resulting in neuroprotective and therapeutic efficacy.

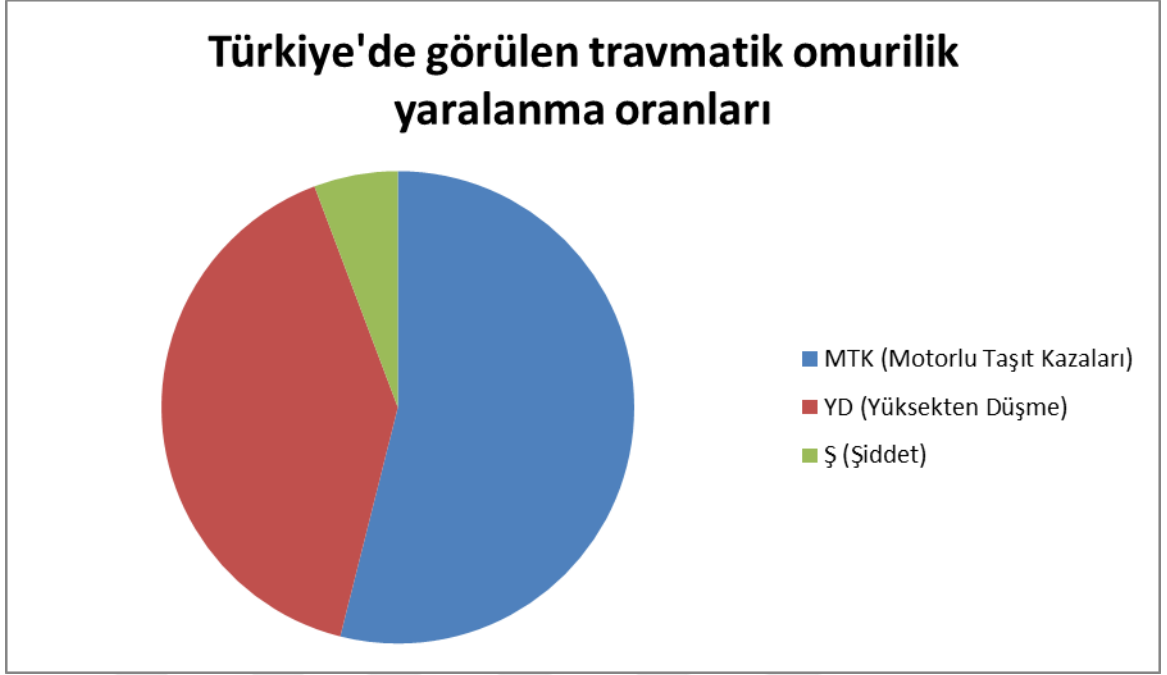
Key words: Hesperidin, Spinal cord injury, Rat

1. GİRİŞ

Spinal kord yaralanmaları çok önemli fiziksel, psikososyal ve ekonomik problemlerdir (Hancı ve ark. 2010, Şahin Kavaklı ve ark. 2011, Cristante ve ark. 2012, İstan ve ark. 2014). Travmatik spinal kord yaralanmasının yıllık görülme sıklığı kabaca milyonda 12.1-57.8 arasında değişiklik gösterir (Kermani ve ark. 2016). Bir başka çalışmada bu oranın milyonda 15-45 arasında olduğu söylenmiştir (Aydin ve ark. 2016, Kim ve ark. 2017). Hayvanlarda ise geniş kapsamlı epidemiyolojik bir çalışma yapılmamıştır ancak kliniğe başvuran toplam vakalar üzerinden gidildiğinde yaklaşık %2 olduğu tahmin edilmektedir (Can ve Beşaltı 2016). Özbek ve ark. (2015) ülkelere göre travmatik omurilik yaralanmasının etiyolojik nedenlerini Çizelge1.1’de özetlemişlerdir. Omurilik yaralanmaları üzerine ilk bildirimler, omurilik yaralanmalarını tedavi edilmemesi gereken bir hastalık olarak tanımlamış ve insanları aşırı karamsarlığa itmiştir (Whiteneck ve ark. 2009). Omurilik yaralanmaları travmatik ve travmatik olmayan olarak iki gruba ayrılır (Can ve Beşaltı 2016). Omurilik yaralanmalarının en yaygın travmatik sebepleri motorlu araç kazaları, düşme yaralanmaları, spor yaralanmaları (Kim ve ark. 2017), ateşli silah yaralanmaları, delici-kesici alet yaralanmaları ve yüksekten düşmelerdir (İstan ve ark. 2014). Travmatik olmayan sebepler ise iskemi, infarktüs ve tümörlerdir (Can ve Beşaltı 2016).

Çizelge 1.1. Ülkelere göre travmatik omurilik yaralanmasının etiyolojik nedenleri (Özbek ve ark. 2015) (MTK: Motorlu taşıt kazaları, YD: Yüksekten düşme, Ş: Şiddet, SY: Spor yaralanmaları)

TRAVMATİK OMURİLİK YARALANMASI: ÜLKELERE GÖRE ETİYOLOJİK NEDENLER				
Ülke	MTK	YD	Ş	SY
İzlanda	%42,5	%30,9	(-)	%18,8
Norveç	%34,2	%45,5	(-)	%8,6
İran	%52	%43	(-)	(-)
İrlanda	%50	%37	(-)	%9
Avusturalya	%43	%21	(-)	(-)
İtalya	%53,8	%22,6	%1,9	%7,9
Kanada	%35	%31	(-)	(-)
Türkiye	%48,8	%36,5	%5,2	(-)
Ürdün	%44,4	%21,2	%31,1	%2,6
Rusya	%25,1	%40,4	%1,6	%32,9
Bangladeş	%18	%63	(-)	(-)
Taiwan	%46	%44,1	%4,1	%1,2
Nijerya	%77,4	(-)	(-)	(-)
Hindistan	%34,78	%44,51	%3,52	(-)
Nepal	%13	%37,9	(-)	(-)
Pakistan	%67,7	%23,4	%5,6	%1,4
Çin	%28,4	%53,6	(-)	(-)



Şekil 1. 1. Türkiye’de görülen travmatik omurilik yaralanmalarının etiyolojik nedenlere göre oranları (Özbek ve ark., 2015)

Spinal kord hasarları tam ve kalıcı nörolojik fonksiyon kayıplarına yol açabilir (Yu ve ark. 2016, Zhang ve ark. 2016). Güncel cerrahi tekniklerin ilerlemesine rağmen spinal kord hasarlı vakalarda iyileşmeler genelde tam olmamaktadır (Hancı ve ark. 2010). Bununla birlikte günümüzde henüz bu karmaşık durumu iyileştirmek için kanıtlanmış terapötik bir ajan yoktur (Gurcan ve ark. 2017).

Akut spinal kord yaralanmasının sistemik etkileri hipotansiyon ve kardiyak verimde azalmaz. Lokal etkileri ise spinal kordun hasarlı segmentindeki otheregölasyon kaybı ve hem gri hem de beyaz cevherdeki özellikle hemorajik bölgelerde mikro dolaşımın azalmasıdır (Tator ve Fehlings. 1991). Travmatik spinal kord hasarı, doku nekrozu ve fonksiyonel bozuklukla sonuçlanan önemli biyokimyasal ve patolojik olaylara zemin hazırlayabilir. Erken biyokimyasal reaksiyonlar membran fosfolipitlerinden yağ asitleri hidrolizi, biyolojik olarak aktif eikosanoidin üretimi ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla lipid peroksidasyonudur. Daha sonrasında ise hücresel hasardan sorumlu ana faktördür (Kermani ve ark. 2016). Spinal kord hasarı primer ve sekonder olarak iki mekanizma ile görülür, primer hasar, mekanik hasarı, sekonder hasar ise travma sonrası oluşan progresif hücre hasarını tanımlar (Şahin

Kavaklı ve ark. 2011, Şirin ve ark. 2012). Primer hasardan sonra spinal kordda hipoksi oluşur, hipoksiyi takiben de elektrolit dengesizliği, nöronal eksitasyon, glutamat salınımı ve enflamasyon gibi reaksiyonlar oluşur (Çelik ve ark. 2015). Spinal kord hasarlarının fizyopatolojik çalışmalarında sekonder hasar gelişiminde, serbest oksijen radikallerinin, lipid peroksidasyonunun ve apoptozisin, diğer bir deyişle programlanmış hücre ölümünün önemli rolü olduğu gösterilmiştir (Hancı ve ark. 2010, Hou ve ark. 2016). Apoptozis; insan, maymun ve ratlarda, spinal kord hasarını takiben doku hasarına sebep olan çok önemli bir komponenttir (Antar 2005). Yine Hou ve ark. (2016) yapmış oldukları bir çalışmada primer hasarı, eksitotoksisite, ödem, inflamasyon, demyelinizasyon ve gliar skarın takip ettiğini bildirmişlerdir (Hou ve ark. 2016).

Günümüzde spinal kord yaralanmalarında kortikosteroidler hala yaygın olarak kullanılmasına rağmen sekonder hasar üzerindeki tedavi etkinliği kesin değildir (Sencer ve ark. 2013), bununla beraber önemli yan etkilerinden dolayı (Kerimoğlu ve ark. 2007, Şirin ve ark. 2012) sekonder hasara karşı nöroprotektif etkileri olan başka ajan arayışına girilmiştir (Hancı ve ark. 2010).

Flavonoidler bitkisel bileşiklerdir ve hidroksil, superoksit, alkoksil, peroksil ve nitrik oksit radikallerini temizler, bakır ve demiri şelatlar, alfa-tokoferol rejenerasyonunu sağlar (Çimen 1999), lipid peroksil zincirini kırar, kalmodulini inhibe eder, laktat transportunu bloke eder ve protein kinaz enzimini durdurur (Kahraman ve ark. 2002). Lipooksijenaz, siklooksijenaz ve fosfolipaz-A enzimlerini inhibe ederek antiinflamatuvar etkinlik gösterir. Ayrıca glutatyon redüktaz, NADH-oksidad (nikotinamid adenin dinükleotit), protein kinaz ve ksantin oksidad gibi bir takım enzimleri inhibe ettikleri de bildirilmiştir (Çimen 1999).

Hesperidin, ilk olarak 1828 yılında Fransız bir kimyacı olan Lebreton tarafından narenciye kabuğunun beyaz iç katmanından izole edilmiştir (Lebreton 1828). Hesperidin (HES), hesperetin 7-rhamnoglucoside olarak da bilinen bir bioflavonoidtir (Banji ve ark. 2014). Kimyasal olarak ise 3, 5, 7-trihidroxyflavanone 7-rhamnoglucoside'tir (Banji ve ark. 2014, Subramanian ve ark. 2015) ve diğer flavonoidler ile karşılaştırıldığında antioksidan özelliği en etkili olanlardan biridir (Kuntic ve ark. 2014, Celik ve ark. 2016). Birer narenciye türü olan limon ve tatlı portakalda bol miktarda bulunur (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Ratlarda yapılan deneylerde flavonoidlerin sadece %20'sinin

gastrointestinal sistemden emildiği gösterilmiştir. Hesperidinin, glikozid halinde veya glikozid bağlarının kırılarak aglikon halde emildiklerine dair bilgiler vardır. Plazmada, içirildikten 2 saat sonra pik düzeye ulaşır ve üriner sistem ile atılır (Çimen 1999). Başka bir çalışmada ise hesperidinin kendisi bağırsaktan bir glikozid olarak bozulmadan absorbe edildiği, aglikon hesperetinin ise, yutulmadan 3 saat sonra plazmada görüldüğü ve 5-7 saat arasında tepe noktasına ulaştığı söylenmiştir (Kuntic ve ark. 2014). Farmakolojik olarak; antikarsinojenik, antihipertansif (Polat ve ark. 2016), immünmodülatör (Polat ve ark. 2016, Rezaeyan ve ark. 2016), antiinflamatuvar, güçlü antioksidan (Banji ve ark. 2014, Polat ve ark. 2016, Carballo-Villalobos ve ark. 2016), antiallerjenik, nöroprotektif, antimikrobiyal, hipolipidemik, vazodilatatör, antihiperkolesterolemik (Subramanian ve ark. 2015), UV ve radyasyondan koruma (Kuntic ve ark. 2014), hepatoprotektif (Banji ve ark. 2014), östrojenik (Çimen 1999), analjezik ve sedatif gibi özellikleri vardır (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Merkezi faaliyetleri ise GABAerjik (gamma-aminobutirik asit), opioidderjik ve seratonerjik reseptörlerle ilişkilendirilmiştir (Carballo-Villalobos ve ark. 2016).

Yapılan çalışmalar sonucunda kalıcı ve etkili bir tedavi protokolü halen oluşturulamamıştır (İstan ve ark. 2014).

Spinal kord hasarlarında yapılan uzun soluklu araştırmaların amacı spinal kord hasarının onarımında klinikte etkili bir strateji geliştirmek içindir. Rat modelleri hem spinal kord hasarlarının temelinde yatan patolojiyi anlamak hem de tedavi stratejilerini değerlendirmek için kullanılan önemli memeli modellerdir (Kjell ve Olson 2016). Ratların spinal kordunda, dorsal yarığın altında piramit şeklinde kortikospinal lifler vardır ve rat omuriliği diğer memeliler ile benzerlik gösterir, toplamda 8 servikal, 13 torasik, 6 lumbal ve 4 sakral segmentten oluşur (Bayraktaroğlu 2012).

Çalışmamızda spinal kord hasarı, T7-T10 dorsal laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kordun üzerine ağırlık düşürme modeli ile oluşturuldu (100g/cm) (Erşahin ve ark. 2011, Şener ve ark. 2014). Bu yöntem ilk olarak köpekte 1911 yılında Allen tarafından bildirilmiştir (Panjabi 1987, Tator 1995) ve başka hayvanlara uyarlanmıştır. Spinal kord hasarı oluşturmak için birçok model oluşturulmuş ancak klinik vakalara en yakın model olması dolayısıyla ağırlık düşürme modeli kabul gören bir metottur (Tator 1995, Şirin ve ark. 2012).

Bu çalışmanın amacı bir flavonoid olan hesperidinin, deneysel oluşturulan spinal kord travması sonrası oluşan sekonder hasarı önlemedeki etkinliğinin klinik, biyokimyasal, immunohistokimyasal ve histopatolojik olarak araştırılmasıdır. Yapılan birçok çalışmada hesperidinin farklı dokularda oluşan mekanik, toksik ve iskemik hasarlarda antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliği ortaya konmuş ancak spinal kord hasarı sonrası etkinliği hakkında henüz bilinen bir çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda deneysel spinal kord hasarında hesperidinin nöroprotektif ve terapötik etkinliği ortaya konulmuştur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöroşirurji Tarihçesi

Omurilik travması çok eskiden beri hastalar ve hasta yakınları için fiziksel bir yıkımın yanında psikososyal etkileri de olan önemli bir problemdir (Dumont ve ark. 2001). Antik çağda mısırlılar (MÖ 3000-1000) kraniyal ve spinal travma bulguları üzerine yoğunlaşmışlar ve solunumun tüm vital fonksiyonları taşıdığına inanmışlardır (Çobanoğlu ve ark. 2002). Edwin Smith Papirüsü (MÖ 1700), 1982 yılında bulunabilmiştir ve beyin ve spinal kord üzerine ilk yazılı tıbbi tez ve bilimsel bir belgedir (Hughes 1988). Tıbbın babası Hipokrat olarak bilinmesine rağmen Mısırlı hekim İmhotep çok daha önce hekimlik üzerine uygulamalar yapmıştır. Hipokrat (MÖ 460-377) anatomi ve patolojiye odaklanarak, tüberküloz, spondilit, travma sonrası kifoz, skolyoz, omurga dislokasyonu ve spinöz proses kırığını bildirmiş ve bununla birlikte gibozite ile spinal tüberküloz arasındaki ilişkiyi ilk defa tanımlamıştır (Naderi ve ark. 2007). Herophilus (MÖ 300) beynin sinir sisteminin merkezi olduğunu söylemiştir (Çobanoğlu ve ark. 2002). Bununla birlikte insan nöroanatomi üzerine çalışmalar yapmış ancak omurga anatomisi üzerine çok çalışmamıştır. Yine de omurilik yaralanmalarının farkında olup omurga üzerindeki cerrahi girişimlerden kaçınılması gerektiğini söylemiştir (Naderi ve ark. 2007). Milattan sonraki dönemlerde Galen (130-200) beyin, duyu ve hareketin merkezidir demiştir (Çobanoğlu ve ark. 2002). Deneysel fizyoloji ve embriyolojinin kurucusu olan Galen, cerrah ve anatomist olarak çalışmıştır. Kas sistemini kompleks bir lokomotif organ olarak tanımlayarak sinir ve kas sistemleri arasındaki fizyolojik ilişkiyi göstermiştir. İbn-i Sina (980-1037) beyin korteksi ile çok ilgilenmeyip ak madde, ventriküller ve subkortikal konneksiyonlar üzerinde durmuştur. Ambroise Pare (1510-1590), kafa içi basınç artışı ve cerrahi tedavisi üzerine çalışmalar yapmıştır. 17. ve 18. yüzyıllarda Rene Descartes (1596-1650), Thomas Willis (1621-1675) ve Albrecht van Haller (1708-1777) beyin üzerine çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Son 200 yılda ise en hızlı gelişmeler yaşanmış olup, hem teknolojinin gelişimi ile cerrahi teknikler artmış hem de görüntülemenin iyileşmesi ile cerrahi girişimlerin sonuçlarındaki başarı artmaya başlamıştır (Çobanoğlu ve ark. 2002).

2.2. Spinal Kordun Nöroanatomisi

Merkezi sinir sisteminin bir parçası olan omurilik, yaklaşık 1 milyon nöron ve daha fazla sayıda nöroglidan oluşur. Omurilik, beynin devamıdır ve birlikte merkezi sinir sistemini oluştururlar (Tortora ve Derrickson 2012).

2.2.1. Omuriliğin Koruyucu Yapıları

Omurilik, iki koruyucu katman ile örtülmüştür, bunlardan birincisi kemik çatıdır (Kahle ve Frotscher 2003). İkinci koruyucu katman ise meninkslerdir. Meninksler, kemik ve sinir doku arasında kalan 3 membran şeklindedir. Diğer bir koruyucu yapı ise beyin omurilik sıvısıdır (BOS). BOS dışarıdan gelen darbelere karşı bir şok emici gibi görev yapan ve sinir dokuyu hidrolik yastık gibi çevreleyen bir sıvıdır (Tortora ve Derrickson 2012).

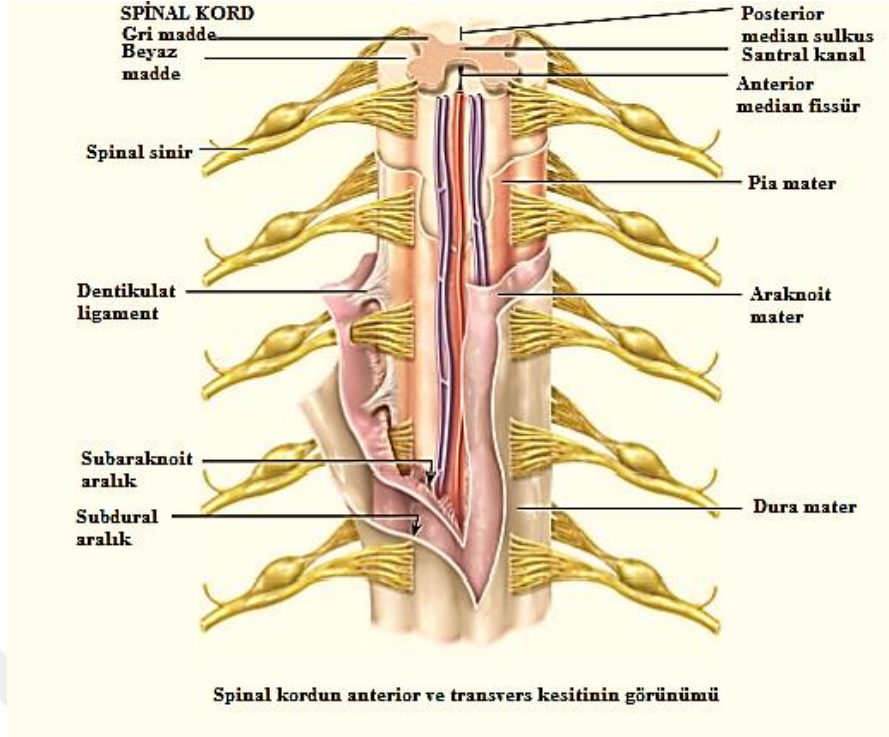
2.2.2. Şekli ve Yeri

Medulla spinalis, beyaz ve gri cevherden oluşan (Önyay ve ark. 2016), beyazımtırak renkli ve hafif dorsoventralden basık silindir şeklinde bir yapıdır (Dursun 2000, Tortora ve Derrickson 2012). Medulla oblongata'nın arkasından başlayıp, sakrumun orta seviyelerine kadar uzanır (Dursun 2000, König ve Liebich 2015). Medulla spinalis, kaudale doğru incelik ve conus medullaris adında bir yapı oluşturur ve filum terminale olarak sonlanır (Dursun 2000, Kahle ve Frotscher 2003, Tortora ve Derrickson 2012, König ve Liebich 2015). Filum terminale ise caudale doğru uzanan bel ve kuyruk sokumu sinir kökleri ile birlikte at kuyruğuna benzer bir görüntü verir ve buna cauda equina denir (Dursun 2000, Kahle ve Frotscher 2003, Tortora ve Derrickson 2012). Extremitelere giden sinirlerin çıktığı iki bölgede kalınlığı artar (Kahle ve Frotscher 2003, Tortora ve Derrickson 2012). İlk kalınlaşma, pars cervicalis'in son kısmı ile pars thoracica'nın ilk kısmı arasında yani 5. servikal ile 2. torakal arasında olan kalınlaşmadır

ki buna *intumescentia cervicalis* denir ve buradan çıkan sinirler *plexus brachialis* olarak ön bacağı ve göğsün ön ve yan duvarlarına gider. Diğer kalınlaşma ise 4. ve 5. lumbal segmentler arasında bulunan ve pelvis boşluğu ve arka bacağı giden sinirlerin çıktığı *intumescentia lumbalis*'tir (Dursun 2000, König ve Liebich 2015).

2.2.3. Yapısı

Medulla spinalis, anteriorda *fissura mediana ventralis* ve posteriorda *sulcus medianus dorsalis* ile eşit iki yarıma ayrılır (Kahle ve Frotscher 2003). *Medulla spinalis*'in dorsolateralinden *radix dorsalis*'i oluşturan sinir lifleri girerken, ventrolateralinden *radix ventralis*'i oluşturan sinir lifleri ayrılır. *Radix ventralis* ve *radix dorsalis*'in lifleri *foramen intervertebrale*'de birleşir ve *n. spinalis*'i oluşturur (Kahle ve Frotscher 2003, König ve Liebich 2015). *Substantia grisea*'nın ortasında nöral tüpün boşluğunu oluşturan kısma *canalis centralis* denir (Dursun 2000). *Canalis centralis*, beyin boşluklarının *medulla spinalis* içinde devam eden kısmıdır. *Canalis centralis* ependim hücreleri ile kaplıdır ve beyin-omurilik sıvısı (BOS) ile doludur. *Medulla spinalis*'in enine kesitinde *canalis centralis*'in çevresinde gri cevher (*substantia grisea*) vardır. Gri cevher, beyaz cevher (*substantia alba*) ile çevrelenmiş şekildedir. *Medulla spinalis*'in tamamı kapillar damar ağı ile beslenir. Bununla birlikte beslenmeye yağ doku içindeki büyük venler de katkı sağlar. Omuriliği travmatik etkilerden korunmasında zarların ve BOS'un önemli rolü vardır (König ve Liebich 2015). Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü Şekil 2. 2. 3. 1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. 3. 1. Spinal kordun önden ve transvers kesitinin görünümü (Tortora ve Derrickson, 2012)

2.2.4. Gri Cevher

Gri cevher, glia hücreleri ile myelinsiz sinir hücre gövde ve uzantılarından oluşur. Enine kesitinde kelebek veya H harfine benzer bir görüntüsü vardır (Dursun 2000, Kahle ve Frotscher 2003, König ve Liebich 2015). Enine yapının alt kısmındaki iki çıkıntıya cornu ventrale, üst kısmındaki iki çıkıntıya cornu dorsale denir (Dursun 2000, Kahle ve Frotscher 2003). Cornu dorsale ve cornu ventrale substance lateralis intermedialis ile birleşir ve thoracolumbar seviyede cornu laterale'yi oluşturur (Kahle ve Frotscher 2003). Gri cevherin, columna dorsalis, columna ventralis ve columna lateralis olarak bilateral sütunları vardır. Bunlar enine kesitlerde cornu olarak görülürler. Columna dorsalis, somatik ve afferent visceral nöronlarla onların hücre gövdelerinden oluşur. Columna lateralis, thoracolumbal bölgede bulunur ve visceromotor nöronları içerir. Sempatik nöron taşıyan nucleus intermediolateralis, substantia intermedia lateralis içindedir. Columna ventralis ise motor sinirlerden oluşur ve motor çekirdekler içerir (König ve

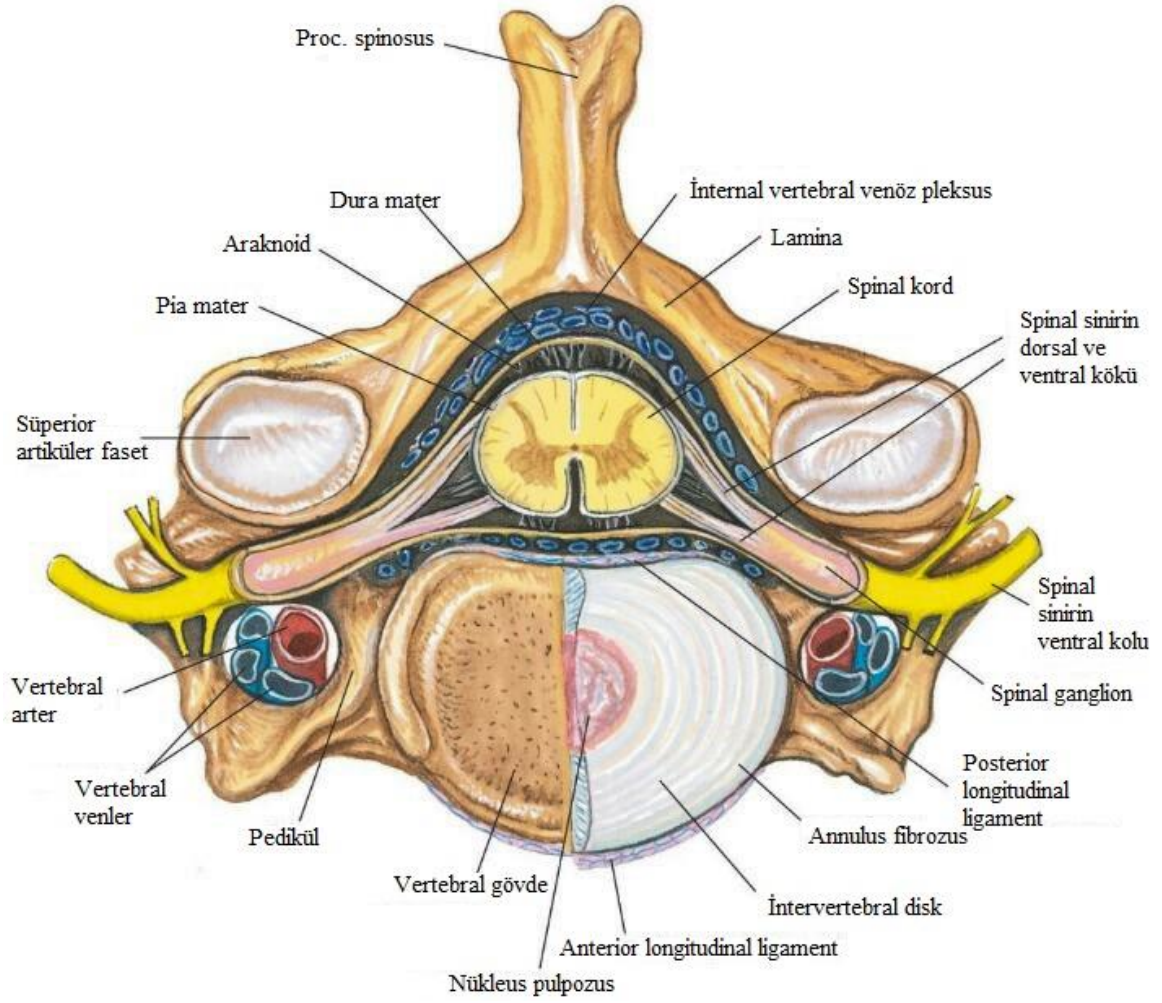
Liebich 2015). Periferik sinirlerden gelen sensörük ileteler dorsal boynuzdan girer ve motor cevaplar ventral boynuzdan çıkar (Önyay ve ark. 2016).

2.2.5. Beyaz Cevher

Beyaz cevher, inen ve çıkan miyelinli sinir liflerinden oluşur (Tortora ve Derrickson 2012). Myelin kılıf, oligodentrositlerden oluşmuştur ve beyaz rengi de miyelinli liflerin fazlalığı nedeniyledir (Dursun 2000, König ve Liebich 2015). Beyaz cevher, gri cevherin boynuzları ile 3 kordona ayrılır. Bu kordonlar topografik olarak önem taşıyan, funiculus dorsalis, funiculus ventralis ve funiculus lateralis'tir (Dursun 2000).

Funiculus dorsalis, beyaz cevherin iki kornu dorsale arasında kalan kısmıdır ve ağrı, dokunma, basınç ve ısı duyularının lokalizasyonlarını, ne zaman şekillendiğini ve ne türde olduğunu anlamaya ve ayırmaya yarayan duyuları medulla oblongatadaki ikinci nöronları olan nucleus cuneatus ve nucleus gracilis'e ileten afferent yani çıkan yolları kapsar. Bu yollardaki liflerin birinci nöronları unipolar nöronlardır ve ganglion spinalede yer alırlar. Bu nöronların periferik uzantıları kas, kemik, eklem, ligament ve tendolarda bulunur. Santral uzantıları da cornu dorsaleden omuriliğe girerler. Periferden alınan duyular önce ganglion spinaleye buradan santral uzantıları ile cornu dorsaleden medulla spinalise girerler, çıkan yollar ile medulla oblongataya gelen uyarılar daha sonra talamustaki üçüncü nöronlarına buradan da gyrus postcentralisteki dördüncü nöronlarına ulaşarak parietal lob korteksinde değerlendirileceği merkezde sonlanır (Dursun 2000).

Funiculus ventralis, beyaz cevherin iki cornu ventrale arasındaki kısmıdır. Çıkan ve inen yollar anatomik ve histolojik olarak ayırt edilemez. Ancak deneysel olarak uyarı-cevap reaksiyonu ile belirlenebilir (König ve Liebich 2015). Omurganın tam transvers kesit görünümü Şekil 2. 2. 5.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. 5. 1. Omurganın transvers kesit görünümü (<https://www.anatomynote.com/human-anatomy/nerves-system/spinal-cord-sectional-anatomy-detail/> erişimtarihi 04.04.2018)

2.2.6. Nöroglia

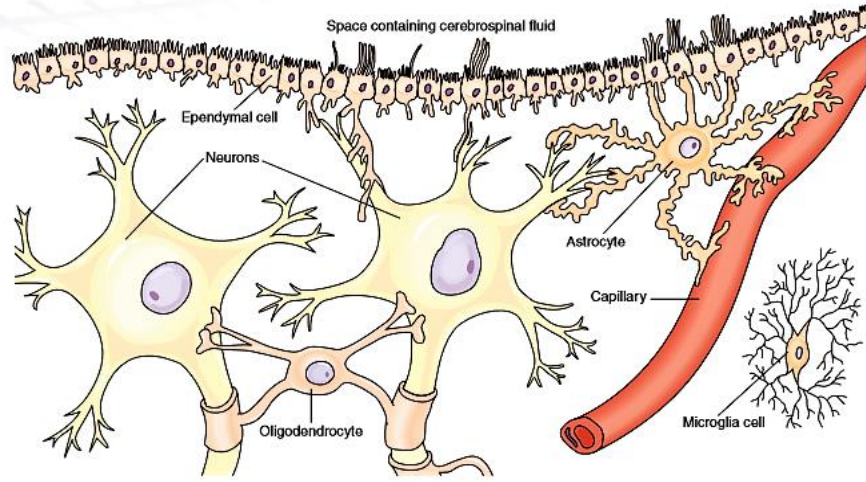
Nöroglia (glia), bağ dokusunun tüm işlevlerine sahip olan ektodermal kökenli merkezi sinir sisteminin destekleyici dokusu olmakla birlikte, metabolit değişimi ve patolojik süreçlerde dejenere hücrelerin fagositozunu ve skar oluşumu sağlayan hücrelerdir. Astroglia (makroglia), oligodendroglia ve mikroglia olmak üzere üç farklı nöroglia hücresi vardır (Kahle ve Frotscher 2003).

Astrositler, büyük ve net bir hücre çekirdeğine sahiptir ve yıldız benzerler. İki çeşit astrosit vardır. Protoplazmik astrositler daha çok gri cevherde, fibröz astrositler ise daha çok beyaz cevherde bulunur. Astrositler, travma sonrası dokuya destek görevi görürler,

kan damarlarına kadar uzanarak metabolit değişiminde rol oynarlar, merkezi sinir sisteminde iyon dengesinin korunmasını sağlarlar, muhtemelen sinir hücreleri tarafından salınan CO₂'yi alırlar ve interstisyel pH'ları 7.3'lük sabit bir değerde tutarlar (Kahle ve Frotscher 2003).

Oligodendrositler, küçük, koyu bir hücre çekirdeğine sahip, myelin kılıfı üreten ve koruyan hücrelerdir. Gri cevherde, nörona (uydu hücrelerine) eşlik ederken, beyaz cevherde, sinir lifleri arasında sıralar halinde bulunurlar (Kahle ve Frotscher 2003).

Mikroglialar, oval veya rod benzeri bir hücre çekirdeğine sahip, ameboid hareketleri ile beyin dokusuna göç edebilen ve fagositoz yapabilen hücrelerdir (Kahle ve Frotscher 2003). Sinir sisteminde bulunan nörogliaların görünümü Şekil 2. 2. 6. 1.'de verilmiştir.



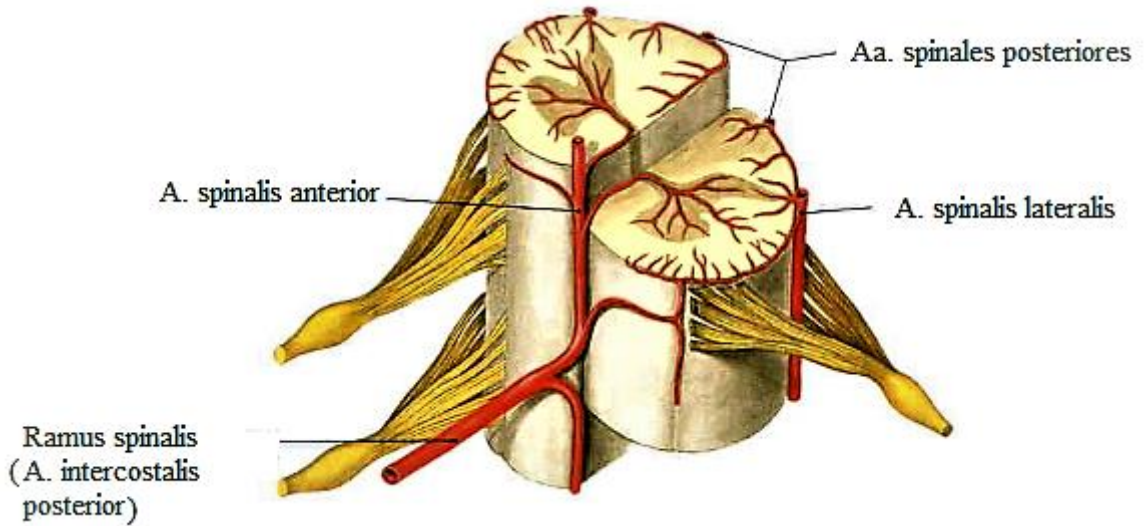
Şekil 2. 2. 6. 1. Sinir sisteminde bulunan nöroglia görünümü (Rizzo, 2010)

2.2.7. Medulla Spinalis'in Kan Damarları

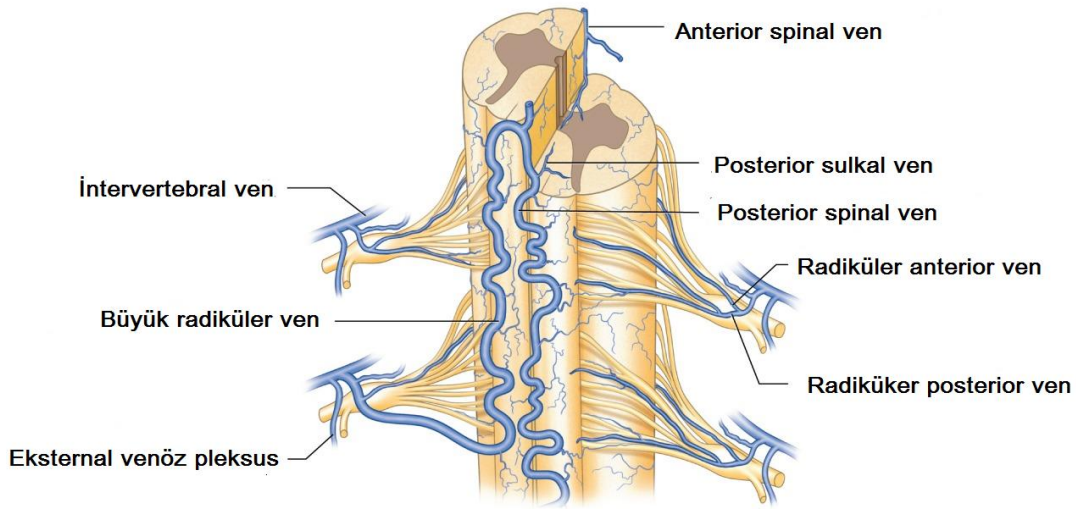
Omurilik iki ana kaynaktan beslenir bunlar vertebral arterler ve segmental arterlerdir (interkostal arterler ve lumbal arterler). Vertebral arterler birleşmeden önce, spinal kordun arka yüzeyi boyunca küçük arter ağı oluşturan iki ince posterior spinal arteri verirler. Piramidal çaprazlaşma düzeyinde, vertebral arterlerin iki dalı birleşerek anterior spinal arteri oluşturur ve anterior sulkusun girişindeki omuriliğin ön yüzeyi boyunca uzanır (Kahle ve Frotscher 2003). Segmental damarlar, foramen intervertebrale'den canalis vertebralis'e girer ve burada dorsal ve ventral dallara ayrılarak omurilik

sinirleriyle birlikte medulla spinalis'e ulaşır. Damarlar medulla spinalis boyunca seyreden a. spinalis ventralis ki en kalın damardır ve aa. spinales dorsolaterales adında 3 damara ayrılır. Bu damarlar medulla spinaliste plexuslar oluşturur (König ve Liebich 2015).

Spinal kordun toplar damarları, bir anterior spinal ven ve iki posterior spinal ven ile belirgin bir ağ oluşturur. Efferent damarlar spinal kökler boyunca uzanır ve epidural venöz pleksusa açılırlar (Kahle ve Frotscher 2003). Plexus venosus epidurales, omurganın dışındaki plexus venosus'a, o da venae vertebrales, vena cava cranialis, vena azygos veya vena cava caudalis'e açılır. Laminektomi gibi cerrahi operasyonlarda plexus venosus epidurales'te kanama görülebilir (König ve Liebich 2015). Medulla spinalis'in arterleri ve venleri sırasıyla Şekil 2. 2. 7. 1. ve Şekil 2. 2. 7. 2' de gösterilmiştir.



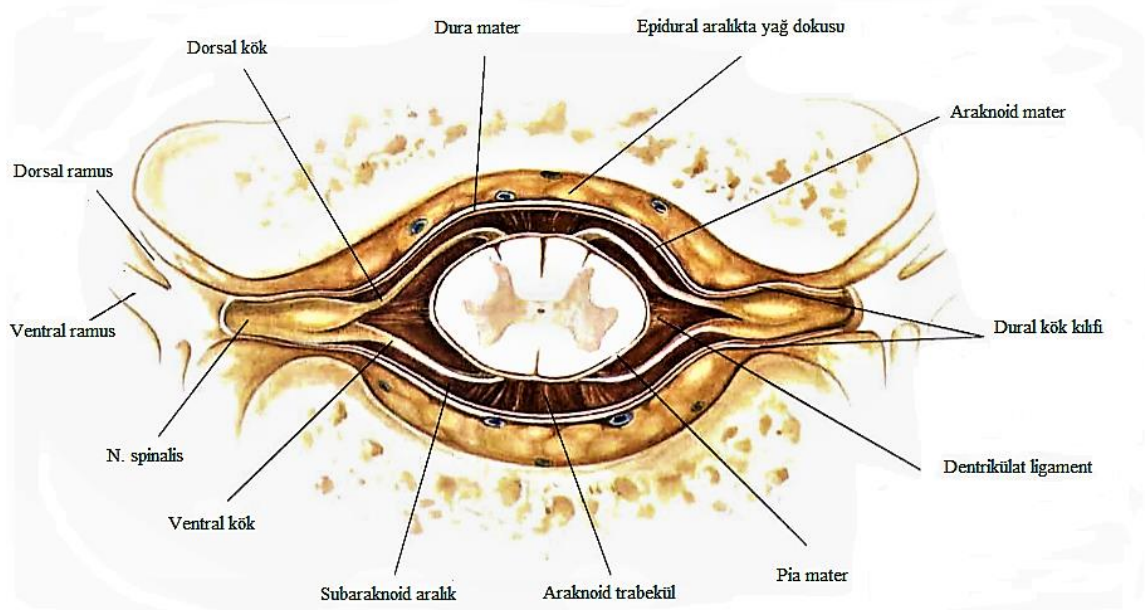
Şekil 2. 2. 7. 1. Medulla spinalis'in arterleri (Putz ve Pabst, 2006)



Şekil 2. 2. 7. 2. Medulla spinasli'in venleri (Amato ve Stolf, 2015)

2.2.8. Spinal Meninksler

Vertebral kanaldaki omurilik, sert spinal meninks (pachymeninx) diye isimlendirilen spinal duramater ve yumuşak spinal meninks (leptomeninx) diye isimlendirilen spinal araknoid ve spinal piamater'den oluşur (Kahle ve Frotscher 2003). Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı Şekil 2. 2. 8. 1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 2. 8. 1. Meninks ve dural kök kılıflarını gösteren omuriliğin kesit alanı (Cramer ve Darby, 1995).

2.3. Omurilik Yaralanmalarında Görüntüleme

Omurilik yaralanmalarında ilk olarak direkt grafi alınır, direkt grafisi şüpheli olan vakalarda bilgisayarlı tomografi önemli bilgiler verir. Şiddetli ve çoklu travması olan vakalarda ise ilk olarak bilgisayarlı tomografi tercih edilir. Eğer spinal kordda, ödem, hemoraji, ligament hasarı, yumuşak doku değişiklikleri, epidural kanama, travmatik disk fitiği vs. değerlendirilecek ise de manyetik rezonans görüntüleme tercih edilir (Alkan ve Kızılkılıç 2015).

2.4. Omurilik Yaralanmalarında Hasar Mekanizmaları

Spinal kord hasarının patogenezini ortaya koymak için deneysel hayvan modellerine başvurulmuştur (Baptiste ve Fehlings 2006). Omurilik hasarlarından sonra etkili bir tedavi protokolü geliştirebilmek için öncelikle hasarı takiben oluşan patofizyolojik süreçlerin detaylı bir biçimde anlaşılması gerekir (Profyris ve ark. 2004, Baptiste ve Fehlings 2006, Rowland ve ark. 2008). Omurilik hasarlarında bu patofizyolojik mekanizmaların değerlendirilmesi, birçok vakada kafa travması, serebral iskemi ve subaraknoid kanama gibi merkezi sinir sistemini ilgilendiren olaylarla birlikte görüldüğü için daha da önem kazanır (Dumont ve ark. 2001). Spinal kord hasarının kapsamlı bir şekilde anlaşılması için yapılan çalışmalar yeni bilgiler ortaya koymasına rağmen, bu çalışmaların etkili klinik uygulaması için daha objektif ve inandırıcı kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır (Kim ve ark. 2017).

Omurilik yaralanmalarının patofizyolojisi, kronolojik olarak primer hasar fazı ve sekonder hasar fazı olmak üzere bifazik olarak tanımlanır (Profyris ve ark. 2004, Baptiste ve Fehlings 2006, Rowland ve ark. 2008, Kim ve ark. 2017).

2.4.1. Primer Hasar Mekanizmaları

Travmaya ilk maruz kalındığında oluşan fleksiyon, ekstensiyon, dislokasyon, distraksiyon (Tator 1995, Yılmaz ve ark. 2014, Tanrıverdi 2015), patlama kırıkları, rupture olmuş disk materyali, ateşli silah yaralanmaları (Olby 1999, Sekhon ve Fehlings 2001), kontüzyon (Güzel ve ark. 2006), laserasyon, kompresyon, disk, kemik ve diğer yabancı cisimlerin osteoligamentöz yapıları aşarak medulla spinalis üzerinde oluşturdukları hasara primer hasar denir (Tator 1995, Şenel ve ark. 1999, Belanger ve Levi 2000, Güzel ve ark. 2006). Klinik vakalarda oluşan omurilik yaralanmalarının büyük kısmı omurga kırık ve çıkıkları şeklindedir. Servikal omurga bölümündeki yaralanmalar en yaygın hiperekstensiyon veya hiperfleksiyon şeklinde olurken, torasik omurga bölümünde, fleksiyon veya kompresyon şeklinde oluşmaktadır (Profyris ve ark. 2004). Oluşan doku hasarı, yaralanmanın şiddeti ile doğru orantılıdır (Tanrıverdi 2015). Omurilik hasarından sonraki ilk birkaç günlük süreçte lezyonun patolojik görünüşünde dramatik değişiklikler olur (Tator 1995). Yaralanma esnasında dış güçlerin etkisiyle akson ve nöronlar mekanik olarak hasar görür (Güzel ve ark. 2006, Tanrıverdi 2015). Spondilozis, konjenital spinal kanal darlığı, romatoid artrit, ligamentum flavum hipertrofisi gibi durumlar bu hasar riskini artırır (Profyris ve ark. 2004). Tanrıverdi (2015), yapmış olduğu bir derlemede hayvan çalışmalarında aksonların %1.4-%12'sinin korunması durumunda distal nörolojik fonksiyonların önemli bir şekilde devam ettiğinin görüldüğünü vurgulamıştır. Travmaya maruz kalan omurilik bölgesindeki kan akımı azalır. Omurilikte hipoksi ve iskemi sonucu infarktüs şekillenir. Bu durum özellikle metabolik ihtiyacı daha fazla olan gri cevher hasarına sebep olur. Sinir iletiminde bozulmaya neden olan diğer faktörler hasar gören bölgedeki ödem ve makrofajlardır (Yılmaz ve ark. 2014).

2.4.2. Sekonder Hasar Mekanizmaları

İkincil yaralanma, birincil yaralanmayı takiben oluşur (Belanger ve Levi 2000) ve çoğu zaman daha önemlidir (Kim ve ark. 2017). Primer yaralanmaya müdahale şansı olmazken, sekonder yaralanma sonucunda şekillenen patofizyolojinin iyi anlaşılması ve

dolayısıyla engellenebilmesi mümkün olabilir (Polat ve ark. 2012). Klinik ve deneysel olarak oluşan omurilik hasarı patofizyolojileri arasında önemli bir benzerlik mevcuttur (Profyris ve ark. 2004). Ancak laboratuvar çalışmalarında başarı elde edilen birçok farmakolojik ajanın hastalar üzerinde etkisiz olduğu görülmüştür. Bu yüzden elde edilen veriler çok dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Hayvan deneylerinde spinal kord hasarı oluşturmak için kullanılan kompresyon, ağırlık düşürme (Tator ve Fehlings 1991) veya direkt kesme işlemlerinin mikrovasküler perfüzyon bozukluğu, lipid peroksidasyonu, apoptoz ve iyon değişiklikleri sonucu sekonder hasara sebep oldukları anlaşılmıştır (Tanrıverdi 2015).

Omurilikte primer hasar sonrası başlayan saatler ve günler içinde bir dizi fizyopatolojik ve biyokimyasal olaylar zinciri gelişir (Khoshnevisan ve ark. 2010, Oh ve Jeon 2016) ki bu değişiklikler sonucu kanama, demyelinizasyon, ödem, aksonal ve nöronal nekroz (Yılmaz ve ark. 2014), inflamasyon, vazospazm (Oh ve Jeon 2016), iskemi, hücre içi kalsiyum artışı, membran hasarı, eksitatör aminoasit ve serbest radikaller ortaya çıkar ve omurilik daha fazla hasar görür, buna sekonder hasar denir (Şenel ve ark. 1999, Belanger ve Levi 2000, Güzel ve ark. 2006, Rowland ve ark. 2008, Khoshnevisan ve ark. 2010, Yılmaz ve ark. 2014). İlk yaralanmanın hemen ardından nörolojik defisitler mevcut iken, sekonder hasar fazı daha uzun süreli bir doku tahribi ile sonuçlanır (Rowland ve ark. 2008). Aslında temel patolojik süreç, hücresel seviyede bozulmuş perfüzyon ve iskemi sonucu gelişen enerji yetersizliğidir. İskeminin omurilik travmasından hemen sonra başladığı ve tedavi edilmediğinde ilk 3 saat içerisinde daha da kötüleştiği ve en az 24 saat boyunca devam ettiği bildirilmiştir (Yılmaz ve ark. 2014). Sekonder hasar tanımlaması ilk olarak 1911 yılında Allen tarafından ortaya atılmıştır ve kullanılan medikal tedavilerin hepsi sekonder hasarı önlemeye yöneliktir (Tator 1995, Güzel ve ark. 2006). Bununla birlikte, yapılan birçok çalışma omurilikte olağanüstü bir iyileşme kapasitesinin olduğunu göstermiştir. İyileşme aşamasında en önemli faktör ise doğru kan akımının sağlanmasıdır. Bu nedenle posttravmatik nekroz mekanizmalarının iyi anlaşılması tedaviyi başarılı yönlendirmede çok önem arz etmektedir (Yılmaz ve ark. 2014).

2.4.2.1. Sistemik Değişiklikler

Omurilik yaralanması travma anında başlar ve geri döndürülemez bir yola girer. Sekonder hasarı önlemek için resusitasyonun önemi büyüktür. Hasta entübe edilmeli ve oksijen desteği verilmelidir (Belanger ve Levi 2000). Hastaların çoğunda pnömoni, atelettazi veya mekanik ventilasyon gerektiren solunum yetmezliği gibi komplikasyonlar gelişir ve spinal travma sonrası görülme insidansı % 36 ile % 83 arasında değişir (Rouanet ve ark. 2017). Omurilik travmasından sonraki 2 saatlik dönemde önemli değişiklikler şekillenir. Bu süreçte omuriliğe gelen akımında azalma, vasküler konjesyon, ödem, oksijen basıncında düşme, karbondioksit basıncında yükselme, vasküler otreaktivitenin kaybolması, hipoksi, iskemi ve sonunda infarktüs gelişebilir (Güzel ve ark. 2006). Spinal kord travmalarında nörojenik şok gelişebilir. Bu terimi kısaca açıklamak gerekirse, vazomotor uyarıların önemli oranda felce uğraması ve doku perfüzyonunun yetersizliği şeklinde tanımlanabilir. Nörojenik şok şekillendiğinde ise vazodilatatör ve vazokonstriktör mekanizmaların arteriyoller ve venüller üzerindeki etkileri bozulmaktadır (Dumont ve ark. 2001). Akut omurilik yaralanmasında görülen sistemik faktörler, düşük kardiyak output, nörojenik şok ve solunum yetmezliği nedeniyle oluşan hipotansiyondur (Dumont ve ark. 2001, Yılmaz ve ark. 2014). Ratlarda, kedilerde, köpeklerde ve primatlarda travmayı takip eden ilk 10 dakika içinde hipertansiyon görülür daha sonraki süreçte yerini hipotansiyona bırakır (Olby 1999). Özellikle T6 seviyesinin üzerindeki travmalar sempatik tonusu azaltır ve vagal etki ile periferik damar tonusu kaybı sonucu hipotansiyon ve bradikardi görülebilir (Rouanet ve ark. 2017). Travma sonrası sıvı takviyesinin iyi yapılması gelişen hipotansiyonun önüne geçmek için iyi bir yoldur (Belanger ve Levi 2000). Omurilik hasarı olmuş hastalarda travma sonrası 7 gün kadar arteriyel kan basıncını 85-90 mmHg civarında tutmak gerekir (Rouanet ve ark. 2017). Nörojenik şok, sempatik tonusun azalması, kardiyak vagotoni ve kalpteki sekonder değişikliklerden kaynaklanır (Tator 1995). Böyle bir durumda metabolitlerin ve oksijenin dokulara ulaşması engellenir. Spinal şoka bağlı hipotansiyon hasarlı bölgedeki perfüzyonu azaltacağı için mutlaka kontrol altına alınmalıdır (Yılmaz ve ark. 2014). Aksi halde hasar daha da şiddetlenir (Dumont ve ark. 2001). Nörojenik şokun derecesi, travmanın şiddeti ve seviyesi ile doğrudan ilişkilidir. Travmaya bağlı hipotansiyon günlerce hatta aylarca sürebilir (Tator 1995). Omurilik travması oluşturulan

hayvan modellerinde omuriliğe kan akışını arttırmak ve tansiyonu normal seviyelerde tutmak için kan transfüzyonu yapılmış ve dopamin verilmiştir ancak hasarlı bölgede mikrodolaşım bozulduğu için bir iyileşme görülmemiştir (Yılmaz ve ark. 2014).

2.4.2.2. Vasküler Değişiklikler

Omurilik yaralanmaları hem sistemik hem de lokal vasküler değişikliklere neden olur (Olby 1999, Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006). Deneysel ve klinik modellerde özellikle de gri cevherde olmak üzere lezyonun santral bölgesinde progresif bir kanama olur. Oluşan travmanın etkisi ile kılcak damarlar, venüller ve bazı arterioller mekanik hasara uğrar (Tator 1995). Oluşan damar hasarı sonucu perfüzyon bozulur ve bu süre birkaç saat kadar sürerek klinisyene terapötik müdahale için fırsat tanımış olur (Olby 1999). Omurilik hasarından hemen sonra lezyonlu bölgeye kan akışında önemli bir azalma olur ve kanamalı alanlara yakın bölgelerde iskemi oluşur (Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006, Yılmaz ve ark. 2014, Tanrıverdi 2015). Eğer oluşan iskemiye birkaç saat içerisinde müdahale edilemezse durum daha da kötüleşir (Sekhon ve Fehlings 2001). Bunun sonucu olarak dokuya giden glukoz ve oksijen miktarında azalma ve enerji ihtiyacında artış olur. Omurilik travması sonrası gelişen iskeminin arkasındaki hasar mekanizması ve iskeminin kesin sebepleri tam olarak anlaşılamamıştır (Sekhon ve Fehlings 2001, Yılmaz ve ark. 2014). Tator iskemiye direkt mekanik hasar olarak vazospazma, biyokimyasal hasar olarak da katekolaminler, glutamat ve prostoglandinlere bağlamış (Tator 1995), Osterholm ve Matthews ise bu spazmın lezyonlu bölgede biriken katekolaminlerden kaynaklandığını bildirmiştir (Güzel ve ark. 2006). Ratlarda ve maymunlarda yapılan bir deneysel çalışmada iskemi sürecinin en az 24 saat sürdüğü bildirilmiştir (Sekhon ve Fehlings 2001). Sulkal arterlerde oluşan yırtılmalar ve tromboz sonucu gri maddede perfüzyon daha çok bozulur. Gri maddede metabolik ihtiyacın daha fazla olması gri maddenin iskemiye karşı duyarlılığını artırır (Tanrıverdi 2015). Omurilik travmalarında sempatik tonus azalır ve bradikardi ile birlikte nörojenik şok şekillenir (Güzel ve ark. 2006; Tanrıverdi 2015). Oluşan sistemik hipotansiyona bağlı olarak omurilik kan akımı azalır. Buna bağlı omurilikte önce hipoperfüzyon sonra ödem şekillenir (Güzel ve ark. 2006). Ödem, spinal kordda basınç artışına neden olarak

omuriliğin lokal kan akışının bozulmasına neden olur (Yılmaz ve ark. 2014). Travmayı takip eden birkaç saat içinde ise posttravmatik iskemi gelişir. Posttravmatik iskeminin gelişmesinde genel olarak fibrin ve trombositler, ödem, vazoaaktif sitokinlerin birikimi nedeniyle laktik asidoz, venöz staz nedeniyle dokunun pH düşüşü (Yılmaz ve ark. 2014), vazospazm (Olby 1999), eksitotoksik aminoasitler (Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006), glutamat (Sekhon ve Fehlings 2001), kılcal endotel hasarı veya şişme, peteşi kanamaları ve trombozun rol aldığı düşünülür (Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006, Yılmaz ve ark. 2014). Nemecek, ışık mikroskopu ile intravasküler trombozu gözlemlemiştir (Tator 1995).

2.4.2.3. Biyokimyasal Değişiklikler

Omurilik travması sonrası sinir dokusunda hücre içi kalsiyum artışına neden olan eksitator bir aminoasit nörotransmitteri olan glutamat birikmesi sonucunda sekonder hasar olduğu öne sürülmüştür. Hücre içi kalsiyumun birikmesi hücredeki hasara bağlı olarak kalsiyum bağımlı proteazların veya lipazların aktivasyonuna sebep olur. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörü, glutamata bağlı eksitotoksositeye katılan başlıca reseptör olmayıp birkaç tane daha eksitator aminoasit reseptörü vardır (Tator 1995). Travma sonrası omurilikte lezyonlu bölgeye gelen kan akımındaki azalmadan sorumlu tutulan ajan norepinefrin'dir. Travma sonrası lipid peroksidasyonu, lizozomal ve fosfolipaz aktivasyonu, nörotoksik maddelerin oluşumu, iyonların yer değiştirmesi ve opiat reseptör aktivasyonu gibi biyokimyasal olaylar oluşur (Güzel ve ark. 2006). Lipid peroksidasyonunun inhibisyonu ve serbest radikallerin azaltılmasında steroidlerin önemli rolü olduğu öne sürülmüştür. Prostaglandinler ile birlikte araşidonik asitin ve eikozanoidlerin fazla miktarda üretimi de lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu ile ilgili olabilir (Tator 1995). Travmadan sonraki ilk yarım saatlik süreçte birincil nöronal hasar başlar. Hücre içinde Na^{+} 'un, hücre dışında ise K^{+} 'un artması ile aksonal iletim durur. Ca^{++} , K^{+} ve Na^{+} akımında önemli yere sahiptir. Travma sonrası Ca^{++} kanallarındaki bozulmadan kaynaklı hücre içi kalsiyum miktarı artar ve proteaz, fosfolipaz ve fosfatazların aktivasyonuna sebep olarak hücre fonksiyonu bozular. Ca^{++} mitokondrideki elektron transportunu da etkiler ve serbest radikalleri açığa

çıkarr. Sonuç olarak serbest radikaller ve diğer maddeler kan akımında azalmaya sebep olarak hasarın ilerlemesine sebep olur (Güzel ve ark. 2006).

2.4.2.4. Metabolik Değişiklikler

Travma sonrası omurilikte kan akımındaki azalmaya bağlı olarak geçici olarak glikoz kullanımını artar. Şekillenen iskemi anaerobik glikolizise neden olur. Glikoliz sonucu hücre içi laktik asit birikimi olur ve asidoz şekillenir. Sonuç olarak daha fazla hücre ölümüne sebep olur (Güzel ve ark. 2006).

2.4.2.5. Serbest Radikaller ve Lipid Peroksidasyonu

Tek sayıda (çiftleşmemiş) elektron taşıyan moleküllere serbest radikaller denir ve protein, lipid ve DNA (Deoksiribo Nükleik Asit) molekülleri ile reaksiyona girerler (Tanrıverdi 2015). Oluşan serbest radikaller, hücre zarının temel yapısı olan yağ asitlerini oksitleyip lipid peroksidasyonuna sebep olurlar ve dolayısıyla epoksit, aldehytler ve yeni serbest radikaller gibi hücre için birçok toksik bileşik oluşmasına neden olurlar (Suarez ve ark. 1998). Hücrenin canlılığını koruyabilmek için aşırı serbest radikal oluşumunu önlemek önemlidir (Yılmaz ve ark. 2014). Mitokondrideki solunum ile ilgili enzimlerin oksidatif stres kaynaklı saf dışı kalması sonucu DNA ve DNA bağımlı proteinler çalışamaz hale gelir ve Na-K-ATPaz enzimi inhibe edilerek apoptoz şekillenir (Tanrıverdi 2015). Antioksidatif mekanizmanın spinal kord hasarının patofizyolojisi üzerinde anlamlı bir etkisinin olduğu anlaşılmıştır. Genç ve yaşlı sıçanlar üzerinde oluşturulan spinal kord hasarı sonrası iki haftalık süreçte ölüm oranları %20 ve %50 oranında gerçekleşmiştir. Cyclosporin A, EPCK1, vitamin E ve selenyum gibi ajanlar spinal kord hasarı sonrası serbest radikalleri yok etmeleri noktasında faydalı bulunmuştur. Melatonin, Mexiletine, eritropoetin, thiopental and propofol gibi ajanların da lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Yılmaz ve ark. 2014).

2.4.2.6. Omurilik İletiminin Kesintiye Uğraması

Aksonal iletim travmaya bağlı olarak kalıcı ya da geçici olarak kesintiye uğrar. Akut dönemde biyokimyasal değişikliklere bağlı olarak iletim kesintiye uğrar, hücre dışı K^+ 'un aşırı birikmesi spinal şoka sebep olabilir. Membranın bozulmasıyla beraber daha şiddetli bir aksonal yaralanma sonucu ise kalıcı bir iletim bozukluğu görülebilir (Güzel ve ark. 2006).

2.4.2.7. Ödem

Omurilik yaralanmalarında progresif ödem görülebilir. Ancak şekillenen bu ödemin tek başına zararı var mıdır yoksa iskemi veya glutamat toksisitesi gibi başka bir hasar mekanizmasını tetikler mi bilinmemektedir (Tator 1995). Ödem, hücre içi aşırı Na^+ birikimine bağlı olarak gelişir (Güzel ve ark. 2006). Sadece lezyonlu bölge ile sınırlı kalmayarak lezyonun ilerisine ve gerisine doğru ilerler (Tator 1995, Güzel ve ark. 2006).

2.4.2.8. Apoptoz

Apoptozis; insan, maymun ve ratlarda, spinal kord hasarını takiben doku hasarına sebep olan çok önemli bir komponenttir (Antar 2005). Omurilik hasarı sonrası gelişen sekonder hasarda apoptoz önemli bir yer tutar (Profyris ve ark. 2004). Hücre ölümü, ya nekroz ya da apoptoz yoluyla olur (Sekhon ve Fehlings 2001). Apoptozis kelime anlamı olarak ökaryotik hücrelerde programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir (Emery ve ark. 1999, Sekhon ve Fehlings 2001). İlk olarak 1995 yılında sıçanlarda ve yakın zamanlarda da insan omuriliğinde tanımlanmıştır (Sekhon ve Fehlings 2001). Apoptoz, nekrotik hücre ölümünden ayırt edilirken, morfolojik ve biyokimyasal kriterler göz önünde bulundurulur (Emery ve ark. 1999). Nekrotik hücre ölümünde hücre önce pasif olarak şişer, hızlı bir enerji kaybıyla mitokondriyal hasar oluşur (Emery ve ark. 1999), organeller parçalanır, hücre zarı erir ve nihayetinde de hücre içi materyaller dışarı çıkar

(Tanrıverdi 2015). Apoptozis, nekrozun aksine hücre ve çekirdeğinin büzülmesi, kromatin agregasyonu ve DNA'nın parçalanması ile karakterizedir (Emery ve ark. 1999, Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006). Travmatik spinal kord hasarı sonrası apoptozun başlatılması, serbest radikallerin yükselmesine bağlı şekillenen omurilik hasarı, glutamat artışı, sitokinlerin salınması, iskemi ile ortaya çıkan gen ekspresyonu değişiklikleri (Güzel ve ark. 2006), inflamatuvar hasar ve eksitotoksinite ile tetiklenir (Yılmaz ve ark. 2014). Travmaya maruz kalan omurilik bölgesinde apoptoza uğrayan majör hücre tipi oligodentrositlerdir (Emery ve ark. 1999, Sekhon ve Fehlings 2001). Apoptotik hücre ölümü omurilik hasarını takiben 3 saat ile 8 hafta arasında değişiklik gösterir (Yılmaz ve ark. 2014). Profyris ve ark. (2004) ise apoptozun yaralanmadan 6 saat sonra ortaya çıktığını ve birkaç gün içinde de arttığını bildirmişlerdir. Emery ve ark. (1999) yapmış oldukları bir çalışmada ise apoptozun yaralanmadan 4 saat sonra ortaya çıktığını ve 3 hafta gibi bir sürede azalan miktarda görülebileceğini söylemişlerdir. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda travmadan birkaç hafta sonra oligodentrositlerdeki apoptozisin demyelinizasyonu daha kötüye götürdüğü gözlenmiştir. Bazı yazarlar mikroglia'daki apoptozun sekonder inflamasyon hasarını kötüleştirdiğini savunur (Yılmaz ve ark. 2014). Apoptozun oluş mekanizması belirsizdir, ancak hücre ortamındaki olumsuz değişiklikler, wallerian dejenerasyonunun bir sonucu olarak veya her ikisinin kombinasyonu sonucu ortaya çıkabileceği düşünülmüştür (Sekhon ve Fehlings 2001). Yaralanmadan 15 dakika sonra akson çevresinde şişme oluşur, miyelin tabaka soyulmaya başlar ve miyelin yırtılarak hücre dışına aksonal içerik boşalabilir (Profyris ve ark. 2004). Sistein proteaz ailesinden olan kaspazlar, apoptozun efektör evresinde önemli rol oynar. Özellikle kaspaz-3'ün, sinirsel gelişim ve spinal hasarda önemli olduğu gösterilmiştir (Emery ve ark. 1999). Kaspazlar apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklendiği için omurilik hasarında kaspaz aktivasyonu aşırı yükselir ve apoptozun en belirleyici moleküler işaretleyicisidir (Güzel ve ark. 2006, Yılmaz ve ark. 2014). Kaspaz enzimleri hücre iskeletini ve nükleer proteinleri denatüre ederler (Tanrıverdi 2015). Kaspaz-3 aktivitesinin ve apoptozun, travmatik beyin hasarı ve deneysel geçici iskemi sonrasında sinirsel hücre ölümüne katkısı olduğu anlaşılmıştır. Her iki yaralanma şeklinde de kaspaz inhibitörleri kullandığında, hem apoptozu azaltmış hem de hayvanlarda fonksiyonel iyileşme gözlenmiştir (Emery ve ark. 1999). Apoptoza uğramış hasarlı hücre zamanla proteazın etkisiyle kendini sindirir ve fagositozla yok edilir.

Apoptozun nekrozdan farkı belirgin bir inflamatuvar yanıtın olmayışıdır (Sekhon ve Fehlings 2001, Güzel ve ark. 2006, Tanrıverdi 2015). Aslında her iki ölüm mekanizması da iskemi, oksidatif stres ve eksitotoksisite gibi mekanizmalarla başlatılmaktadır, ancak farklı mekanizmalarla devam etmektedirler. Bu iki mekanizmanın anlaşılması tedavi protokolünü belirlemede ve apoptoza giden hücelere müdahale etmede büyük önem taşımaktadır (Tanrıverdi 2015).

2.4.2.9. Postravmatik İnflamatuvar ve İmmünolojik Yanıt

Santral sinir sisteminde gelişen yangısal yanıt, diğer organ sisteminde gelişen yangısal yanıtlardan daha farklıdır (Tanrıverdi 2015). Postravmatik inflamasyon, omurilik hasarını takiben periferik bağışıklık hücreleri tarafından ilk 24 saatte başlar ve birkaç gün içinde pik yapar (Güzel ve ark. 2006, Yılmaz ve ark. 2014). 6-12 saatlik süreçte kan orijinli nötrofillerin baskın olduğu görülürken (Profyris ve ark. 2004) daha sonra bölgede makrofajlar artış gösterir (Güzel ve ark. 2006, Tanrıverdi 2015). Makrofajlar ve mikroglial hücreler inflamasyonda ve TNF-alfa, İL-1, İL-6 (Profyris ve ark. 2004, Tanrıverdi 2015), İL-10, interferonlar (Tanrıverdi 2015), makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ve lösemi inhibitör faktörü (Mortazavi ve ark. 2015) gibi sitokinlerin salınmasına bağlı olarak sekonder patolojik değişikliklerde rol oynar (Yılmaz ve ark. 2014). Yaralanma sonrası İL-1 mikroglialar tarafından salınır. Bununla birlikte TNF-alfa ve İL-6 ilk 15 dakika içinde artmaya başlar. Bu sitokinlerin seviyeleri birkaç saat içinde pik yaparlar ancak 24 saatte farkedilebilir hale gelirler. Omurilik hasarı sonrası, transforming büyüme faktörü- β (TGF- β) ekspresyonunu da uyarılır (Profyris ve ark. 2004). Sitokinler, siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimini aktif hale getirerek araziidonik asiti parçalar, bunun sonucunda açığa çıkan prostanoidler vasküler geçirgenlik, trombosit agregasyonu ve adezyon gibi olaylara sebep olurlar (Tanrıverdi 2015). Prostanoidlerin çeşitli bağışıklık düzenleyici etkileri vardır ve sekonder yaralanmayı arttırabilirler (Profyris ve ark. 2004). Travmaya uğramış bölgede prostaglandinler, bradikinin, trombosit aktive edici faktör, lökotrienler ve serotonin gibi yangı mediatörleri de birikir (Yılmaz ve ark. 2014). Santral sinir sisteminde nötrofiller, makrofajlar, astrositler, mikroglialar ve T hücreleri tarafından da üretilen TNF-alfa, omurilik hasarı sonrası

2.4.3. Biyokimyasal ve İmmünohistokimyasal Parametreler

2.4.3.1. Kaspaz-3

Yunanca'da yaprak dökümü anlamına gelen apoptoz (Güleş ve Eren 2008), çok hücreli organizmada artan hücre sayısının hücre ölümleri ile dengelenmesini sağlayan temel ve karmaşık biyolojik bir olaydır (Porter ve Janicke 1999, Güleş ve Eren 2008). Bir organizmada bir hücreye gerek kalmadığında, intrasellüler haberci sistemler aktif olarak o hücrenin ortadan kaldırılma süreci başlatılır. Bu sürece de programlı hücre ölümü denir (Güleş ve Eren 2008). Apoptoz mekanizmasında, ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve proteolitik enzimler (kaspazlar) olmak üzere üç temel grup vardır (Tomatır 2003). Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün önemli araçlarıdır. Bunların arasında, kaspaz-3, birçok önemli hücre proteininin spesifik bölünmesini katalize eden, aktive edilmiş bir ölüm proteazıdır. Kaspaz-3 aktivasyonuna geçiş yolları, mitokondrial sitokrom-c salımına ve kaspaz-9 fonksiyonuna bağımlı veya bunlardan bağımsız olarak tanımlanmıştır (Porter ve Janicke 1999).

2.4.3.2. GFAP (Glial Fibriler Asidik Protein)

Glial fibriler asidik protein (GFAP), ilk olarak merkezi sinir sisteminin demiyelinizan bir hastalığı olan multiple sklerozisli (MS) bir hastanın glial skarından (plak) izole edilmiştir (Eng ve Ghirnikar 1994). GFAP, merkezi sinir sisteminin olgun astrositlerinde bulunan temel ara filament proteinidir (Eng ve ark. 2000, Brenner 2014). Sitoskeletal protein ailesinin bir üyesi olan GFAP'ın, astrositik süreçlere yapısal dayanıklılık sağlayarak astrosit motilitesini ve şeklini modüle etmede önemli olduğu düşünülmektedir (Eng ve Ghirnikar 1994, Eng ve ark. 2000). Gelişmiş omurgalıların merkezi sinir sisteminde travma, hastalık, genetik bozukluklar veya kimyasal hasar sonucu yaralanma sonrasında astrositler reaktif hale gelir ve astrogliazis olarak adlandırılan tipik bir tepki verirler (Eng ve ark. 2000). Reaktif astrogliazis, bitişik astrositlerin belirgin bir özelliğidir. Astrogliazis, astrosit çoğalması, hücre gövdesi ve

sitoplazmik süreçlerin yoğun hipertrofisi ile karakterizedir. Reaktif astrositlerin, aktif olarak MSS'nin ekstrasellüler boşluğundaki moleküler ve iyonik içeriği takip edip kontrol ederek merkezi sinir sistemi yaralanmasının ardından iyileşme aşamasında rol oynadığı düşünülmektedir (Eng ve Ghirnikar 1994). Astrogliazisde, GFAP hızlı bir şekilde sentezlenir ve protein içeriğindeki artış veya GFAP antikoru ile immün boyama vasıtasıyla gösterilir (Eng ve ark. 2000).

2.4.3.3. TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör-alfa)

Tümör hücre dizilerine karşı sitotoksitesi keşfedilen ilk işlevlerden biri olması sonucu tümör nekroz faktörü denmiştir (Vasanthi ve ark. 2007). Kaşektin olarak da bilinir (Özoran ve ark. 1994). TNF- α 'nın biyolojik fonksiyonları son derece geniştir ve etki mekanizması biraz karmaşıktır (Idriss ve Naismith 2000, Vasanthi ve ark. 2007). Bir taraftan belirli enfeksiyonlara direnç kazandırırken diğer taraftan patolojik komplikasyonlara neden olan bu protein, çelişkili roller üstlenmiştir. Bu durum, aktive edilen çeşitli sinyal yollarıyla ilişkili olabilir (Idriss ve Naismith 2000). Akut faz reaksiyonunu uyarı ve proinflatuvar bir sitokin olan, TNF- α , birçok inflamatuvar hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar (Kalfa ve Aksu 2011). Bununla beraber bakteriyel ve özellikle mikobakteriyel hastalıklara karşı vücut savunmasında da önemli rol oynamaktadır (Idriss ve Naismith 2000, Kalfa ve Aksu 2011). T hücrelerden ve aktive makrofajlardan transmembran prekürsör proteini olarak sentezlenen TNF- α , apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu indükler, bununla beraber tümör gelişimini ve viral replikasyonu engeller. TNF- α , İL-1 beta, İL-6 ve İL-8 gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımını uyarır ve endotel adezyon moleküllerinin güçlü bir aktivatörüdür. Dolayısıyla TNF- α sahip oldukları bu fonksiyonları ile inflamatuvar reaksiyonlarla alakalı süreçlerin başlatılmasını ve devam ettirilmesini düzenler (Kalfa ve Aksu 2011). TNF- α , vücutta immünoestimülasyon, enfeksiyon ajanlarına direnç, uyku düzenlemesi, embriyonik gelişim ve tümör direnci gibi birçok terapötik rol oynamaktadır (Idriss ve Naismith 2000). Apoptoz, hücre büzülmesi, apoptotik cisim formasyonu ve tipik olarak nükleozomal DNA fragmantasyonu oluşumu ile karakterizedir ve TNFR-1 (Tümör Nekrozis Faktör Resetörü) sinyal yolağı yoluyla oluşan genel bir TNF kaynaklı

sitotoksik fenomen olarak görülür. Bununla birlikte, apoptozise yol açan ve kontrol eden tam sinyal ağı açıklığa kavuşturulmamıştır (Idriss ve Naismith 2000).

2.4.3.4. İL-1 β (İnterlökin 1-beta)

Yaklaşık 10.000 dalton molekül ağırlığında olan İL-1, deney hayvanlarında ateş, koloni stimulan faktörlerin (CSF) salınımında artış, nötrofil artışı, uyku hali, iştahsızlık ve akut faz proteinlerinin sentezine yol açar. Yüksek dozlarda ise hipotansiyon ve lökopeni yapar (Özoran ve ark. 1994). Mononükleer fagositler başta olmak üzere nötrofiller, T lenfositler, B lenfositler, Naturel Killer (NK) hücreler, dendritik hücreler, keratinositler, fibroblastlar, astrositler (Demir ve ark. 2012), monositler, mezengial hücreler ve endotelin de içinde bulunduğu birçok hücreden sentezlenebilmektedir (Özoran ve ark. 1994). TNF- α , İL-1 sentezini uyaran ana sitokin olmasına rağmen, kendi sentezini parakrin ve otokrin etkiyle de uyarabilmektedir. İL-1 β ; TNF- α , İFN- γ , İL-4, İL-6, İL-8 ve İL-10 sentezinde rol oynayarak, beyin iskemisi şekillendiğinde hipertermiye neden olur ve iskemik harabiyeti arttırmaktadır. İL-1 β sinir hasarından da sorumlu tutulmaktadır. Travma sonrası 1. saatte en üst seviyeye çıkan İL-1 β ekspresyonu, 12. saatte bile hala bu yüksek seviyelerde seyredebilir (Demir ve ark. 2012).

2.4.3.5. TAS/TOS (Total Antioksidan Seviye/Total Oksidan Seviye)

Normal insan metabolizmasının bir parçası olan reaktif oksijen metabolitleri veya serbest radikaller (ROM/ SR), antioksidan cevapta bir yetersizlik olduğunda veya ROS düzeyi belirli bir yoğunluğu aştığında DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve enzim inaktivasyonu ile doku ve hücre hasarına yol açabilmektedir (Bulut ve ark. 2013). Reaktif oksijen türleri (ROS) metabolik ve fizyolojik süreçler ile üretilir ve organizmalarda enzimatik ve nonenzimatik antioksidatif mekanizmalarla ortaya çıkan zararlı oksidatif reaksiyonlar meydana gelebilir. Bunun sonucunda, oksitleyicilerdeki artış ve antioksidanlardaki azalma önlenemez ise oksidatif/antioksidatif denge oksidatif

duruma doğru kayar ve oksidatif stres gelişir. Oksidan moleküller, organizmalarda endojen olarak üretildiği gibi dış ortamdan da alınırlar. Elektron taşıma zinciri ve ksantin oksidaz, glikolat ve monoamin oksidazlar da dahil olmak üzere bir dizi oksidaz enzimi, büyük endojen ROS kaynaklarını oluştururlar (Erel 2005).

2.5. Spinal Kord Hasarının Patolojisi

2.5.1. Makroskopik Görünüm

Spinal kord hasarında klinik vakaların taklidi amacıyla çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir (Profyris ve ark. 2004). En yaygın kullanılan model kontüzyon modelidir ve ağırlık düşürme yoluyla oluşturulur (Tator 1995, Profyris ve ark. 2004). Diğer bir metot ise ağırlık veya anevrizma klibi kullanılarak oluşturulan kompresyon modelidir (Tator ve Fehlings 1991).

Primer hasara bağlı gri maddede şekillenen kanama ile lezyon alanındaki hücre ölümü omuriliğe ciddi bir zarar vermez. Ancak sekonder hasar mekanizması devreye girdiğinde olay değişir. Travmadan sonra 2 saat içinde kanama yaygınlaşır ve 24 saate kadar kanama devam eder. Kısa süre sonra ödem ağırlık kazanır (Profyris ve ark. 2004). Gri ve beyaz cevher şişerek yumuşak bir hale gelir ve sınırları kaybolur (Tator 1995). Travmadan 21 saat sonra kavitasyonlar oluşur ve 14 hafta sonra bu kavitasyonlar birleşerek büyük kistik alanlar haline gelir. Bu bölgeler glia kaynaklı skar dokusu ile çevrelenmiştir (Profyris ve ark. 2004). Glial skarlaşma aksonal rejenerasyona karşı fiziksel bir engel oluşturmaktadır (Oh ve Jeon 2016). Uzun vadeli dönemde bakıldığında oluşan bu kistik alanlar siringomiyeliye sebep olabilir (Wallace ve ark. 1987, Tator 1995).

2.5.2. Mikroskopik Görünüm

Gri madde, yoğun damarlaşması ve yumuşak kıvamı nedeniyle nekroz oluşumuna duyarlı bir dokudur (Profyris ve ark. 2004). Yaralanma bölgesinde normal sinir dokusu yoktur. Nöronların, aksonların ve miyelinin yapısı bozulmuştur. Nekroz ve kistik kavitasyonlar mevcut olmakla birlikte daha çok kordun orta hattına yerleşiktir. Beyaz cevher ile gri cevher sınırı kaybolmuştur ve normal yolakların tespiti zordur. Kavitasyonların içi lipid yüklü makrofaj ile miyelin içerebilir (Wallace ve ark. 1987). Travmaya maruz kalınan ilk birkaç dakikalık dönemde omuriliğin histolojik görünümü normaldir. Işık ve elektron mikroskopunda 5. dakidada aksonlar normal olarak görülürken gri cevherdeki venüllerin şiştiği görülür. 15-30. dakikalarda ise eritrositler damarların etrafına sızarlar. Gri cevherde noktasal kanamalar görülebilir. Travmadan 2 saat sonra polimorfonükleer lökositler ve mikroglialar gibi inflamatuvar hücreler yaralanma bölgesinde toplanmaya başlar (Güzel ve ark. 2006).

Omurilik yaralanmasından sonraki sekonder hasar süreci akut faz, subakut faz ve kronik faz olmak üzere üç faza bölümlenebilir (Kim ve ark. 2017).

2.5.2.1. Akut Faz Patolojisi

Akut faz, sekonder hasar mekanizmalarının harekete geçtiği kısa süreli dönemi tanımlar. Spinal kord hasarının erken akut fazı 2-48 saat arasında sürdüğü kabul edilir (Rowland ve ark. 2008, Kim ve ark. 2017). Akut fazın başlıca olayları vasküler hasar, kanama ve iskemidir. Patolojik değişiklikler, nöronların ve glial hücrelerin daha fazla hasar görmesine neden olur. Glutamat ve aspartat gibi eksitator nörotransmitterlerin aşırı aktivasyonunun bir sonucu oligodendrositler apoptoza uğrar. Serbest radikal aracılı lipid peroksidasyonu membran hasarına sebep olur. Yaralanma sonrasında kan-beyin bariyerinin (KBB) bir bileşeni olan astrositlerin hasar görmesi ve TNF- α ile İL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin neden olduğu geçirgenlik sonucu KBB bozulur (Kim ve ark. 2017). Mikroglialar 12 saat içinde yaralanma bölgesinde görülmeye başlar ve 3-7 günde pik yapar (Mortazavi ve ark. 2015). 4. saatte akson dejenerasyonu oluşur, 6. saatte ödem

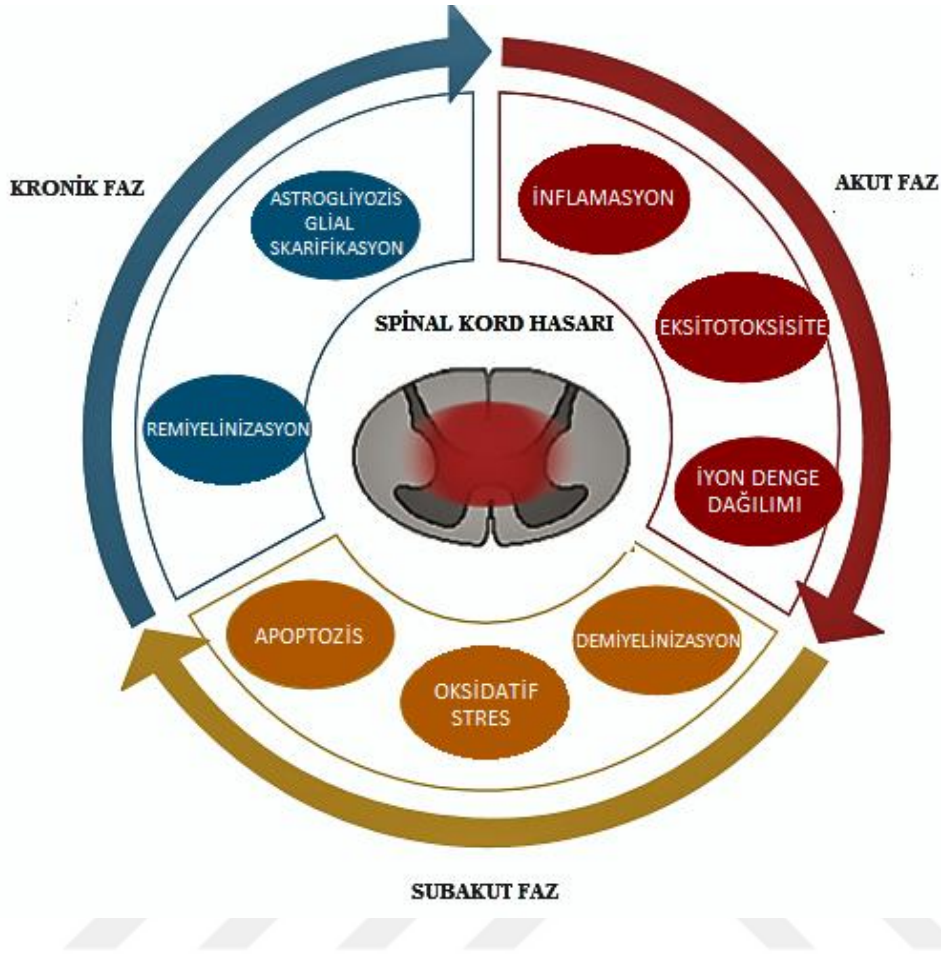
şekillenir, 12-24. saatlerde omurilik hasarının olduğu bölgede anatomik yapılar kaybolur (Güzel ve ark. 2006), 24-48. saatlerde ise kanama alanlarında hücre ölümü yani nekroz oluşur (Rowland ve ark. 2008). Daha sonraki günlerde bölgede polimorfonükleer hücrelerin yerini makrofajlar alır (Güzel ve ark. 2006).

2.5.2.2. Subakut Faz Patolojisi

Yaralanmadan sonraki 2 gün ile 2 hafta arasındaki süreç olduğu düşünülür (Rowland ve ark. 2008, Kim ve ark. 2017). Polimorfonükleer hücrelerin sayısı azalmaya başlar ve yerini mikroglialar ile makrofajlara bırakır (Tator 1995). Fagositik yanıt, bu dönemin kendine özgü bir özelliğidir. Diğer özelliği ise astrositlerin reaktif çoğalmasındır. Bunun sonucunda oluşacak glial skar rejenerasyon bölgesini doldurarak nöronal rejenerasyon için bariyer oluşturur. Merkezi sinir sistemi hasarlarından sonra iyileşmenin olmaması ise bu nedene bağlanır. Ancak hasar bölgesinde anormal sinaps oluşumunu engellediği düşünüldüğünde yararlı ve zararlı etkilere sahip olduğu düşünülmüştür (Kim ve ark. 2017). Spinal kord hasarından sonra sitotoksik ödemi takiben saatler ile günler içinde nekrotik hücre ölümü oluşur. Gecikmiş astrositik yanıt subakut fazda başlar. Lezyonun çevresindeki hipertrofik ve proliferatif hale gelen astrositler, astrositik ara filaman glial fibriller asidik protein ekspresyonunda önemli bir artış gösterir (Rowland ve ark. 2008). Makrofajların interlökin-1 gibi sitokinleri salgıladığına dair kanıtlar bulunduğu için bu yangısel süreçler büyük önem taşımaktadır (Tator 1995). Travmadan günler sonra nekrotik alanların yerinde “Lückenfelder” denilen kistik alanlar oluşur. Bununla birlikte wallerian dejenerasyonu, nörofaji ve kromatolizis gibi patolojik değişiklikler de oluşabilir (Güzel ve ark. 2006). Subakut dönemin önemi ileride hücre kökenli tedavi stratejilerinin en çok uygulanacağı periyod olmasıdır. Çünkü yapılan bir çalışmada travmadan iki hafta sonra sinir öncül hücrelerinin transplantasyonunun, remyelinizasyonu ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediği görülmüştür (Rowland ve ark. 2008).

2.5.2.3. Kronik Faz Patolojisi

Kronik faz ilgili bir tartışma olmasına rağmen yaralanmadan yaklaşık 6 ay sonra başlayan ve hastanın hayatı boyunca devam eden bir süreç olduğu kabul edilmektedir (Rowland ve ark. 2008, Kim ve ark. 2017). Kronik evresinin en karakteristik özelliği skar oluşumu ve bir syrinks gelişimidir. Bu aşamada yapılan, terapötik stratejiler, farmakolojik önlemler veya hücre transplantasyon tedavileri zarar görmüş aksonların rejenerasyonunu ve remiyelinizasyonunu artırmaya yöneliktir (Kim ve ark. 2017). Travmadan haftalar sonra lezyonlu bölgenin önünde ve arkasında dejeneratif ve rejeneratif değişiklikler şekillenir. Polimorfonükleer lökositlerin yerini makrofajlar almıştır (Güzel ve ark. 2006). Astrositik ve fibrotik yapılı bir skar dokusu şekillenirken (Rowland ve ark. 2008) arka köklerde nöromalar oluşur (Tator 1995). Spinal kord hasarı olan hastaların % 30'unda (Rowland ve ark. 2008) posttravmatik siringomiyeli gelişir (Tator 1995, Güzel ve ark. 2006, Rowland ve ark. 2008). Spinal kord hasarı sonrası lezyon bölgesinde ortaya çıkan kistik boşluklar ve miyelomalazi nekrotik ölümün bir ispatıdır (Rowland ve ark. 2008). Bununla beraber yine wallerian dejenerasyonu, araknoidit, gliozis ve atrofi şekillenebilir (Tator 1995, Güzel ve ark. 2006). İleriki dönemlerde nörolojik fonksiyonlarda iyileşme olmasına rağmen 1-2 yıllık süreçte nörolojik sekeller kaldığı söylenmiştir. Subakut dönemde tedavi amaçlı kök hücre uygulandığında başarı elde edilmesine rağmen kronik dönemde uygulandığında başarı sağlanamamıştır (Rowland ve ark. 2008). Kim ve ark. (2017) spinal kord hasarı sonrası oluşan fazları Şekil 2. 5. 2. 3. 1'de özetlemişlerdir.



Şekil 2. 5. 2. 3. 1. Spinal kord hasarı sonrası şekillenen fazlar (Kim ve ark. 2017)

2.6. Spinal Kord Yaralanmasında Modern Farmakolojik Ve Terapötik Yaklaşımlar

Akut omurilik hasarının en uygun tedavisi ve yönetimi ile ilgili önemli tartışmalar mevcuttur (Olby 1999). Bununla birlikte medikal ve cerrahi anlamda çok ileri gelişmeler olmasına rağmen tedavi edilemez bir durum olarak kabul edilmiştir (Kim ve ark. 2017). Omurilik yaralanmalarında kordun cerrahi dekompresyonu, yeniden restorasyonu, omurganın stabilizasyonu (Olby 1999) ile birlikte psikolojik, ürolojik ve proktolojik problemlerin yönetimi büyük önem taşımaktadır (Khoshnevisan ve ark. 2010). Cerrahi dekompresyon, progresif ödem ve kanamanın oluşturduğu mekanik baskıyı ortadan kaldırmak için travma sonrası takip eden ilk 24 saat içinde planlanmalıdır (Rouanet ve ark. 2017). İkincil yaralanmanın önüne geçebilmek için farmakolojik müdahaleler, hücre tedavisi, inhibitör proteinlerin nötrleştirilmesi ve gen terapisi gibi çeşitli girişimler

yapılmıştır (Khoshnevisan ve ark. 2010). Nöroprotektif ajanlar sekonder hasarı önlemek için kullanılırken, nörorejeneratif terapiler hasar oluşuktan sonra aksonal onarımı teşvik etmek için uygulanır (Kim ve ark. 2017, Rouanet ve ark. 2017).

Günümüzde spinal kord hasarının tedavisinde, ikincil hasarın önlenmesi, sağlam kalan aksonların rejenerasyonu, sağlam kalan nöral dokunun fonksiyonel hale gelmesi, harap olan sinir dokusunun yerine yenisinin koyulması ve bunların kombinasyonunu içeren tedavi stratejileri başlıkları altında değerlendirme yapmak gerekmektedir (Can ve Beşaltı 2016).

Spinal kord hasarı sonrası hasarı önlemede ya da azaltmada metilprednizolon, eritropoetin, Rho inhibitörleri, kalpain inhibitörü, minosiklin, gangsiyozidler, nalokson gibi opiyat blokerleri, tirotropin salıcı hormon (TSH), gasiklidin, siklosporin-A, polietilen glikol (Baptiste ve Fehlings 2006), nimodipin, diltiazem ve nifedipine gibi kalsiyum kanal blokerleri (Can ve Beşaltı 2016), meksiletin, magnezyum, melatonin, infliximab, clotrimazol, lamotrigin, hiperbarik oksijen, gabapentin, pregabalin (Durdağ ve ark. 2013), atorvastatin, omega-3, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA), fenretinide, progesteron, östrojen, inozin, fingolimod, kondroitinaz ABC, cAMP-Rolipram, sialidaz, Scutellaria baicalensis, riluzole ve fenitoin gibi sodyum kanal blokerleri, folik asit, pioglitazone, Anti-CD11d integrin antikoru, Nigella sativa ve hidralazin gibi çeşitli farmakolojik ajanlar araştırılmıştır (Khoshnevisan ve ark. 2010).

Akut omurilik yaralanmasında 30 yılı aşkın süredir kullanılan kortikosteroidlerin nöroprotektif etki mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır, ancak lipid peroksidasyonu inhibisyonu, antiinflamatuvar etkinliği, kalsiyum akışını ve birikmesini engellediği, bağışıklık hücrelerinin aktivasyonunda rol aldığı savunulmuştur (Kemerdere 2015). Spinal kord hasarının tedavisinde en kapsamlı olarak araştırılan farmakolojik ajan, bir glukokortikoid olan metilprednizolon sodyum süksinat'tır (MPSS) (Kemerdere 2015, Kim ve ark. 2017). Günümüzde spinal kord hasarında, metilprednizolon yaygın olarak kullanılmaktadır ve travmayı takiben ilk 8 saat içinde uygulandığında en etkili tedavi seçeneği gibi görünmesine rağmen sonuçları tartışmalıdır (Polat ve ark. 2012). Yapılan deneysel bir çalışmada antioksidan etkisi ile birlikte TNF-alfa, İL-1 beta ve İL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunun azaltıldığı gösterilmiştir. 1984'ten bu yana MPSS ile ilgili üç büyük klinik çalışma yapılmıştır (Kim ve ark. 2017). MPSS ile

yapılan ilk klinik çalışmada, iki gruba ayrılmış omurilik hasarı olan hastalara sırayla 100 mg ve 1000 mg damar içi yükleme dozu takiben her 6 saatte bir 25 mg ve 250 mg damar içi MPSS devam edilmiştir. Sonuç olarak yüksek doz MPSS uygulanan grup ile düşük doz MPSS uygulanan grup arasında bir üstünlük olmadığı ortaya konmuştur (Baptiste ve Fehlings, 2006; Rouanet ve ark. 2017). Daha sonraki zamanlarda yapılan çalışmalarda koruyucu amaçla yapılan etkin dozun çok daha yüksek olduğu ve ilk bir saat 30 mg/kg/saat dozunda, izleyen 23 saatte 5.4 mg/kg/saat dozunda ve travmayı takip eden ilk 8 saat içinde yapılması gerektiği söylenmiştir (Rouanet ve ark. 2017), ancak faydalı etkileri olmasına rağmen evrensel olarak kabul edilmemiştir (Baptiste ve Fehlings 2006). Yakın zamanda yapılan sinir cerrahları kongresinde (The Congress of Neurological Surgeons) ise MPSS'in yararlı etkilerinin ikna edici olmadığı ve bununla birlikte akut spinal kord hasarı oluşumunda MPSS'in zararlı yan etkileri, önemli klinik kanıtlarla ortaya konduğundan, akut spinal kord hasarının tedavisinde MPSS kullanımının önerilmediği belirtilmiştir (Kim ve ark. 2017).

21-aminoasitler (Lazaroidler), sentetik glukokortikoid reseptörleridir ve glukokortikoid reseptörlerini aktive etmeksizin lipid peroksidasyonunu inhibe edebilirler (Baptiste ve Fehlings 2006). 21-aminositlerden olan tirilazad mesilat'ın (TM), nöroprotektif özelliği, endojen vitamin E'nin korunması ve demir bağımlı lipid peroksidasyonunun inhibisyonu yoluyla membran stabilizasyonu gibi üç önemli özelliği vardır (Baptiste ve Fehlings 2006). TM'nin, 24 saatlik süreçte MPSS ile karşılaştırıldığında gruplar arası bir fark bulunmamış ve MPSS kadar etkili olduğu görülmüştür (Baptiste ve Fehlings 2006, Rouanet ve ark. 2017). Tavşan omuriliğinde spinal kord hasarı sonrasında spinal perfüzyonu korumak amaçlı BOS drenajı ile birlikte 21-aminosteroid tirilazad kombinasyonu uygulanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Rouanet ve ark. 2017). Ancak köpeklerde yapılan bir çalışmada iyileşmede bir ilerleme gösterilememesi nedeniyle veteriner hekimlikte kullanımının sınırlı olacağı düşünülmüştür (Can ve Beşaltı 2016).

Tirotropin Salıcı Hormon (TRH), ratlar ve kedilerde yapılan deneysel çalışmalarda omurilik kan akımını arttırdığı ve fonksiyonel iyileşmeye katkı sağladığı bildirilmiştir (Can ve Beşaltı 2016).

Son yıllarda spinal kord hasarında mannitol'ün etkinliği ile ilgili çalışma oldukça nadirdir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada spinal kord hasarı oluşturulmuş ve 2 gr/kg % 20'lik mannitol verilmiştir. Bunun sonucunda nöral dokularda belirgin bir düzelme sağlanırken koruyucu etkisi de gözlenmiştir. Daha eski bir çalışmada ise spinal kord hasarında mannitol'ün perfüzyon üzerinde olumlu etkileri görülmüş ancak nöroprotektif etkisi gösterilememiştir. Mannitol'ün spinal kord hasarındaki yararı beyin travmasındaki yararı ile benzerdir (Mortazavi ve ark. 2015).

Sitokinlerden olan İL-10 önemli bir antiinflamatuvar özelliğe sahiptir (Tanrıverdi 2015). Yapılan bir spinal kord hasarı modelinde travma sonrası damar içi İL-10 uygulanmış ve hem inflamasyonu azalttığı hem de sinir üzerine koruyucu etkisinin olduğu ortaya konmuştur (Yılmaz ve ark. 2014). Yine Bethea ve ark. (1999), ratlar üzerinde yaptıkları deneysel bir çalışmada akut dönemde kullanılan İL-10'un omurilikte aktifleştirilmiş makrofajlardaki TNF- α sentezini azalttığını, nöroprotektif olduğunu ve fonksiyonel iyileşmeyi olumlu yönde arttırdığını söylemişlerdir (Bethea ve ark. 1999).

Deneysel omurilik hasarında kullanılan Anti-Cd11d antikoru, antiinflamatuvar etki, lipid peroksidasyonu inhibisyonu ve doku perfüzyonunu korumasının yanında motor iyileşmeye de katkı sağlamıştır, ancak klinik çalışma yapılması gerekmektedir (Kemerdere 2015).

Spinal kord hasarını takiben hücre içine kalsiyum girişi, eksitotoksositeye bağlı olarak hücre ölümüne neden olur (Kim ve ark. 2017). L-tipi kalsiyum kanalı blokeri olan Nimodipin, kalsiyum bağımlı apoptotik enzimleri önlemek ve presinaptik glutamat salınımını engellemek amacıyla kullanılmıştır (Kim ve ark. 2017, Rouanet ve ark. 2017). Deneysel omurilik travması oluşturulup nimodipinin kullanıldığı çalışmalarda, omuriliğin kan akışını artırarak, hipoperfüzyonu geri çevirdiği izlenmiştir (Kemerdere 2015, Can ve Beşaltı 2016). Bununla birlikte, bir yıllık süreçte plasebo grubu ile karşılaştırıldığında nörolojik durumları arasında bir fark görülmemiştir (Kim ve ark. 2017, Rouanet ve ark. 2017). Nifedipin ve diltiazem kedilerde yapılan deneysel bir çalışmada travmadan 30 dakika önce verilmiş omurilik kan akımını arttırmasına rağmen fonksiyonel bir iyileşme sağlamamıştır (Can ve Beşaltı 2016).

Normal omurilik dokusunda bulunmayan ancak yaralanmış omurilik nöronlarının ve oligodentrositlerin eksprese ettiği Ghrelin, spinal kod hasarı sonrasında mitokondriyal sitokrom-C'nin salınımını, apoptotik hücre ölümünü ve kaspaz-3'ün aktivasyonunu belirgin şekilde durdurur. Ghrelin'in fonksiyonel iyileşmeyi önemli ölçüde sağlayarak lezyon hacminin boyutunu küçülttüğü ve akson ile miyelin kaybını azalttığı görülmüştür (Khoshnevisan ve ark. 2010).

Bir nonspesifik opioid antagonisti olan naloksanın inkomplet hasarlı hastalarda motor ve duyuusal iyileşmeye katkı sağladığı savunulmuş ancak omurilik travmalarındaki etkisi kesinlik kazanmamıştır (Kemerdere 2015). Naloksan, MPSS ve plasebo ile karşılaştırılmış ancak gruplar arasında motor skorlarında herhangi bir fark görülmemiştir (Rouanet ve ark. 2017). İnsanlarda yapılan faz 2 klinik çalışmalarında etkisi bulunamadığı için akut omurilik hasarında kullanımı önerilmemektedir (Can ve Beşaltı 2016).

Bir potasyum kanal blokeri olan fampridine, kronik omurilik hasarlı hastalarda düşük doz kullanılmış ve hastaların skorlarında ve spastisitede iyileşme görülmüştür, bununla birlikte yüksek doz kullanılan hastalarda spazm, hipertoni, uykusuzluk ve baş dönmesi gibi semptomlar gözlemlendiğinden yüksek doz kullanımı önerilmemiştir (Kim ve ark. 2017).

Gangliozitler, sinir sistemindeki nöronal membranların dış yüzünde yüksek oranda bulunan glikolipid molekülleridir (Kemerdere 2015). Nöritlerin dış tarafa doğru büyümesi, plastisitenin arttırılması (Kemerdere 2015), apoptozu önleme ve anti-eksitotoksosite gibi nöroprotektif etkileri yanında aksonal rejenerasyonu da sağladıkları gösterilmiştir (Rouanet ve ark. 2017). Ancak metilprednizolon'un etkisini antagonize ettiği söylenmiştir (Olby 1999). Gangliozitlerin klinik çalışmaları 1990'lı yıllardan 2000'li yılların başlarına kadar gerçekleştirilmiştir ve motor fonksiyonlar ile bağırsak/mesane fonksiyonlarında iyileşmenin hızlandığı görülmüştür ancak, son on yılda bu sonuçları doğrulamak veya çürütmek için başka bir çalışma yapılmamıştır (Kim ve ark. 2017). Yapılan randomize bir çalışmada gangliosit bileşiklerinin kullanıldığı hastalarda 6 aylık takip sonrası herhangi bir nörolojik düzelme olmamıştır. Bu nedenle artık tavsiye edilmemektedir (Rouanet ve ark. 2017).

N-metil-D-aspartik asit (NMDA, bir glutamat reseptörü) reseptörünün antagonistleri olan MK801 ve gasiklidin (GK11)'in, omurilik hasarı oluşturulan deneysel çalışmalarda nöroprotektif özellikleri gösterilmiştir, bununla beraber gasiklidin ile insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda fayda sağlamadığı gözlenmiştir (Kemerdere 2015). Ancak maksimum yarar sağlamak için travmayı takiben ilk 30 dakika içinde ilacın uygulanması gerektiğinden veteriner hekimlikte kullanım alanı bulamamıştır (Can ve Beşaltı 2016). Diğer bir çalışmada ise yine NMDA reseptör antagonisti olan magnezyum sülfat ve kaspaz-9 inhibitörü olan z-LEHDFMK kullanılmış ve kombine kullanımlarında olumlu sonuçlar alınmıştır ancak daha ileri çalışmalara gerek olduğu vurgulanmıştır (Sencer ve ark. 2013).

Deneysel yapılan bir çalışmada periferik olarak uygulan eritropoetin (EPO)'in, nevrojenez ve nöronal farklılaşma üzerine olumlu etkileri ile birlikte, nöroprotektif, antiinflamatuvar, antioksidan ve nörotrofik faktörlerin indüksiyonu gibi etkileri vardır. Ancak hematopoietik aktivitenin aşırı uyarılması sonucu tromboz olasılığı öne sürüldüğünden klinik çalışmalara aktarılma konusunda kaygılar taşımaktadır (Kim ve ark. 2017).

Riluzol, bir sodyum kanal blokeridir ve omurilik hasarının klinik öncesi modellerinde glutamat salınımını azaltarak ve sodyum kanallarının patolojik aktivasyonunu bloke ederek sekonder hasarı azaltır (Rouanet ve ark. 2017). Ratlarda yapılan deneysel bir çalışmada omurilik klip kompresyonu ile hasar oluşturulmuştur. Riluzol, nöroprotektif etkisi ile lokomotor fonksiyonda da iyileşme sağlamıştır (Kemerdere 2015). Faz I/II çalışması sonucu motor fonksiyonlarda gelişme görülmüştür bununla birlikte faz II/III çalışması 2018 yılında tamamlanacaktır (Rouanet ve ark. 2017).

Lipid çözünürlüğü en yüksek olduğu için kan beyin bariyerini en fazla geçen antibiyotik tetrasiklin grubundan minosiklin'dir (Kim ve ark. 2017). TNF- α , İL-1 β , siklooksijenaz-2 ve nitrik oksit sentaz inhibisyonu da dahil olmak üzere antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Preklinik modellerde, lezyon boyutlarını küçülttüğü ve nöron kaybını azalttığı görülmüştür. Faz II çalışmasında motor bir düzelme görülen hastalarda 2018 yılına kadar faz III çalışması planlanmıştır (Rouanet ve ark. 2017). Ancak henüz klinik çalışma yapılmamıştır (Can ve Beşaltı 2016).

Sistemik sürfektant kullanımı hasar gören zarların onarılmasında diğer bir terapötik stratejidir. Polietil glikol etkisini, nöronların zarlarındaki hasarlı bölgeleri doğrudan kapatarak gösterir. Köpeklerde damar içi kullanımlarda güvenlidir. Fonksiyonel iyileşmeye katkı sağlar aynı zamanda son zamanlarda omurilik hasarının tedavisinde kök hücreler için bir yapı iskelesi olarak düşünülebilir (Can ve Beşaltı 2016). Spinal kord hasarında şimdiye kadar birçok farmakolojik ajan denenmiş olmasına rağmen klinik vakalarda olumlu sonuçlar alınamamıştır ve klinik çalışmalarda yararları gösterilememiştir (Polat ve ark. 2012). Son zamanda kök hücre ve diğer hücre tiplerinin omuriliğe nakli ile ilgili yapılan çalışmaların sonuçları ümit vericidir (Can ve Beşaltı 2016). Erken araştırmalarda embriyonik kök hücreler (ESC) kullanmıştır, ancak etik kaygılar ve sınırlı kaynaklardan dolayı, herhangi bir somatik hücreden türetilen, uyarılmış pluripotent kök hücrelere (iPSC) doğru yönelinmiştir. ESC'lerde erken yaşlanma ve tutulan epigenetik hafıza da dahil olmak üzere bazı beklenmedik zorluklar ortaya çıkarken, iPSC'lerde ileriye doğru ilerleyen önemli bir terapötik yaklaşım olmaya devam etmektedir. Son 30 yılda yapılan çok sayıdaki hayvan çalışmalarında, bir dizi nakledilen hücre tipinin yararlı etkilerini gösterilmiştir (Ahuja ve ark. 2017). Kök hücrelerden türetilmiş çok kutuplu nöral prekürsör hücreler (NPC), merkezi sinir sistemine özgü nöronları, oligodendrositleri ve astrositleri ayırt edebilmektedir, dolayısıyla umut vericidir. Mezenkimal kök hücreler (MSC) miyositlere, osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşarak bağ dokuları tamir edebilen çok hücreli hücrelerdir. Periferik sinir sisteminde görülen güçlü rejenerasyonun büyük ölçüde Schwann hücreleri tarafından sağlandığı düşünülmektedir. Spinal kord hasarlı hayvan modellerinde, merkezi sinir sistemine nakledilen periferik schwann hücrelerinin aksonları remiyelinleştirdiği, kistik kavitasyonu azalttığı ve iyileşmeyi artırdığı bulunmuştur. Olfaktör koruyucu hücrelerin, brakial pleksus avülziyon yaralanmalarından sonra proprioepsiyon duyusunu önemli ölçüde iyileştirmiş ve dorsal köklerde rejenerasyonu indüklediği gösterilmiştir (Ahuja ve ark. 2017).

Nöroprotektif amaçlı kullanılan minosiklin, eritropoetin (Polat ve ark. 2012) ve siklosporin'den ise umut verici sonuçlar alınmıştır (Kemerdere 2015). Bunlarla beraber omurilik travması olan hastalarda medikal ve hücrenel olarak yapılan çalışmalarla beraber fizik tedavi ve rehabilitasyonun öneminin de unutulmaması gerekmektedir (Can ve Beşaltı 2016).

2.7. Hesperidin

Flavonoidler, 1930 yılında portakaldan izole edilmiş ve P vitamini olarak adlandırılmıştır (Garg ve ark. 2001, Kumar ve Pandey 2013). Bu güne kadar 8000'den fazla çeşit flavonoid tanımlanmış ve sayısı giderek de artmaktadır. Flavonoidlerin biyoaktivitesiyle ilgili, 1936 yılından başlayarak yapıları ve öncelikle antioksidatif aktivitelerine bağlı özellikleri hakkında çok sayıda literatür verileri yayınlanmıştır (Kuntic ve ark. 2014). Fenolik bileşiklerin en yaygın grupları olup, özellikle de fotosentez yapan bitki hücrelerinde ortaya çıkmaktadır (Kumar ve Pandey 2013).

Flavonoidler, benzo- γ -piron yapısına sahip ve bitkilerde her zaman bulunan polifenolik bileşiklerin büyük bir grubundan oluşan fenilpropanoid yol ile sentezlenen ve bitkilerin mikrobiyal enfeksiyonlara karşı ürettikleri hidroksillenmiş fenolik maddeler olduğu bilinmektedir (Garg ve ark. 2001). Kimyasal olarak flavonoidler, bir heterosiklik pik halkası vasıtasıyla bağlanan iki benzen halkasından oluşan on beş karbon iskeletine dayanır (Guo ve ark. 2014). Flavonoidler, aglikonlar, metillenmiş türevler ve glikozitler olarak ortaya çıkarlar ancak temel flavonoid yapı aglikon'dur (Garg ve ark. 2001, Kumar ve Pandey 2013). Bunlar, hem serbest halde hem de glikozitler olarak bulunabilen aktif bileşiklerdir (Garg ve ark. 2001). Flavonoidler mezofil hücrelerinin çekirdeğinde bulunur (Kumar ve Pandey 2013).

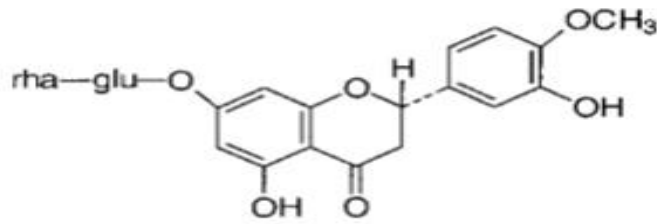
Flavonoidlere olan ilgi belirgin antioksidan özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Cao ve ark. 1997, Wilmsen ve ark. 2005, Kuntic ve ark. 2014, Celik ve ark. 2016). Antioksidan etkilerini metal iyonlarını şelatlayarak (Kuntic ve ark. 2014) ve serbest radikalleri ortadan kaldırarak gösterirler (Balakrishnan ve Menon 2007, Kumar ve Pandey 2013). Bazı araştırmacılar, hesperidinin elektron transferinde süperoksit iyonlarını ve in vitro olarak uyumlu proton transfer reaksiyonunu azalttığını bildirmişlerdir. Yine hesperidinin UV (ultraviyole) ışınlamayla indüklenen peroksidasyondan lipozomları korumada ve muhtemelen UV radyasyonu ile üretilen oksijensiz radikalleri uzaklaştırarak etkili olduğunu bulmuşlardır (Kuntic ve ark. 2014).

Doğal kaynaklardan ilaç üretmek için önemli bir eğilim vardır. Özellikle portakal kabuğu gibi meyve artığı, ucuz olduğundan farmasötik maddeler için ilgi çekici bir kaynaktır. Turunçgil kabuğu, fenolik ve C vitamini yönünden zengindir (Al-Ashaal HA

ve El-Sheltawy 2011). Flavonoidler insanlarda koruyucu enzim sistemlerini aktive ederek birçok enfeksiyöz hastalıkta, kardiyovasküler hastalıklarda (Wilmsen ve ark. 2005, Guo ve ark. 2014), kanserlerde (Wilmsen ve ark. 2005, Balakrishnan ve Menon 2007, Guo ve ark. 2014) ve dejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri olduğunu söylenmiştir (Kumar ve Pandey 2013). Bununla beraber antinflamatuar, analjezik, sedatif (Carballo-Villalobos ve ark. 2016), hipolipidemik (Kalpana ve ark. 2009), antidepresan, hipoglisemik, hiperkolesterolemik, hepatoprotektif, hiyalüronidaz inhibisyonu (Duganath ve ark. 2014), antiatherojenik (Visnagri ve ark. 2014), antimikrobiyal, antiplatelet, antiradikal, antimutajenik (Guo ve ark. 2014), antiviral, antifungal (Kaur ve ark. 2006), antiülser (Suarez ve ark. 1998), nöroprotektif (Hwang ve Yen 2008), antialerjik, antihipertansif (Ciftci ve ark. 2015), vazodilatatör (Wilmsen ve ark. 2005), antilipoperoksidan, antiiskemik (Cao ve ark. 1997), kemik kaybını önleme (Xiong ve ark. 2016), antihemoroidal (Alam ve ark. 2014), antidiyabetik, antiproliferatif, antitrombotik, antitiroidojenik, östrojenik, böcek öldürücü ve antioksidan aktiviteler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir (Orhan ve ark. 2010). Ayrıca, lipoksijenaz, siklooksijenaz, monooksijenaz, fosfolipaz-A2 (Çimen 1999), ksantin oksidaz, mitokondrial süksinoksidaz, NADH-oksidad ve protein kinazları da içine alan birçok enzim aktivitesini inhibe ettiği de bildirilmiştir (Cao ve ark. 1997). Biyolojik aktivitelerinin geniş yelpazeli olması dolayısıyla bioflavonoid olarak isimlendirilmişlerdir. Bu bioflavonoidler içerisinde hesperidin, citrin, rutin, flavonlar, flavonollar, catechin and quercetin bulunur (Garg ve ark. 2001).

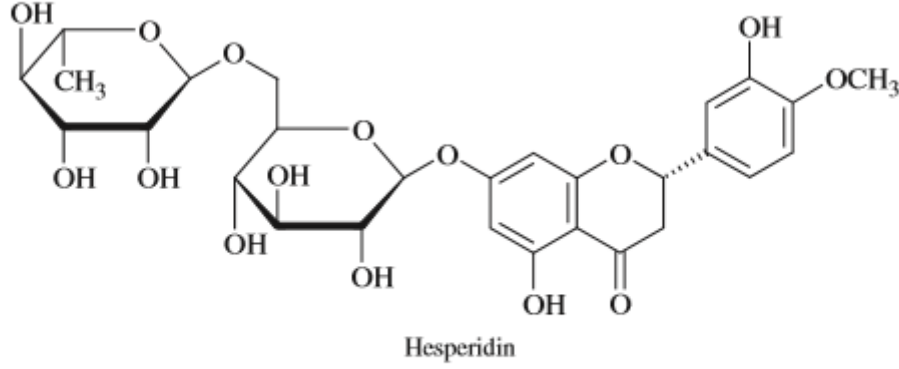
Hesperidin, saf olarak elde edilemediği için yakın takibe alınmıştır (Garg ve ark. 2001). Hastalıkların önlenmesi ve tedavisi aşamasında son zamanlarda büyük önem kazandığı vurgulanmaktadır (Park ve ark. 2008). Hesperidin molekül olarak, bu kadar geniş yelpazede etkileri olmasına rağmen bir hastalığın tedavisinde kullanılmamaktadır ancak, hesperidinin sentetik analogları yapılmıştır (Duganath ve ark. 2014). Hesperidin flavanon tipi bir flavonoid'tir. Bir flavonoid olan hesperidin, hesperitin ve disakarit rutinozdan oluşur (Kalpana ve ark. 2009). Hesperidin, hesperetin bir β -7-rutinosididir (Banji ve ark. 2014). Kimyasal olarak ise 3, 5, 7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside'tir (Banji ve ark. 2014, Subramanian ve ark. 2015). Saf hesperidin, bronz veya sarı renkli uzun saç benzeri yapılardan oluşur ve erime noktası 258-262 C° arasındadır (Garg ve ark. 2001). Tatsız ve kokusuz olan hesperidinin moleküler formülü

C₁₈H₃₄O₁₅ ve moleküler ağırlığı 610.57 daltonudur. Suda çözünürlüğü düşük olan katı bir maddedir (Kalpana ve ark. 2009). Seyreltik alkali ve piridin içinde berrak-sarı renkte kolaylıkla çözünür iken, metanolde daha az çözündüğü görülür, bununla beraber aseton, benzen ve kloroformda hemen hemen hiç çözünmez. Suda çözünürlüğü de 50'de 1'dir. Hesperidin, saf bir halde elde edilmesi zor olan bir özelliğe sahiptir. Ancak sıcak su ile yıkandıktan sonra %95'lik metil alkol ile özütlenir ve kristalleştirilirse saflaştırılabilir (Garg ve ark. 2001). Hesperidin, ucuz ve kolay bulunabilir olması yanında turuncgillerden özellikle tatlı portakal ve limonda bulunan majör flavonoid'tir (Kaur ve ark. 2006, Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Bu meyvelerin kabuklarında ve zarlarında bol miktarda bulunur, bu nedenle flavonoid açısından bakıldığında meyve özütü içeren portakal suları, içermeyenlerden daha zengindir (Kalpana ve ark. 2009). Henüz olgunlaşmamış portakallarda meyvenin ağırlığının yaklaşık % 14 kadarını oluşturabilir ve genellikle C vitamini ile birlikte bulunurlar (Garg ve ark. 2001). Hesperidin, turuncu *Citrus aurantium* L., *C. sinensis*, *C. unshiu* ve *Citrus* cinsinin diğer türlerinin atılmış kabuklarından büyük oranda izole edilir (Visnagri ve ark. 2014). Fabaceae, Betulaceae, Lamiaceae ve Papilionaceae cinslerinde olduğu gibi Narenciye dışındaki birçok bitkide ortaya çıktığı bildirilmiştir. Hesperidin, aynı zamanda *Acanthopanax setchuenensis*'in (Araliaceae familyası) köklerinden de izole edilmiştir (Garg ve ark. 2001). Hesperidin'in formülasyonu ve yapısı sırasıyla Şekil 2. 7. 1. ve Şekil 2. 7. 2.'de verilmiştir.



Hesperidin (hesperetin-7-rhamnoglucoside)

Şekil 2. 7. 1. Hesperidin'in formülasyonu (Garg ve ark., 2001)



Şekil 2. 7. 2. Hesperidin'in yapısı (Park ve ark. 2008)

Flavonoidler, flavonlar, flavanoller, izoflavonlar, flavanoller, flavanonlar ve flavanonoller olarak alt gruplara ayrılır. Hesperidin ise, turuncgiller ve sebzelerde yaygın olarak bulunan bir flavanon glikozittir (Yumnam ve ark. 2014).

Hesperidin, hamilelik döneminde bile kullanılabilen son derece güvenli ve yan etkileri olmayan bir bioflavonoid'tir (Garg ve ark. 2001). Fosforile edilmiş hesperidin organizmaya ve dokulara toksik değildir, kolay asimile edilir ve alerjik reaksiyonlara neden olmaz (Wilmsen ve ark. 2005). Başka bir kaynakta ise zararlı olabileceği ancak bu etkisinin antioksidan etkisinden ziyade prooksidan etkisinden kaynaklanabileceği söylenmiştir (Cao ve ark. 1997). Hesperidin, gıda maddeleri veya ilaçlarla birlikte kullanıldığında yaygın bir etkileşim bildirilmemiştir (Garg ve ark. 2001). Hesperidin, oral yoldan alındığında bağırsak sisteminden emilir ve böbrekler aracılığıyla extrete edilir (Çimen 1999, Garg ve ark. 2001). Ratlarda yapılan deneysel çalışmalarda flavonoidlerin sadece %20'sinin gastrointestinal sistemden absorbe edildiği gösterilmiştir. Hesperidin'in, glikozid halinde veya glikozid bağlarının kırılarak aglikon halde absorbe edildiğine dair bilgilere ulaşılmıştır. Hesperidin, iştirildikten 2 saat sonra plazma düzeyinin pik yaptığı gözlenmiştir (Çimen 1999). Oral yolla alındığında emilim diyete bağlıdır (Garg ve ark. 2001). Hesperidin ağız yoluyla alındığında, bağırsak mikroflorası ile hidrolize edilerek aktif bir metabolit elde edilir (Agrawal ve ark. 2014). Hesperidin, tedavi programları düzenlenirken destek tedavi olarak kullanılabilir (Kaur ve

ark. 2006). Hesperidin, belirgin antiinflamatuvar ve analjezik etkilere sahiptir ve yetersizliğinde anormal kapillar sızıntı, ekstremitelerde ağrı, zayıflık ve gece krampları görülebilir, ek olarak hesperidin alındığında ise ödem ve aşırı şişkinlik gibi durumlarda azalma görülmüştür (Garg ve ark. 2001, Tirkey ve ark. 2005, Kaur ve ark. 2006). Ünlü macar bir araştırmacı olan Dr. Albert Szent-Gyorgi ise flavonoidlerin, skorbüt ile ilişkili kapiller frajilitede biyolojik aktivitesi olduğunu ve kapiller kanamayı önlemede de etkili olduğunu bulmuştur (Garg ve ark. 2001). Ucuz ve kolay ulaşılabilir olması yanında nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlara karşı duyarlılığı olan bireylerde de kullanılabilir farmakolojik bir ajan olabileceği söylenmiştir. Merkezi faaliyetlerini, GABAerjik, opioidlerjik ve serotonerjik reseptörler ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca ratlar üzerinde yapılan bir deneyde sisplatinin beyin ve siyatik sinir üzerine olan yan etkilerine karşı koruyucu bir etki gösterdiği gözlenmiştir (Carballo-Villalobos ve ark. 2016). Portakal ve mandalina suyu ile içirilerek tedavi edilen kolon ve akciğer kanserli sıçanlarda sırasıyla %22 ve %29 oranında azalma görülmüştür ve bu durum meyve sularında yüksek oranda bulunan hesperidine bağlanmıştır (Wilmsen ve ark. 2005). Yine pankreas kanserlerinde de kanserli hücreleri azalttığı bildirilmiştir (Ghorbani ve ark. 2012). Aterosklerozlu hamsterlar üzerinde yapılan bir çalışmada ise aterosklerozu inhibe ettiği ve kolesterol ile trigliseriti düşürdüğü görülmüştür (Wilmsen ve ark. 2005). Ayrıca, tip 2 diyabet oluşturulan sıçanlarda hesperidin kullanılmış ve diyabetik nefropati ve kardiyomyopatiye etkili olduğu bulunmuştur (Visnagri ve ark. 2014). Xiong ve arkadaşları (2016) ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada hesperidin'in postoperatif ileus üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve toksik olmayan bu maddenin önemli rol oynayabileceğini öne sürmüşlerdir (Xiong ve ark. 2016). Eğer hesperidin diğer flavonoidlerdeki gibi C vitamini ile birlikte alınırsa sonuç daha iyi olacaktır (Garg ve ark. 2001). Dünya çapında sitrik asit kullanımının yaygınlığı düşünüldüğünde hesperidin'in antioksidan özelliği daha da ön plana çıkmaktadır (Wilmsen ve ark. 2005).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Mustafa Kemal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nden 31.10.2016 tarih ve 2016/9-7 karar numarası ile onay alınmıştır. Çalışma, Mustafa Kemal Üniversitesi, Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapıldı. Çalışmada, 250-300 g ağırlığında ve ortalama ağırlıkları 277 g olan 64 adet Wistar albino erkek rat kullanıldı, rastgele 8 gruba ayrıldı (n:8). Ratlar, laboratuvar koşullarında 12 saat gece, 12 saat gündüz olacak şekilde türe özel pelet yem ile adlibitum olarak beslendi. Çalışmamızın biyokimyasal analizleri Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı'nda, histopatolojik ve immunohistokimyasal analizleri ise Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma ve Uygulama Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. Gruplar

Grup I; kontrol grubu: bu gruptaki deney hayvanlarına herhangi bir işlem uygulanmadı ve hesperidin verilmedi, birinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra doku örnekleri alındı.

Grup II; kontrol grubu: bu gruptaki deney hayvanlarına herhangi bir işlem uygulanmadı ve hesperidin verilmedi, yedinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra doku örnekleri alındı.

Grup III; sham grubu: bu gruptaki deney hayvanlarına hesperidin verilmedi travma sonrası birinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

Grup IV; sham grubu: bu gruptaki deney hayvanlarına hesperidin verilmedi travma sonrası yedinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

Grup V; ön koşullama grubu, travma öncesi 7 gün 200 mg/kg/gün PO hesperidin verildi ve travma sonrası birinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

Grup VI; ön koşullama grubu, travma öncesi 7 gün 200 mg/kg/gün PO hesperidin verildi ve travma sonrası 7 gün 200 mg/kg/gün PO hesperidin devam edildi ve yedinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

Grup VII (tedavi grubu); Travma sonrası 200 mg/kg PO hesperidin verildi birinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

Grup VIII (tedavi grubu); Travma sonrası 7 gün 200 mg/kg/gün PO hesperidin verildi, yedinci günde anestezi altında analizler için intrakardiyak kan alındı ve sakrifiye edildikten sonra travma bölgesinden doku örnekleri alındı.

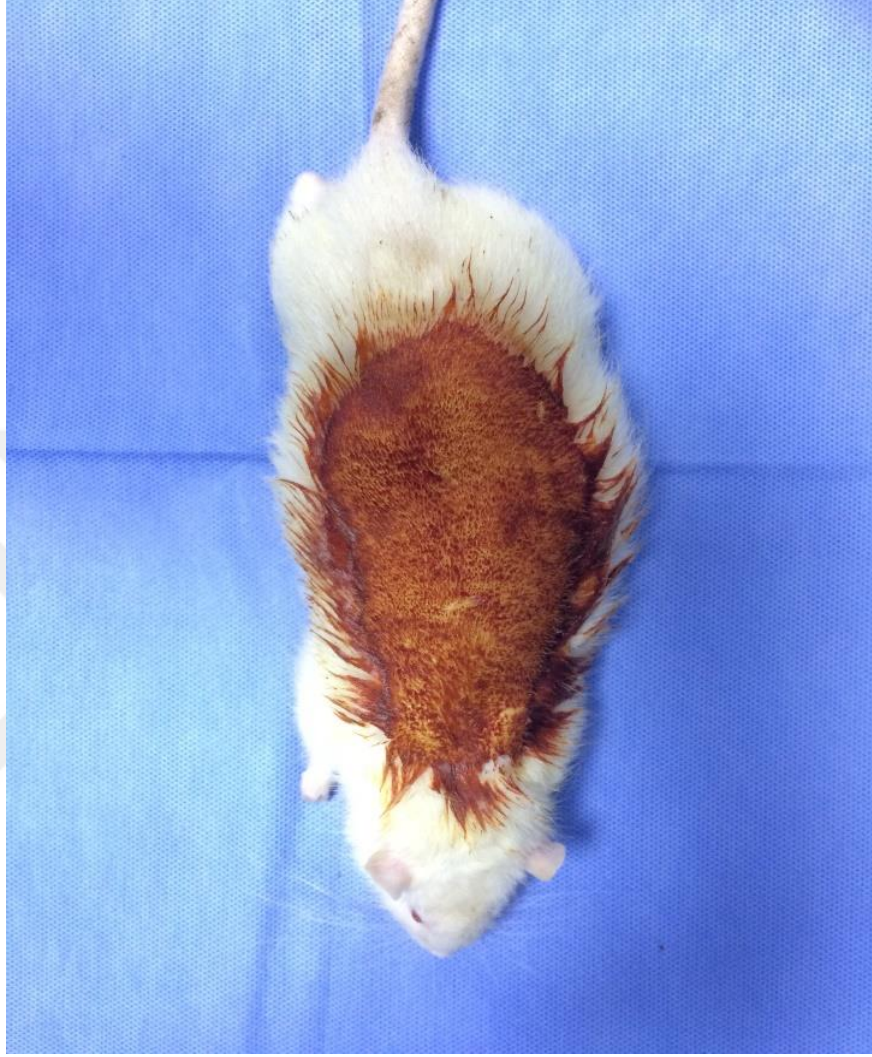
3.2. Anestezi

Cerrahi işlem yapılacak olan tüm gruplardaki ratlara genel anestezi amaçlı 10 mg/kg Ksilazin hidroklorür (ip) (Alfazyne %2 enj. 50 ml, EGE-VET, Türkiye) ve 50mg/kg Ketamin hidroklorür (ip) (Alfamine % 10 enj. 50 ml, EGE-VET, Türkiye) uygulandı.

3.3. Cerrahi işlem

Anesteziye alınan sıçanlar sternal pozisyonda sabitlendikten sonra sırt bölgesi geniş olarak tıraşlandı ve povidon iyot ile antisepsisi sağlandı (Şekil 3. 3. 1). Cerrahi işlem yapılacak alan steril serviyet ile sınırlandırıldı (Şekil 3. 3. 2). İnterskapular mesafe referans alınarak (Şekil 3. 3. 3) T5-T12 seviyesinde iki cm'lik ensizyon ile deri ve deri altı dokular geçildikten sonra paravertebral kaslara ulaşıldı. Paravertebral kaslar disseke edilerek prosesus spinozuslar ile vertebral laminalara ulaşıldı. T7-T10 seviyesinde total

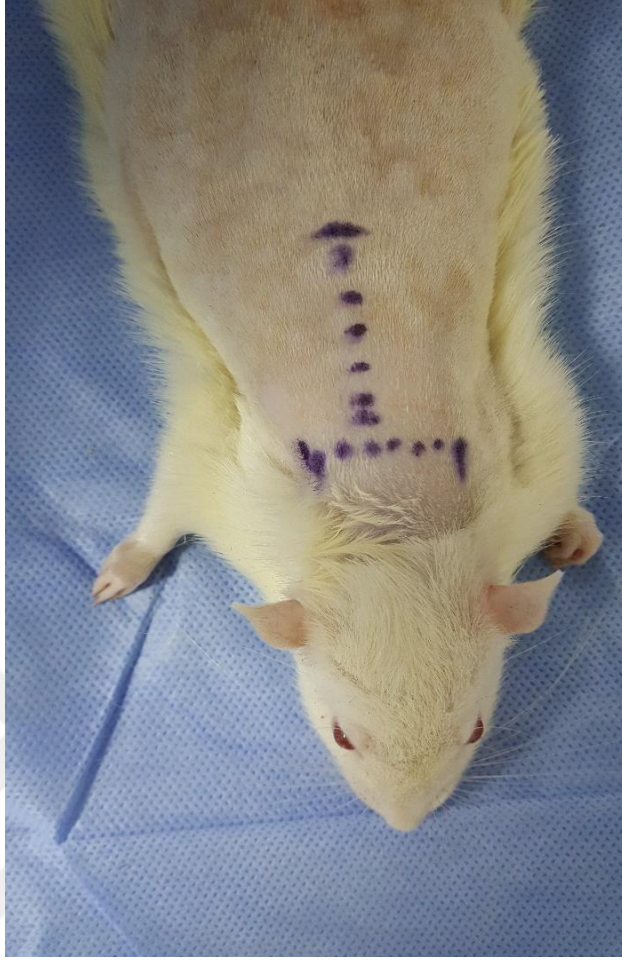
laminektomi ile dura mater bütünlüğü bozulmadan spinal kord açığa çıkarıldı (Şekil 3. 3. 4).



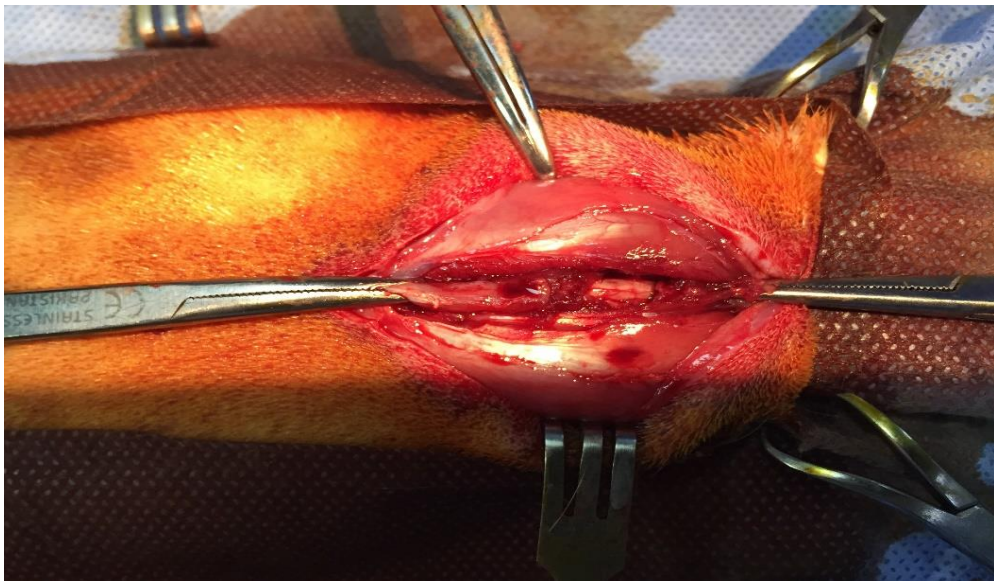
Şekil 3. 3. 1. Sırt bölgesinin povidon iyot ile antisepsisinin sağlanması



Şekil 3. 3. 2. Cerrahi alanın steril serviyet ile sınırlandırılması



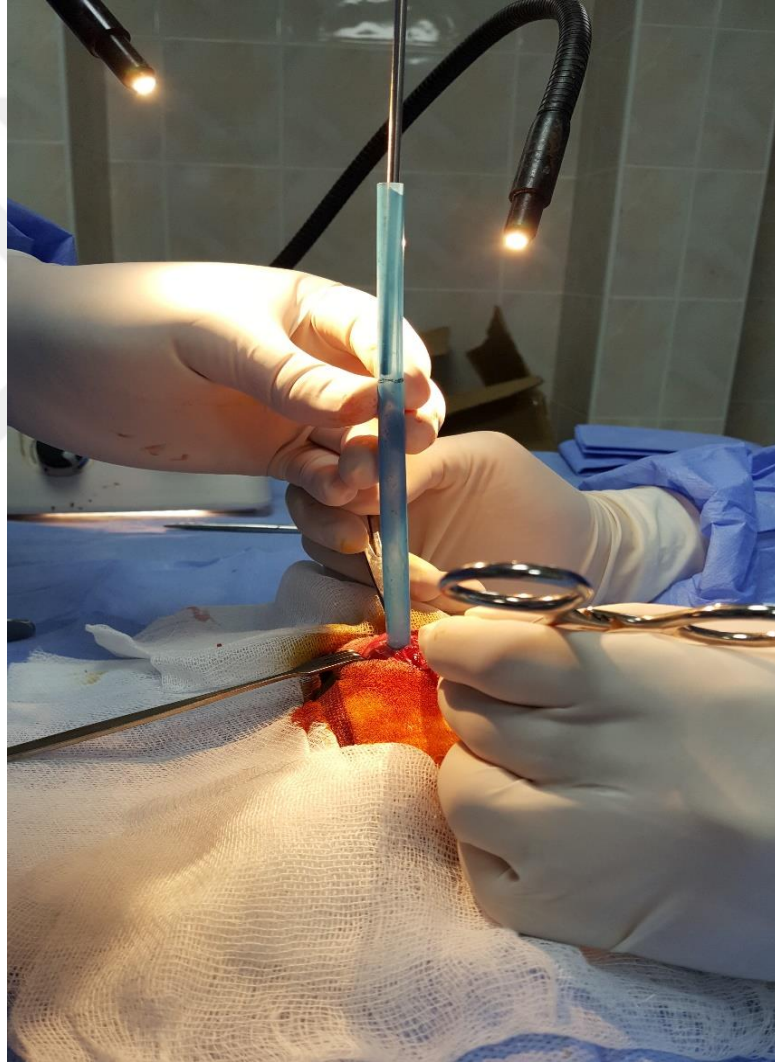
Şekil 3. 3. 3. İnterskapular mesafenin belirlenmesi



Şekil 3. 3. 4. Dorsal laminektomi operasyonu ile spinal kordun açığa çıkarılması

3.4. Omurilik Travmasının Oluşturulması

T7-T10 dorsal laminektomi sonrası açığa çıkarılan spinal kord üzerine ağırlık düşürme metodu ile spinal hasar oluşturuldu. Spinal kord hasarı için; 10 g ağırlığında 3 mm çapındaki metal çubuk 10 cm yükseklikten (100 g/cm) (Şekil 3. 4. 1, Şekil 3. 4. 2) bırakıldı ve ratların paraplejik olmaları sağlandı. Hemostazı takiben paravertebral kaslar ve deri anatomik katlarına uygun olarak dikildi (Şekil 3. 4. 3). Operatif girişimden sonra ratlar sabit oda sıcaklığında uyanmaya bırakıldı.



Şekil 3. 4. 1. Spinal kordun üzerine ağırlık düşürme



Şekil 3. 4. 2. 10 gr ağırlığında metal çubuk



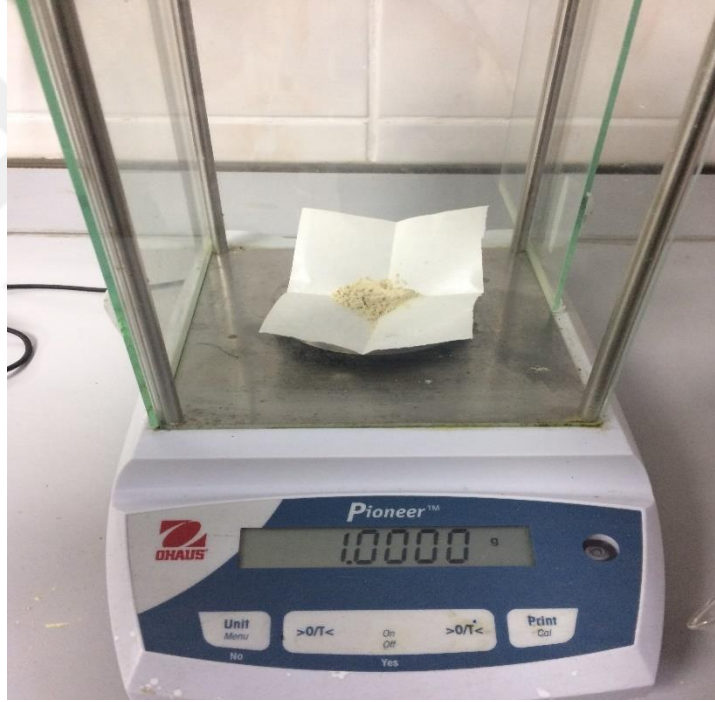
Şekil 3. 4. 3. Cerrahi alanın dikişlerle kapatılması

3.5. Hesperidinin Hazırlanışı

Hassas terazide tartılan 1 gram toz hesperidin üzerine 20 ml içme suyu ilave edildi ve 1ml' de 50 mg etken madde olacak şekilde hesaplandı (Şekil 3. 5. 1).

Çizelge 3.5.1. Pratik doz hesaplama çizelgesi

Rat ağırlığı	Verilecek hesperidin miktarı
250-260 g	1 ml
260-280g	1.1 ml
280-300 g	1.2 ml



Şekil 3. 5. 1. Hesperidin'in hassas terazide tartılması

3.6. İlaç Uygulanması

Grup V; ön koşullama grubuna, travma öncesi 7 gün boyunca 200 mg/kg/gün PO hesperidin (Hesperidin, SİGMA-ALDRICH, USA) verildi, Grup VI; ön koşullama grubuna, travma öncesi 7 gün boyunca 200 mg/kg/gün PO hesperidin verildi ve travma

sonrası 7 gün 200 mg/kg/gün PO hesperidin devam edildi, Grup VII; travma oluşturulduktan sonra 1 gün (1 defa) 200 mg/kg PO hesperidin verildi, Grup VIII; travma oluşturulduktan sonra 7 gün boyunca 200 mg/kg/gün PO hesperidin verildi. (Şekil 3. 6. 1)



Şekil 3. 6. 1. Ratlara oral gavaj yoluyla hesperidin içirilmesi



Şekil 3. 6. 2. Hesperidin ticari preperatı

3.7. Antibiyoterapi ve Postoperatif bakım

Postoperatif olarak bireysel kafeslere alınan ratlar serbest olarak beslendi, antibiyoterapileri yapıldı (sefazolin sodyum, 40 mg/kg/gün İM, 3 gün) ve travma sonrası idrar keseleri günde iki kez manuel olarak boşaltıldı (Şekil 3. 7. 1).



Şekil 3. 7. 1. Ratların idrar keselerinin manuel olarak boşaltılması



Şekil 3. 7. 2. Postoperatif şekillenen hematüri

3.8. Nörolojik Muayene Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Eğik zemin testi: Deneysel spinal kord hasarlarında Rivliv ve Tator'un tarif ettiği eğimli yüzey testi kullanıldı (Gale ve ark. 1985, Şirin ve ark. 2012). Bu yöntem ile sıçan düz zeminli plastik bir kutu içine konuldu, kutu ilk olarak yere paralel iken daha sonra eğimi arttırılarak sıçanın kutunun içinde tırmanması sağlandı. Sıçanın eğik zeminde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı sıçanın eğik zemin açısı olarak not edildi (Şekil 3. 8. 1). Çalışmada cerrahi işlem geçiren ve birinci günde sakrifiye edilen grup 3-5-7'ye sakrifikasyon öncesi, cerrahi işlem geçiren ve yedinci günde sakrifiye edilen grup 4-6-8'e de 1.,3. ve 7. günlerde eğik zemin testi uygulandı.



Şekil 3. 8. 1. Eğik zemin testi uygulaması

Klinik motor muayene: Motor muayene için Modifiye Tarlov Skalası (MTS) kullanıldı (Gale ve ark. 1985, Şirin ve ark. 2012). Çalışmada cerrahi işlem geçiren ve birinci günde sakrifiye edilen grup 3-5-7'ye sakrifikasyon öncesi, cerrahi işlem geçiren ve yedinci günde sakrifiye edilen grup 4-6-8'e de 1.,3. ve 7. günlerde Modifiye Tarlov Skalasına göre motor fonksiyonları değerlendirildi.

Çizelge 3.8.1. Modifiye Tarlov Skalası (Gale ve ark. 1985)

Derece	Modifiye Tarlov Skalası
0	Arka ekstremitelerde tam paraliz, arka ekstremitelerde hareket yok, ağırlık taşıma yok
1	Farkedilebilir arka ekstremitte hareketleri, ağırlık taşıma yok
2	Sık ve/veya güçlü arka ekstremitte hareketi, ağırlık bindirme veya lokomasyonla sonuçlanmayan belirgin arka ekstremitte hareketleri
3	Arka ekstremiteler vücut ağırlığını destekler, bir veya iki adım atabilir
4	Yürüyüşte hafif bir kayıp vardır
5	Normal yürüyüş

Parmak açma testi: Sıçan gövdesinden kaldırılarak arka ekstremiteler asılı tutuldu ve parmakların açılması gözlemlenerek refleksler aşağıdaki gibi sınıflandırıldı (Gale ve ark. 1985).

0- Parmakların açılmaması; 1- Parmakların hafif açılması; 2- Parmakların tam açılması.

3.9. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme iki yöntemle yapıldı.

1. Rutin histopatolojik değerlendirme.
2. İmmünohistokimyasal çalışmalar (GFAP ve Kaspaz 3).

3.9.1. Rutin Histopatolojik Değerlendirme

Tüm gruplardan alınan spinal kord örnekleri %10'luk formol ile fikse edilmesini takiben bu örneklerden her bir lama 3 adet spinal kord örneği gelecek şekilde kesitler alındı. Travmanın olduğu yer, epicenter olarak kabul edildi. Burada, epicenterin 3 mm

rostral ve 3 mm kaudal bölümlerinden olmak üzere 3 ana bölgeden kesitler alındı. Rutin takip prosedüründen sonra hazırlanan parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler yapılarak elde edilen preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandıktan sonra patoloğ tarafından kör olarak ışık mikroskobu (Olympus BX53) altında incelendi. 4X, 10X, 20X ve 40X objektif altında omuriliğin beyaz ve gri cevheri değerlendirildi.

Tüm omurilik örnekleri histopatolojik değişikliklere göre semikantitatif bir skorlama sistemine göre 0 ila 3 arası skorlandı. Altı farklı parametre (hemoraji, laserasyon, nekroz, ödem, nöronal ve aksonal dejenerasyon, inflamatuvar hücre infiltrasyonu) histopatolojik olarak değerlendirildi ve şu şekilde skorlandı; 0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=ağır. Her bir omurilik için patoloji skoru bu altı parametre için alınan skorların ortalaması hesaplanarak ölçüldü (Öztürk ve ark. 2016).

Her grubu temsilen seçilen preparatlar Olympus BX 53 immünflorasan mikroskopta Olympus DP2 BSW görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı.

3.10. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmünohistokimyasal uygulamalar için deneklere ait parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlıkta rotary mikrotom cihazında kesitler alındı. Hazırlanan kesitler, streptavidin-biotin-peroksidaz ve mikrodalga antigen retrieval kombinasyon metodu ile, Anti-gliyal fibriler asidik protein GFAP (1:1000 dilüsyon, Anti-GFAP antibody ab7260, ABCAM, Cambridge, İngiltere) ve Kaspaz 3 (1:1000 dilüsyon, Anti-Caspase-3 antibody [EPR18297](ab184787), ABCAM, Cambridge, İngiltere) antikorları kullanılarak boyandı. İmmünohistokimyasal olarak boyanan lamalar, parlak alan ışık mikroskobunda (Olympus BX53) patoloğ tarafından kör olarak incelendi. İmmünohistokimyasal boyama aşamaları:

1. Bir gece önceden 5 mikron kalınlıkta kesilip hazırlanan preparatlara etüvde 70 C°de 1 saat deparafinizasyon işlemi uygulandı.

2. Kesitler, sıcak ve soğuk ksilen içinde beşer dakika, absöü alkolde beş dakika bekletildi ve distile su ile yıkandı.

3. İçerisinde %3'lük hidrojen peroksit solüsyonu bulunan şalelerde yarım saat oda sıcaklığında bekletildi.

4. Üç defa distile su içinde, beşer dakika süre ile yıkandı.

5. Etrafı kurulandıktan sonra içerisinde %10'luk sitrat buffer solüsyonları bulunan şalelere yerleştirildi. Mikrodalga fırında orta (medium) derecede beş dakika kaynatıldı. Mikrodalga fırından çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı.

6. Kesitler soğuduktan sonra üç defa distile suda beşer dakika süre ile yıkandı. Daha önceden hazırlanmış olan fosfat buffered solüsyonunda (PBS 0,01 Ph 7.2) üç defa beşer dakika süre ile yıkandı.

7. Kesitler buharlı kabine dizilerek üzerlerine kesitlerin üzerini tamamen kapatacak şekilde Large Volume Ultra V Block (LabVision) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Burada amaç nonspesifik antikor bağlanmasını engellemekti.

8. Kesitlerin üzerindeki PBS solüsyonunda üç defa beşer dakika süre ile şalede yıkandı. Dokuların çevresindeki fazla solüsyon silinerek uzaklaştırıldı.

9. Kesitler buharlı kabine dizilerek üzerlerini tamamen kapatacak şekilde primer antikorlar GFAP (1:1000 dilüsyon, Anti-GFAP antibody ab7260, ABCAM, Cambridge, İngiltere), ve Kaspaz 3 (1:1000 dilüsyon, Anti-Caspase-3 antibody [EPR18297] (ab184787), ABCAM, Cambridge, İngiltere) damlatıldı. Oda sıcaklığında nemli ortamda 90 dakika bekletildi.

10. Kesitlerin üzerindeki fazla solüsyon dökülerek, PBS solüsyonunda üç defa beşer dakika şalede yıkandı. Dokuları çevresindeki fazla solüsyon silinerek uzaklaştırıldı.

11. Kesitler buharlı kabine dizilerek üzerlerini tamamen kapatacak şekilde sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent/LabVision) damlatıldı ve 20 dakika bekletildi.

12. Kesitlerin üzerindeki fazla solüsyon dökülerek, PBS solüsyonunda üç defa beşer dakika yıkandı. Dokuların çevresindeki fazla solüsyon silinerek uzaklaştırıldı.

13. Kesitler buharlı kabine dizilerek üzerlerini tamamen kapatacak şekilde Streptavidin peroksidaz solüsyonu damlatıldı ve 30 dakika bekletildi.

14. Kesitlerin üzerindeki fazla solüsyon dökülerek PBS solüsyonunda üç defa beşer dakika şalede yıkandı. Dokuların çevresindeki fazla solüsyon silinerek uzaklaştırıldı.

15. Kesitlere tarife göre hazırlanan AEC substrat içinde AEC kromojen (3- amino-9-ethyl karbazol) (AEC Substrat Sistem, LabVision TA-125-HA) bol miktarda damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.

16. Kesitler PBS solüsyonunda, ardından da distile suda yıkandı.

17. Mayer Hematoksilen ile 30-60 saniye süreyle zemin boyanması yapıldı.

18. Daha sonra çeşme suyunda yıkandı.

19. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılan kesitler özel kapama maddesiyle (Large volume ultramaunt/LabVision) ile kapatılarak mikroskopik incelemeye hazır hale getirildi.

3.10.1. Kaspaz 3 Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Kaspaz 3 pozitif hücrelerin sayısı, yüksek güçlü bir alan (x 400) altında manuel olarak sayıldı ve her slayttan altı farklı üst üste binmeyen görüş alanlarında (üç gri madde ve üç beyaz madde alanı) ortalama pozitif hücrelerin sayısal değerleri hesaplandı (Lin ve ark., 2011). Her grubu temsilen seçilen preparatlar Olympus BX 53 immünflorasan mikroskopta Olympus DP2 BSW görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı.

3.10.2. GFAP (Anti-gliyal fibriler asidik protein) Ekspresyonunun Değerlendirilmesi

Işık mikroskopunda (Olympus BX53) x100, x200 büyütme alanlarında GFAP (astrozitler için işaretleyici) eksprese eden reaktif astrozitlerin yoğunluğu semikantitatif olarak 4 grupta (0: yok, 1: hafif, 2:orta, 3:şiddetli yoğunlukta olarak) skorlandı. Her grubu temsilen seçilen preparatlar Olympus BX 53 immünflorasan mikroskopta Olympus DP2 BSW Görüntü analiz sisteminde fotoğraflandı.

3.11. Biyokimyasal Analizler

Araştırmada deney hayvanlarından alınan plazma örneklerinde hesperidinin oksidatif stres ve inflamasyon üzerine biyoetkinliği araştırıldı. Bu amaçla oksidatif stres parametreleri olan total antioksidan ve oksidan kapasite spektrofotometrik analizlerle, yangısal parametrelerden interlökin 1-beta ($IL-1\beta$) ve tümör nekroz faktör alfa ($TNF-\alpha$) protein düzeyleri ELİSA metodu ile araştırıldı.

3.12. Bradford Yöntemi ile Protein Tayini

Bu yöntemin prensibi; boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahip olduğundan protein üzerindeki pozitif yüke bağlanmasıdır. Bu boyanın kırmızı ($\lambda_{max} = 465nm$) ve mavi ($\lambda_{max} = 595nm$) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Protein bağlanmasının göstergesi, kırmızı formun mavi forma dönüşüdür. Yöntem: deney gruplarındaki alınan kan örneklerinden 20 μl alınarak üzerine 200 μl Bradford ayracı ve 580 μl distile su ilave edilerek test tüpleri hazırlandıktan sonra spektrofotometrede 595 nm ışık dalga boyunda okunarak protein değerleri tespit edilerek kaydedildi.

3.13. Total Antioksidan (TAS) Analizi

Bu testin prensibi, +2 değerlikli demir-o-dianisidine, hidrojen peroksit ile Fenton reaksiyon gerçekleştirerek hidroksil molekülünü oluşturur. Bu indirgen reaktif oksijen molekülü düşük pH'da o-dianisidine ile reaksiyon oluşturarak sarı-kahverengi dianisidil bileşiğini oluşturur. Dianisidil radikalleri oksidasyon ile renk oluşumunu daha da kuvvetlendirmektedir (Gutteridge ve Halliwell 2000). Alınan plazma örneklerinden, TAS düzeyleri ticari kitlerle araştırıldı (Rel Assay, TR). Kısaca bu yöntemde, kitte bulunan solüsyon 1' den 800 µl alınarak üzerine 50 µl plazmalar eklendi. Sonrasında spektrofotometrede 660 nm dalga boyunda ilk ölçümler yapıldı. Devamında, bu test tüplerine 125 µl solüsyon 2 eklenerek 10 dk oda ısısında inkübe edilerek 2. okumayla 660 nm'de ölçüldü. Aynı işlemler standartlarda uygulandı. Alınan değerler kitteki formüle uyarlanarak net değerler hesaplandı. Sonuçlar µmol Trolox Eqiv./L birimiyle ortaya konuldu.

3.14. Total Oksidan (TOS) Kapasite

Bu testin prensibini örneklerdeki oksidanların ferroz-iyon şelatör kompleksini ferik iyonla okside edilmesi oluşturmaktadır. Spektrofotometrik alınan renk, örneklerdeki oksidanların toplam miktarını göstermektedir. Testte kalibratör, hidrojen peroksittir. Sonuçlar her litredeki eşdeğer µm hidrojen peroksit ile tespit edilir (Erel 2005). Plazma, TOS seviyeleri ticari kitler (Rel Assay, TR) ile araştırıldı. Kısaca, kitteki solüsyon 1' den 1 ml alındı ve üzerine 150 µl örnekler eklendi. Hazırlanan karışımlar spektrofotometrik olarak 530 nm ışık dalga boyunda ölçüldü (1. ölçüm). Sonrasında bu test tüplerine 50 µl solüsyon 2 eklenerek 10 d oda ısısında inkübe edildi. Tekrar 530 nm absorbans değerleri ölçüldü (2. ölçüm). Aynı işlemler standartlara da uygulandı. Okunan değerler kit formülüne uyarlanarak net değerler µmol H₂O₂ Eqiv./L birimi ile hesaplandı.

3.15. Protein Düzeyleri Analizleri

Elde edilen plazma örneklerinden yangı öncülü (pro-inflamatuvar) parametrelerden interlökin 1-beta (İL-1 β) ve Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α)'nın protein düzeyleri hazır ticari kitlerin temini ve protokolleri takip edilerek ELİSA metodu ile gerçekleştirildi.

3.15.1. İL-1 β Düzeyinin Ölçülmesi

Örneklerdeki İL-1 β düzeyi “eBioscience, AU” kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Bu testte öncelikle standartlar hazırlandı (31.3 - 2000 pg/ml). Herbir örnekten 50 μ l alınarak üzerlerine yine 50 μ l biotin konjugat solüsyonu eklendi. Ve oda ısısında 2 saat bekletildi. Süre sonunda bu kuyucukların üzerine 100 μ l streptavidin HRP eklenerek ve kuyucuklar jelatin ile kaplanarak, oda ısısında 1 saat bekletildi. İşlem sonrasında her kuyucuk kitteki yıkama solüsyonuyla 3 kez yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 μ l TMB (Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dk bekletildi. Devamında her kuyucuğa 100 μ l stop solüsyonu eklenerek ELİSA okuyucuda (μ quant-SK - 450 nm dalga boyu) okundu. Alınan değerler standart eğrisi formülüne yerleştirilerek sonuçlar, pg/ml birimi ile hesaplandı.

3.15.2. TNF- α Düzeyinin Ölçülmesi

Plazma örneklerindeki TNF- α düzeyi hazır ELİSA ticari kitiyle (Biont, PCR) araştırıldı. Bu testte öncelikle standartlar hazırlandı (40-640 ng/ml). Örnek kuyucuklarına, 40 μ l örnek, 10 μ l TNF- α antikor solüsyonu ve 50 μ l streptavidin HRP (Horseradish peroxidase) konjugat solüsyonu eklendi. Daha sonra kuyucuklar jelatinle kaplanarak 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda kuyucuklar 30x yıkama solüsyonuyla 5 kez yıkandı. Devamında her bir kuyucuğa 50 μ l kromojen A ve 50 μ l kromojen B solüsyonundan eklenerek 37 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. Süre

sonunda her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenrek reaksiyon durduruldu. Son işlem olarak tüm kuyucuklar ELİSA okuyucuda (µquant-SK - 450 nm dalga boyu) okundu. Alınan değerler standart eğrisi förmölüne yerleştirilerek sonuçlar, ng/ml birimi ile hesaplandı.

3.16. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiki analiz: Çalışmada elde edilen klinik bulguların istatistiki analizleri SPSS (version 17) bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak verildi. Grup içinde tekrar eden ölçümlerdeki farklılıklar Wilcoxon Signed Ranks Test'i ile, gruplar arasındaki farklılıklar ise One Way ANOVA Bonferroni Test'i ile analiz edildi. İstatistiki anlamlılıkların yorumlanmasında $p < 0.05$ düzeyi kullanıldı.

4. BULGULAR

Her grupta 8 rat olmak üzere, sekiz grupta toplam 64 adet rat kullanıldı. Çalışmada yapılan klinik muayene sonucunda sistemik enfeksiyon veya akciğer enfeksiyonu ile karşılaşılmadı fakat, Grup 3'te 2, Grup 4'te ikisi hafif olmak üzere 4, Grup 5'te 1, Grup 6'da 1, Grup 7'de 3, Grup 8'de ise 2 olmak üzere toplam 11 ratta hematüri görüldü. Hesperidin içirilen Grup 5 ve Grup 6'daki ratların dışkısında yumuşama ve koku artışı gözlemlendi. Bununla beraber Grup 3'te 2, Grup 4'te 2, Grup 5'te 1, Grup 6'da 1, Grup 7'de 2 ve Grup 8'de 1 rat ex oldu.

4.1. Rat ağırlıkları

Çizelge 4.1.1. Ratların vücut ağırlık ortalamaları (ort±SE), n:8

GRUPLAR	RAT AĞIRLIKLARI
Grup 1	287,5 ± 12,21
Grup 2	284,0 ± 13,10
Grup 3	281,1 ± 14,37
Grup 4	275,3 ± 18,96
Grup 5	276,5 ± 19,51
Grup 6	274,1 ± 22,96
Grup 7	264,3 ± 9,71
Grup 8	278,7 ± 12,13

4.2. Nörolojik muayene bulguları

Nörolojik muayene değerlendirmesi yaparken Modifiye Tarlov Testi, eğik zemin testi ve parmak açma testi uygulandı (1. gün akut, 3 ve 7. günler subakut olarak değerlendirildi).

4.2.1. Modifiye Tarlov Skalası sonuçları

Hayvanlar spontan aktivitelerini rahat bir şekilde sergileyebilmeleri için bireysel kafeslere alınarak gözlemlendi. Modifiye Tarlov skalası değerleri, kontrol grupları ile 1. günde sham grupları, ön koşullama grupları ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.001$). 1. günde yapılan nörolojik muayenede, ön koşullama gruplarındaki değerler sham ve tedavi gruplarından daha yüksekti. 3. ve 7. günde yapılan nörolojik muayenelerde de ön koşullama (Grup 6) grubu değeri, sham (Grup 4) ve tedavi (Grup 8) grubu değerinden yüksek bulundu. Sham (Grup 4) grubunda 1., 3. ve 7. günlerde ölçülen Modifiye Tarlov değerlerinde ılımlı bir yükselme olduğu gözlenirken, ön koşullama (Grup 6) grubunda 1. ve 3. günlerde gözle görülür bir artış olmayıp 7. günde yapılan nörolojik muayenede bariz bir yükselme gözlemlendi. Tedavi (Grup 8) grubunda ise 3. günde yapılan muayenede 1. güne oranla bir azalma olduğu ancak 7. günde önemli oranda artma göze çarptı. 1., 3., ve 7. günlerde yapılan nörolojik muayenelerde, hesperidin içirilen gruplarda, içirilmeyip sadece travma oluşturulan sham grubundaki (Grup 4) Modifiye Tarlov değerleri daha yüksek bulundu. Modifiye Tarlov Skalası değerlerine bakılarak hesperidin özellikle de subakut dönemde klinik olarak bir iyileştirme sağladığı söylenebilir.

Çizelge 4.2.1.1. Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Modifiye Tarlov Testi Üzerindeki Etkileri

Gruplar	Modifiye Tarlov	Modifiye Tarlov	Modifiye Tarlov
	1. gün	3. gün	7. gün
	Ort ± SE	Ort ± SE	Ort ± SE
Grup 1: Kontrol (1. gün)	5,00±0,0		
Grup 2: Kontrol (7. gün)	5,00±0,0		
Grup 3: Sham (1. gün)	1,25±0,25 [≠]		
Grup 4: Sham (7. gün)	1,75±0,49 [≠]	1,87 ±0,47	2,37±0,32
Grup 5: Ön koşullama (1. gün)	2,00±0,50 [≠]		
Grup 6: Ön koşullama (7. gün)	2,62±0,41 [≠]	2,62 ±0,49	3,37±0,37
Grup 7: Tedavi (1. gün)	1,62±0,32 [≠]		
Grup 8: Tedavi (7. gün)	1,75±0,31 ^{≠,a}	1,62 ±0,26	3,12±0,44, ab

[≠]: Modifiye Tarlov Testleri, kontrol grupları ile 1. günde sham, ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.001$).

ab: Aynı satırdaki farklı harfler arasındaki farklılıklar önemli bulundu (SPSS, Wilcoxon, $p<0.05$).

4.2.2. Eğik zemin testi sonuçları

Yapılan istatistiksel incelemede eğik zemin testi değerleri 1. günde kontrol grupları ile ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.005$). Yine 1. günde sham (Grup 3) ve tedavi grubu (Grup 7) arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$). Eğik zemin testinde sham (Grup 4) ve tedavi (Grup 8) gruplarına bakıldığında 3. günde 1. güne oranla değerlerde hafif azalma görülürken, ön koşullama (Grup 6) grubunda hafif bir artış oldu. Ön koşullama (Grup 6), sham (Grup 4) ve tedavi (Grup 8) grubu değerlerinde 7. günde yapılan nörolojik muayenede 1. güne göre kıyaslandığında üçünde de artış olmakla beraber ön koşullama (Grup 6) grubunda önemli bir artış görüldü.

Eğik zemin testi değerlerine bakılarak hesperidin içirilen gruplarda, subakut dönemde özellikle de ön koşullama (Grup 6) grubunda içirilmeyen gruplara göre klinik fayda sağladığı söylenebilir.

Çizelge 4.2.2.1. Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Eğik Zemin Testi Üzerindeki Etkileri

Gruplar	Eğik zemin testi	Eğik zemin testi	Eğik zemin testi
	1. gün	3. gün	7. gün
	Ort \pm SE	Ort \pm SE	Ort \pm SE
Grup 1: Kontrol (1. gün)	81,87 \pm 2,03		
Grup 2: Kontrol (7. gün)	82,75 \pm 1,99		
Grup 3: Sham (1. gün)	69,50 \pm 2,12		
Grup 4: Sham (7. gün)	64,50 \pm 3,05	60,87 \pm 4,85	65,00 \pm 4,03
Grup 5: Ön koşullama (1. gün)	63,87 \pm 3,93 β	.	.
Grup 6: Ön koşullama (7. gün)	64,37 \pm 4,69 β	65,25 \pm 3,35	72,62 \pm 4,56
Grup 7: Tedavi (1. gün)	55,12 \pm 3,67 β, μ	.	.
Grup 8: Tedavi (7. gün)	62,87 \pm 2,21 β	59,12 \pm 2,05	67,62 \pm 4,09

β : Eğik Zemin Testi, 1. günde kontrol grupları ile ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.005$)

μ : Eğik Zemin Testi, 1. günde sham ve tedavi grubu arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$).

4.2.3. Parmak açma testi sonuçları

Parmak açma testi değerleri 1. günde kontrol grupları ile sham, ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.001$). 1. günde sham grubu (Grup 3) ile ön koşullama (Grup 5) grubu arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$). Yine 7. günde sham (Grup 4) grubu ile ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grubu arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$). Parmak açma testinde 1. günde ön koşullama (Grup 6) grubu değeri diğer gruplardaki değerlere oranla yüksek olduğu görüldü. 3. gündeki değerlerde ön koşullama (Grup 6) değeri daha yüksekken 7. günde tedavi (8) grubunun daha yüksekti.

Parmak açma testi sonuçlarına bakılarak hesperidinin subakut dönemde klinik fayda sağladığı söylenebilir.

Çizelge 4.2.3.1. Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in Parmak Açma Testi Üzerindeki Etkileri

Gruplar	Parmak açma testi	Parmak açma testi	Parmak açma testi
	1. gün	3. gün	7. gün
	Ort ± SE	Ort ± SE	Ort ± SE
Grup 1: Kontrol A	2,00±0,00		
Grup 2: Kontrol B	2,00±0,00		
Grup 3: Sham A	0,12±0,12 ≠		
Grup 4: Sham B	0,62 ±0,32 ≠	0,75 ±0,31	0,62 ±0,18
Grup 5: Ön koşullama A	0,50±0,32 ≠	.	
Grup 6: Ön koşullama B	1,25±0,31 ≠, μ	1,12 ±0,35	1,50 ±0,26 ∞
Grup 7: Travma A	0,50±0,18 ≠	.	.
Grup 8: Travma B	0,75±0,31 ≠, a	0,62 ±0,26	1,62 ±0,18 ∞, ab

≠: Parmak Açma Testi 1. günde kontrol grupları ile sham, ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.001$).

μ: Parmak Açma Testi 1. Günde sham (Grup 3) grubu ile ön koşullama (Grup 6) arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$).

∞: Parmak Açma Testi 7. Günde sham (Grup 4) grubu ile ön koşullama (Grup 6) ve tedavi grubu (Grup 8) arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$).

ab: Aynı satırdaki farklı harfler arasındaki farklılıklar önemli bulundu (SPSS, Wilcoxon, $p<0.05$).

4.3. Biyokimyasal bulgular

Çizelge 4.3.1. Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in İL-1 β ve TNF- α düzeyleri üzerindeki etkileri

	N	Kontrol	Sham	Ön koşullama	Tedavi
		Ort \pm SE	Ort \pm SE	Ort \pm SE	Ort \pm SE
İL-1β 1. gün	6	84,33 \pm 3,97	107,0 \pm 7,03	85,16 \pm 1,53 α	82,83 \pm 1,07 α
İL-1β 7. gün	6	80,83 \pm 2,48	82,00 \pm 2,16	82,33 \pm 2,24	85,66 \pm 2,71
TNF-α 1. gün	6	446,0 \pm 59,8	593,66 \pm 80,7	565,0 \pm 48,4	533,5 \pm 45,6
TNF-α 7. gün	6	285,6 \pm 51,4	289,5 \pm 17,4	366,3 \pm 15,5	482,5 \pm 35,0 α

(α : Sham grubu ile karşılaştırıldığında p<0.01)

Çalışmamızın 1. gününde proinflamatuvar sitokinlerden İL-1 β düzeyi, sham grubunda (107 \pm 7.0) kontrol grubuna (84,33 \pm 3,97) göre artmıştır. Hesperidin ön koşullaması, İL-1 β düzeyini kontrol grubu düzeyine düşürerek yangıyı baskılamıştır (85.16 \pm 1.53, p<0.01). Yine tedavi grubunda da anlamlı düzeyde azalmıştır (82.83 \pm 1.07, p<0.01). Özet olarak sham grubu ile karşılaştırıldığında hesperidin 1. günde, ön koşullama ve tedavi grubunda İL-1 β düzeyini düşürerek yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulunmuştur (p<0.01).

Çalışmanın 7. gününde ise İL-1 β düzeyi kontrol grubuna (80.83 \pm 2.49) göre sham grubunda (82.00 \pm 2.16) hafif düzeyde arttığı bulunmuştur. Diğer taraftan, hesperidin 7. günde hem ön koşullama (82.33 \pm 2.24) hem de tedavi grubunda (85.66 \pm 2.71) İL-1 β düzeylerinde istatistiki olarak önemli düzeyde etkilemediği tespit edilmiştir (p>0.05).

Çalışmada TNF- α düzeyi, 1. günde kontrol grubuna (446.0 \pm 59.8) göre sham grubunda (593.66 \pm 80.7) artmıştır. Buna karşın hesperidin 7 günlük ön koşullu uygulama ve travma sonrası 1 günlük "bir doz" hesperidin uygulanması TNF- α düzeyini 24 saat sonra düşürmüştür (565,0 \pm 48,4). Yine tedavi grubunda hesperidin travma sonrası 1 günlük "bir doz" hesperidin uygulanması TNF- α düzeyini azaltmıştır (533.5 \pm 45.6). Deneyin 7. gününde TNF- α düzeyi kontrol grubuna (285.6 \pm 51.4) göre sham grubunda (289.5 \pm 17.4) hafif düzeyde arttığı tespit edilmiştir. Ancak hesperidin 7

günlük kullanımının TNF- α düzeylerini artırarak hem ön koşullama (366.3 ± 15.5) hem de tedavi grubunda (482.5 ± 35.0 , $p<0.01$) etkisiz kaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.3.1).

Çizelge 4.3.2. Deneysel Spinal Kord Hasarında Hesperidin'in TAS ve TOS düzeyleri üzerindeki etkileri

	N	Kontrol	Sham	Ön koşullama	Tedavi
		Ort \pm SE	Ort \pm SE	Ort \pm SE	Ort \pm SE
TAS 1. gün	6	0,650 \pm 0,08	0,661 \pm 0,03	0,952 \pm 0,06 α	1,021 \pm 0,03 α
TAS 7. gün	6	0,679 \pm 0,01	0,777 \pm 0,03	0,572 \pm 0,04 α	0,663 \pm 0,05
TOS 1. gün	6	7,26 \pm 0,26	7,70 \pm 0,50	7,50 \pm 0,56	8,20 \pm 0,55
TOS 7. gün	6	6,83 \pm 0,64	6,76 \pm 0,15	7,24 \pm 0,50	6,57 \pm 0,80

(α : Sham grubu ile karşılaştırıldığında $p<0.01$)

Çalışmanın 1. gününde TAS, kontrol grubuna (0.650 ± 0.08) göre sham grubunda (0.661 ± 0.03) hafif düzeyde artmıştır. Buna karşın hesperidin ön koşullanması sham grubu ile karşılaştırıldığında TAS düzeyini anlamlı düzeyde (0.952 ± 0.06) arttırarak olumlu etki göstermiştir ($p<0.01$). Yine tedavi grubunda da anlamlı düzeyde artış tespit edilmiştir ($1.021\pm 0,03$, $p<0.01$) (Çizelge 4. 3. 2).

Çalışmanın 7. gününde ise TAS düzeyinin kontrol grubuna ($0,679\pm 0,01$) göre sham grubunda ($0,777\pm 0,03$) arttığı bulunmuştur. Diğer taraftan, hesperidin uygulanmasının ön koşullama (0.572 ± 0.04 , $p<0.01$) ve tedavi (0.663 ± 0.05) gruplarında TAS düzeylerini azalttığı için total antioksidan statüyü etkilemediği tespit edilmiştir (Çizelge 4. 3. 2).

Çalışmada TOS düzeyi, 1. günde kontrol grubuna ($7,26\pm 0,26$) göre sham grubunda ($7,70\pm 0,50$) artmıştır ($p>0,05$). Buna karşın hesperidin ön koşullu uygulanması TOS düzeyini düşürmüştür (7.50 ± 0.56). Yine tedavi grubunda ise 1 günlük hesperidin uygulanımı TOS düzeyini istatistiki olarak anlamlı olmasa da önemli düzeyde arttırmıştır ($8,20\pm 0,55$, $p>0.05$, Çizelge 4. 3. 2).

Çalışmanın 7. gününde ise TOS düzeyi kontrol grubuna ($6,83\pm 0,64$) göre sham grubunda ($6,76\pm 0,15$) anlamlı olmayan düzeyde azalmıştır. Ancak hesperidin 7 günlük kullanımının ön koşullanma ($7,24\pm 0,50$) grubunda oksidan kapasiteyi azaltmada yetersiz

kalmıştır. Buna karşın hesperidinin spinal hasar oluşturulmuş deneklerde 1 haftalık uygulanması sonrasında TOS seviyeleri azalmıştır ($6,57 \pm 0,80$, $p > 0,05$).

4.4. Histopatolojik bulgular

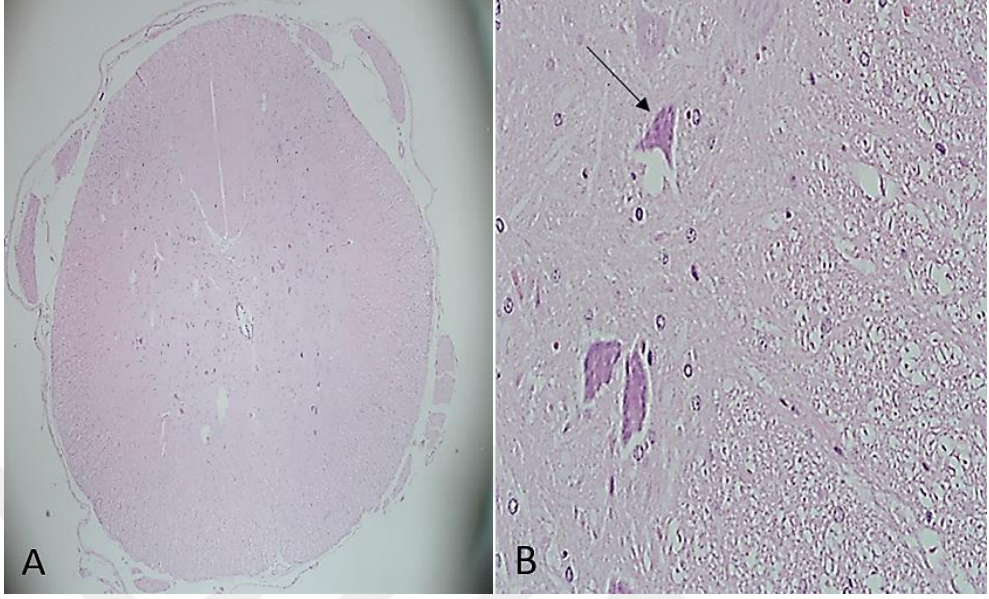
Rutin histopatolojik yöntemle (H+E boyama) ile yapılan incelemede hemoraji, laserasyon, nekroz, ödem, nöronal ve aksonal dejenerasyon, ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu değerlendirildi.

Çizelge 4.4.1. Histopatolojik bulgulardaki verilerin istatistikleri

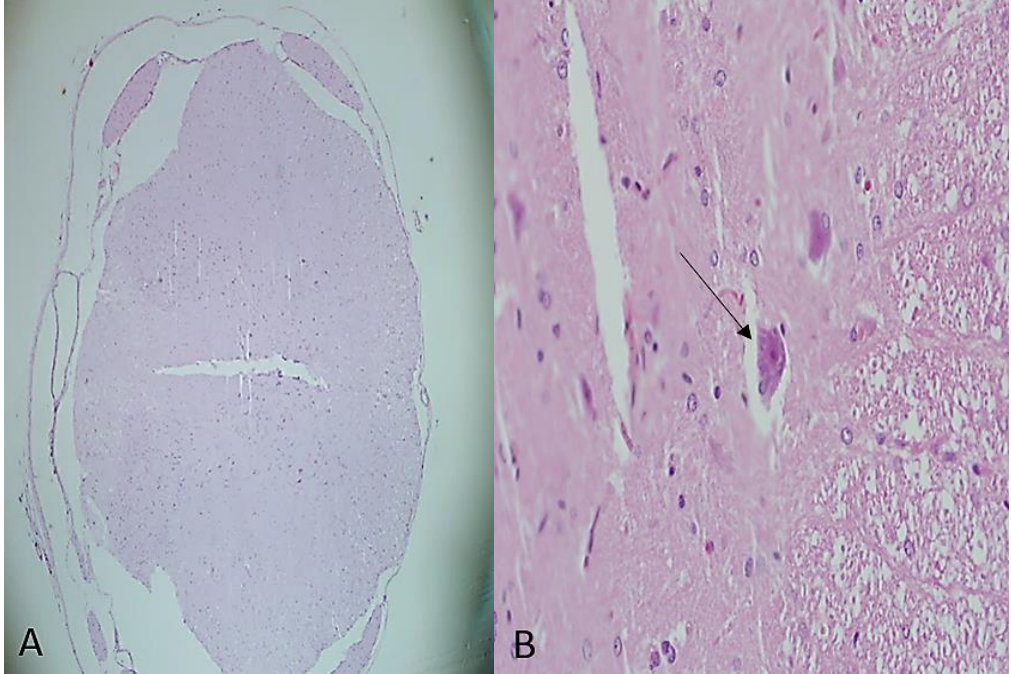
	Kontrol	Sham	Ön koşullama	Tedavi
	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE
Hemoraji 1. gün	0,125±0,12	2,857±0,142	1,833±0,307 β	1,857±0,260 β
Hemoraji 7. gün	0,000±0,00	1,625±0,182	1,375±0,182	1,000±0,000
Laserasyon 1. gün	0,000±0,00	2,857±0,142	1,333±0,494 \neq	2,000±0,218
Laserasyon 7. gün	0,000±0,00	2,125±0,226	0,750±0,163 \neq	1,500±0,188
Aksonal ve Nöronal Dej 1. gün	0,000±0,00	2,857±0,142	1,833±0,307 $*$	1,857±0,260 $*$
Aksonal ve Nöronal Dej 7. gün	0,000±0,00	2,750±0,163	2,375±0,263	2,250±0,250
Nekroz 1. gün	0,000±0,00	2,857±0,142	1,666±0,333 $*$	1,571±0,368 $*$
Nekroz 7. gün	0,000±0,00	2,375±0,182	0,875±0,226 \neq	0,875±0,295 \neq
İnflamatuvar Reaksiyon 1. gün	0,000±0,00	2,857±0,142	1,666±0,333 β	1,714±0,285 β
İnflamatuvar Reaksiyon 7. gün	0,000±0,00	2,625±0,182	1,625±0,182 β	1,500±0,188 \neq
Ödem 1. gün	0,000±0,00	2,714±0,184	1,666±0,210 α	1,714±0,285 α
Ödem 7. gün	0,000±0,00	3,000±0,000	1,875±0,226 \neq	2,125±0,226 \neq

(Sham grubu ile karşılaştırıldığında $*$: $p < 0,05$, α : $p < 0,01$, β : $p < 0,005$, \neq : $p < 0,001$)

Kontrol gruplarında 24. saat ve 7. günde beklenildiği gibi normal bulgular saptandı (Şekil 4. 4. 1 ve Şekil 4. 4. 2)

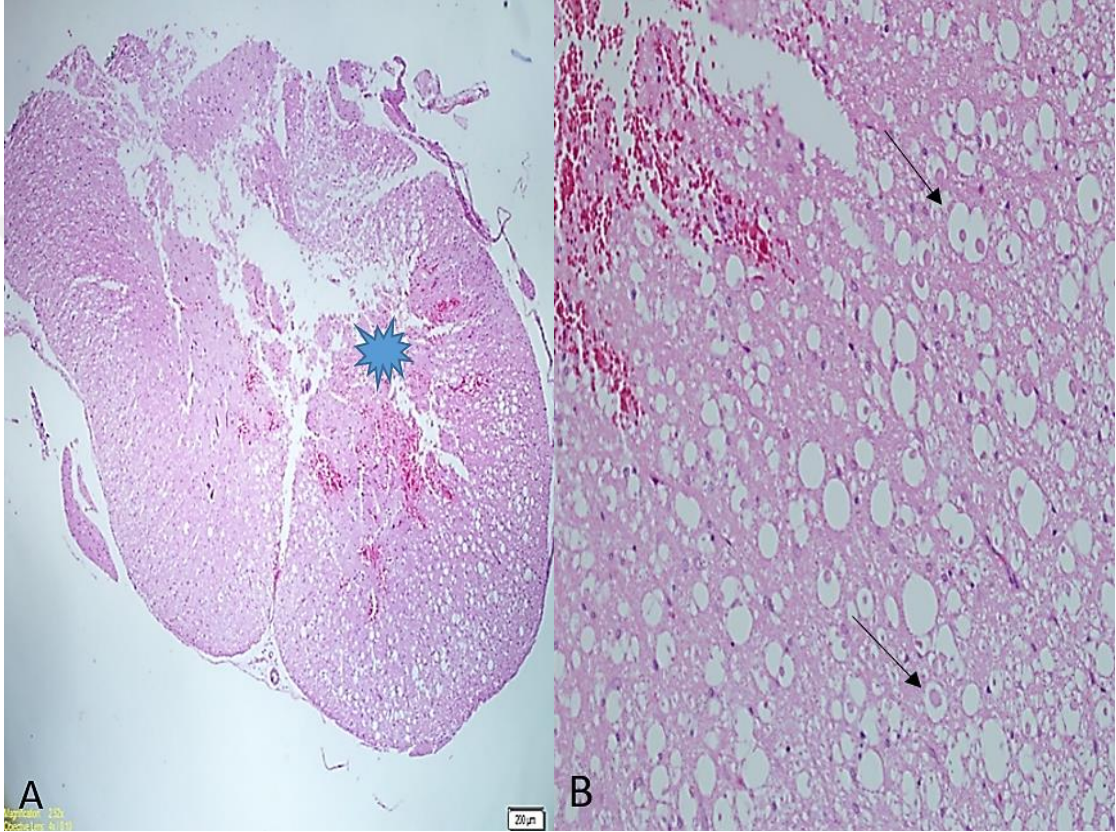


Şekil 4. 4. 1. A-B: Kontrol (Grup 1) grubunda medulla spinalisin normal histolojik yapısının korunduğu izlendi. (Ok işareti: nissle cisimlerinin görüldüğü nöron)



Şekil 4. 4. 2. A: Kontrol (Grup 2) grubunda medulla spinalisin normal histolojik yapısının korunduğu izlendi (HEX40) B: Nükleusu ve nissle cisimcikleri seçilen nöron (Ok işareti) HEX400

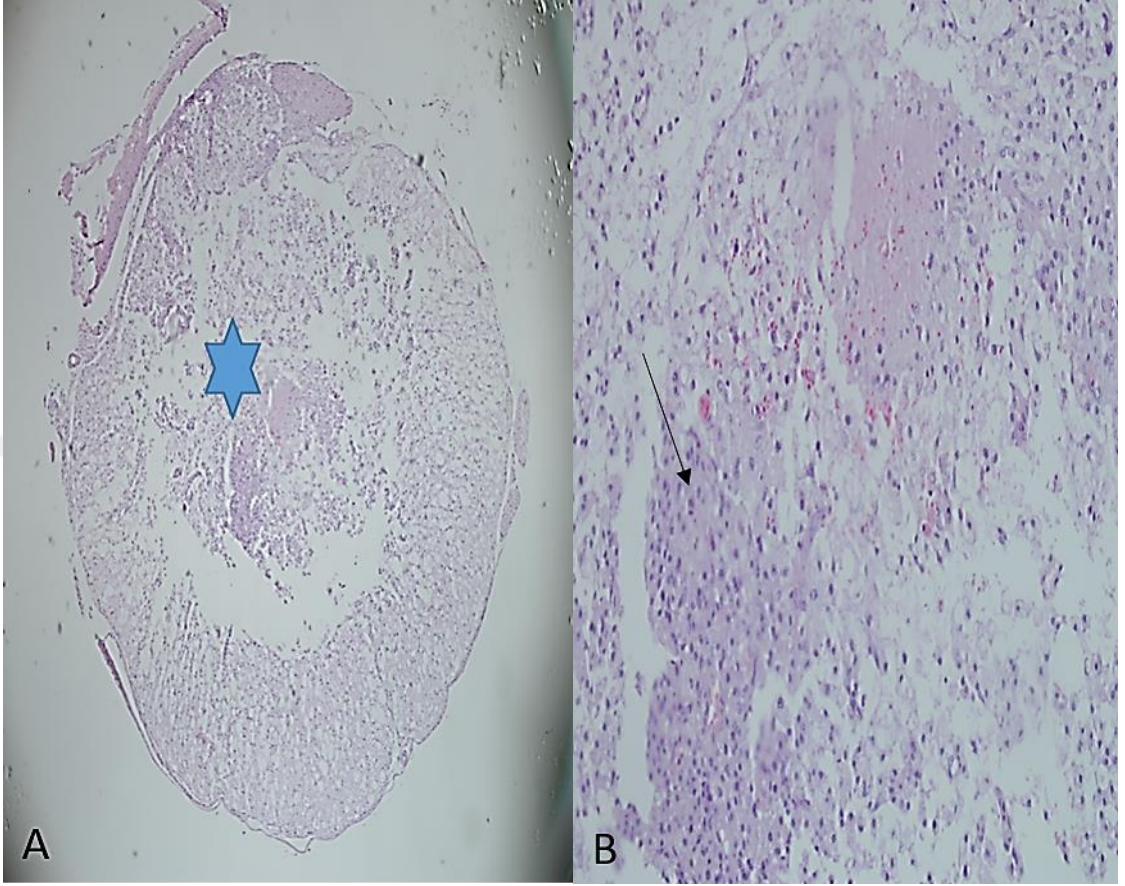
Sham (Grup 3) grubunda 24. saatte H+E ile boyanmış kesitlerde nekrotik alan (+++) olarak değerlendirildi. Gri cevherde belirgin laserasyon, yaygın hemoraji, yoğun ödem ve nöronlarda belirgin dejenerasyon (nissle kayıpları, kırmızı dejenerasyon) vardı. Beyaz cevherde ödem, yoğun aksonal dejenerasyon ve sferül yapıları mevcuttu (Şekil 4. 4. 3). PMNL infiltrasyonu yer yer izlendi ve akut dönemde görmemiz gereken bulgular ile uyumlu idi.



Şekil 4. 4. 3. A: Sham (Grup 3) grubunda belirgin laserasyon, kanama ve hemorajik nekroz (Yıldız ile işaretli) izlendi (HEX40). B: Ödem, aksonal dejenerasyon, vakuolizasyon ve sferüller görüldü (Ok ile işaretli) (HEX200).

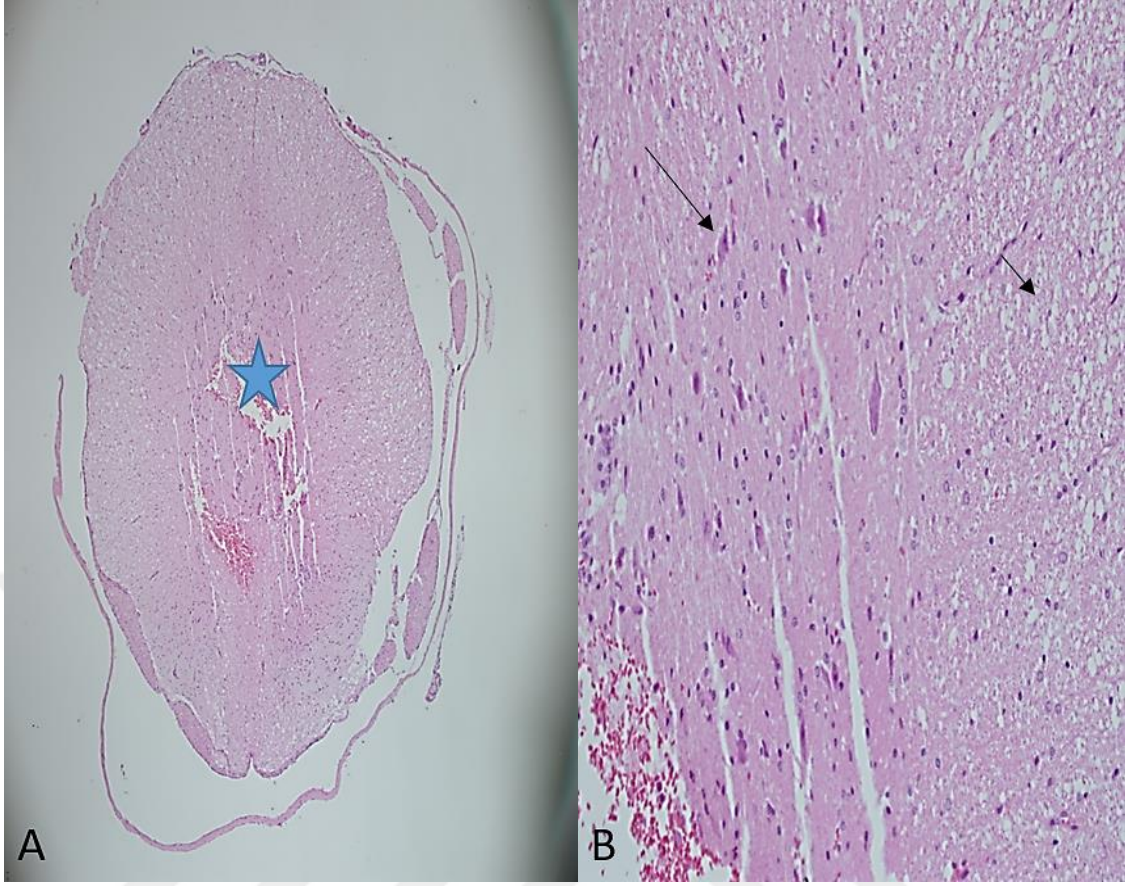
Sham (Grup 4) grubunda travma sonrası 7. günde H+E ile boyanan kesitlerde; gri ve beyaz cevherde laserasyonun, hemorajinin ve ödemin kısmen azaldığı ve nekroz ile birlikte nekrotik hücreler görülmekteydi (++). Birkaç örnekte kist formasyonu dikkati çektii. Yoğun makrofaj infiltrasyonu izlendi (Şekil 4. 4. 4). Nötrofil lökosit infiltrasyonu izlenmedi. Çünkü nötrofil lökosit infiltrasyonu 1. gün başlar, 2. gün pik yapar ve 3. gün ortadan kalkar bu nedenle subakut dönemde nötrofil lökosit infiltrasyonu beklenmez. Subakut dönemde, mikroglialar gitter hücrelerine dönüşür, dolayısıyla görmemiz

gereken makrofajlar ve gitter hücreleridir. Çalışmamızda da buna uyumlu şekilde bulgular mevcuttur.



Şekil 4. 4. 4. A. Sham (Grup 4) grubunda özellikle episantral lokalizasyonda belirgin nekroz (yıldız ile işaretli), aksonal dejenerasyon ve ödem görülmekte HEX40. B. Sham (Grup 4) grubunda nekroz ve yoğun makrofaj infiltrasyonu (Ok ile işaretli) görülmekte HEX200.

Ön koşullama (Grup 5) grubunda 24. saatte H+E ile boyanan kesitlerde; laserasyon, kanama, ödem, nekroz, aksonal ve nöronal dejenerasyon ile nötrofil lökosit infiltrasyonu sham (Grup 3) grubuna göre daha azdı (Şekil 4. 4. 5).



Şekil 4. 4. 5. A: Ön koşullama (Grup 5) grubunda ödem, laserasyon, hemorajik nekroz daha hafif olarak görüldü (Yıldız ile işaretli) HEX40. B: Hafif nöronal ve aksonal dejenerasyon (Uzun ok işaretli gri çevher nöronları, kısa ok beyaz cevher) HEX200

Hemoraji düzeyi, sham (Grup 3) 1.gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.005$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) grubunda hemoraji düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.005$).

Laserasyon düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) grubunda laserasyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

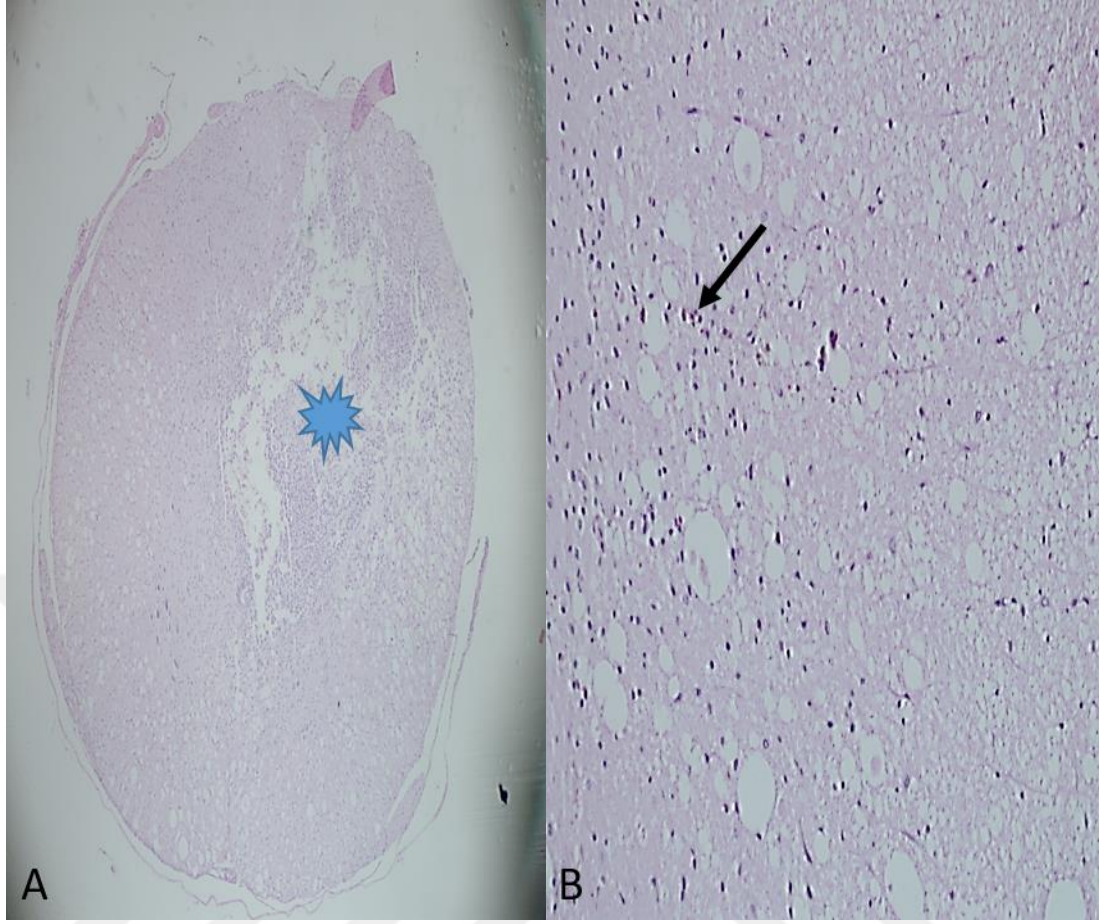
Aksonal ve nöronal dejenerasyon, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$).

Nekroz düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) grubunda nekroz düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.05$).

İnflamatuvar reaksiyon, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.005$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) grubunda inflamatuvar reaksiyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.005$).

Ödem düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) grubunda ödem düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.01$).

Ön koşullama (Grup 6) grubunda travma sonrası 7. günde H+E ile boyanan kesitlerde sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında kanama ve aksonal ve nöronal dejenerasyon açısından belirgin fark bulunmadı. Ancak makrofaj infiltrasyonu, ödem ve nekroz Ön koşullama (Grup 6) grubunda daha azdı (Şekil 4. 4. 6). Nötrofil lökosit infiltrasyonu izlenmedi.



Şekil 4. 4. 6. A. Ön koşullama (Grup 6) grubu nekroz ve makrofaj infiltrasyonu orta şiddette (Yıldız ile işaretli alan) HEx40. B. Aksonal dejenerasyon ve hemosiderin yüklü makrofajlar izlendi (Ok ile işaretli) HEx200.

Hemoraji düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda hemoraji düzeyini azaltmakla birlikte bu azalmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Laserasyon düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 6) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda laserasyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapotik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

Aksonal ve Nöronal Dejenerasyon, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham

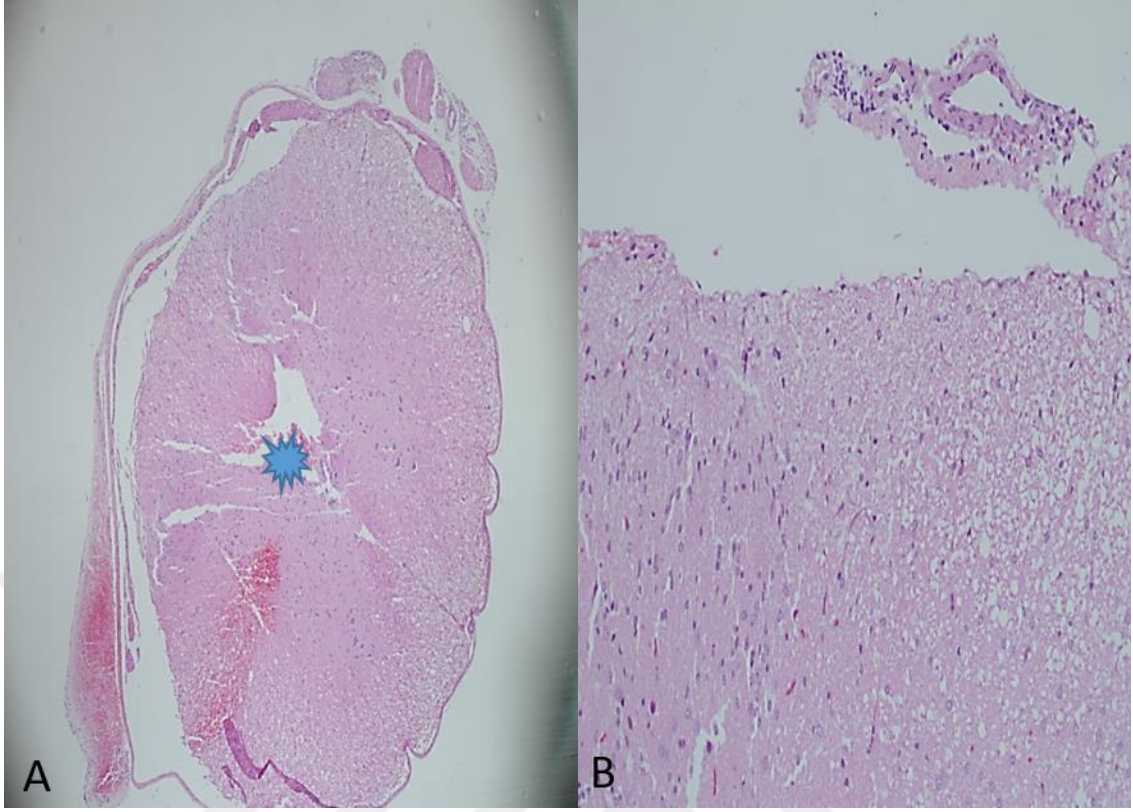
(Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda aksonal ve nöronal dejenerasyon düzeyini azaltmakla birlikte bu azalmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Nekroz düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2), ön koşullama (Grup 6) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda nekroz düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

İnflamatuar reaksiyon, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2), ön koşullama (Grup 6) ($p<0.005$) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu. Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda inflammatuar reaksiyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.005$).

Ödem, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) ve ön koşullama (Grup 6) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda ödem düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu.

Tedavi (Grup 7) grubunda sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında kanama, laserasyon, ödem, aksonal ve nöronal dejenerasyon hafif daha azdı (Şekil 4. 4. 7). Nötrofil lökosit infiltrasyonu tedavi (Grup 7) grubunda sham (Grup 3) grubuna göre daha az yoğunlukta idi.



Şekil 4. 4. 7. Tedavi (Grup 7) grubu: A: ödem, laserasyon, hemorajik nekroz daha hafif olarak görüldü (Yıldız ile işaretli) HEX40. B: Aksonal dejenerasyon ve sferül oluşumu hafif düzeyde HEX200

Hemoraji düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.005$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde tedavi (Grup 7) grubunda hemoraji düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.005$).

Laserasyon düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda hesperidinin laserasyon düzeyini azalttığı ancak istatistiki olarak etkinlik göstermediği bulundu ($p>0.05$).

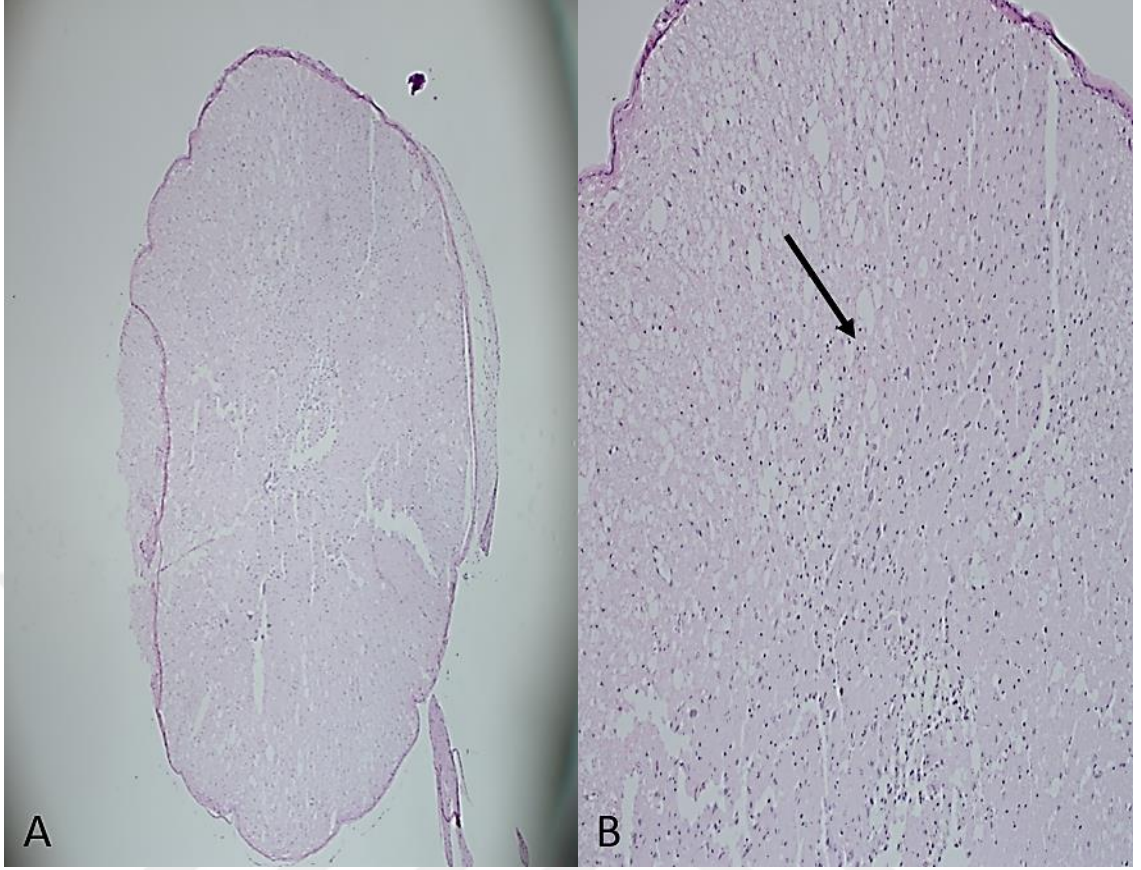
Aksonal ve nöronal dejenerasyon, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde tedavi (Grup 7) grubunda aksonal ve nöronal dejenerasyonu düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.05$).

Nekroz düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.05$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde tedavi (Grup 7) grubunda nekroz düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.05$).

İnflamatuar reaksiyon, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.005$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde tedavi (Grup 7) grubunda inflamatuvar reaksiyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.005$).

Ödem düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 7) grubunda 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.01$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde tedavi (Grup 7) grubunda ödem düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.01$).

Tedavi (Grup 8) grubu 7. günde H+E ile boyanan kesitlerde sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında kanama ve aksonal ve nöronal dejenerasyon açısından belirgin fark izlenmedi. Makrofaj infiltrasyonu, ödem ve nekroz ise daha azdı (Şekil 4. 4. 8).



Şekil 4. 4. 8. A. Tedavi (Grup 8) grubunda hasar bulguları hafifti HEX40. B. Hemosiderin yüklü makrofajlar ok işaretli. HEX200.

Hemoraji düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p < 0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda hemoraji düzeyini azaltmakla birlikte bu azalmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Laserasyon düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda laserasyon düzeyini azaltmakla birlikte bu azalmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Aksonal ve nöronal dejenerasyon düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda aksonal ve nöronal dejenerasyon düzeyini azaltmakla birlikte bu azalmalar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0.05$).

Nekroz düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda nekroz düzeyini anlamlı olarak azaltmıştır ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda nekroz düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

İnflamatuvar Reaksiyon, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) ve tedavi (Grup 8) grubunda 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda inflamatuvar reaksiyon düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

Ödem, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında tedavi (Grup 8) gruplarında 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde tedavi (Grup 8) grubunda ödem düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$).

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

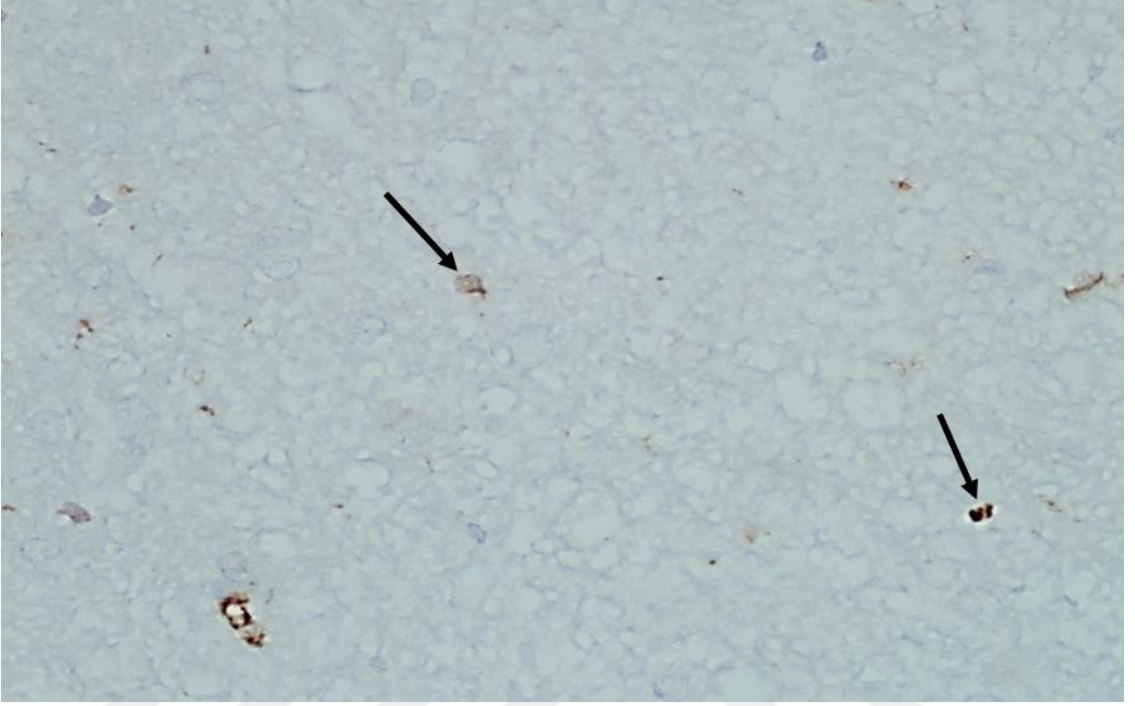
4.5.1. Kaspaz 3'ün İmmünohistokimyasal Bulguları

Çizelge 4.5.1.1. Kaspaz 3'ün istatistikî verileri

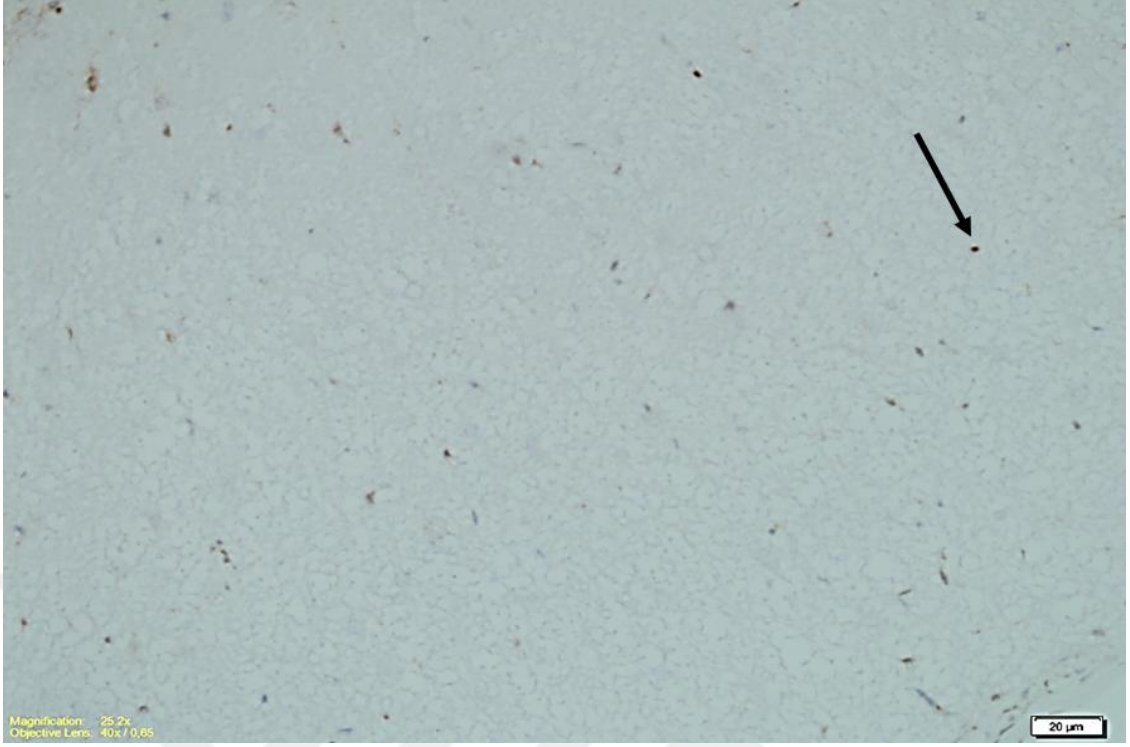
	Kontrol	Sham	Ön koşullama	Tedavi
	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE
Kaspaz 3, 1. gün	4,500±0,327	28,71±2,168	14,50±2,012 ≠	12,42±1,797 ≠
Kaspaz 3, 7. gün	4,375±0,375	28,37±3,530	14,00±1,133 ≠	16,50±1,414 ≠

(≠: kontrol ve sham grubu ile karşılaştırıldığında, $p<0.001$)

24. saat ve 7. günlük kontrol gruplarında Kaspaz 3 ile yapılan boyama preparatlarında birim alanda (x400) pozitif apoptotik hücre sayısı sırasıyla $4,500 \pm 0,327$ ve $4,375 \pm 0,375$ bulundu (Şekil 4. 5. 1. 1 ve Şekil 4. 5. 1. 2).

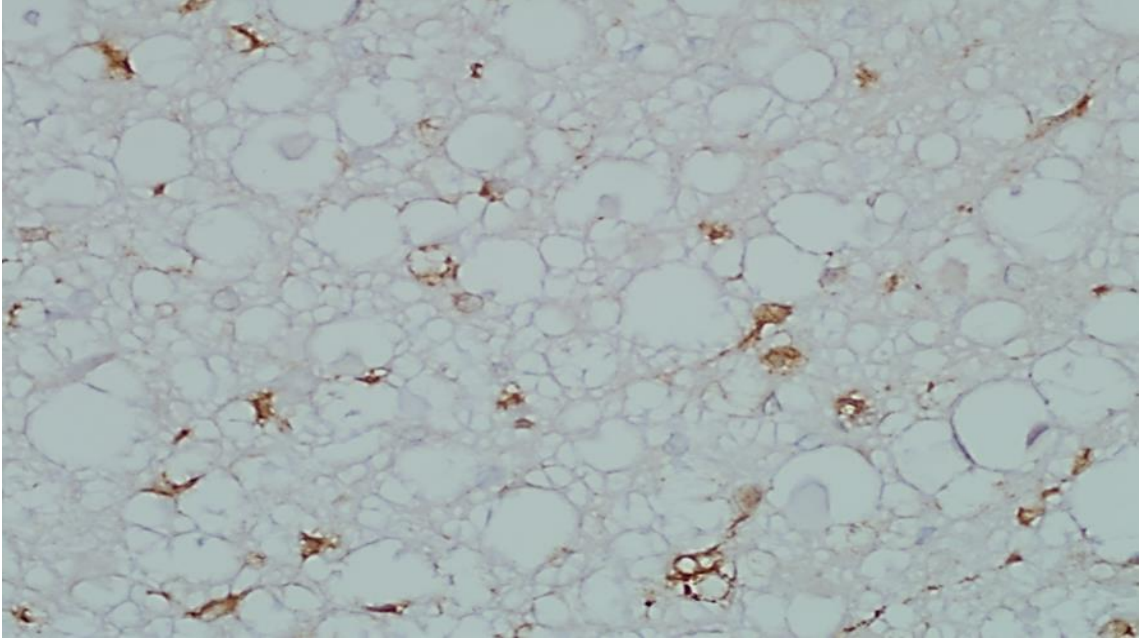


Şekil 4. 5. 1. 1. Kontrol (Grup 1) grubu. Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyamasında nükleusları kahverenkli işaretlenen hücreler apoptotik hücrelerdir. Kaspaz 3 x400



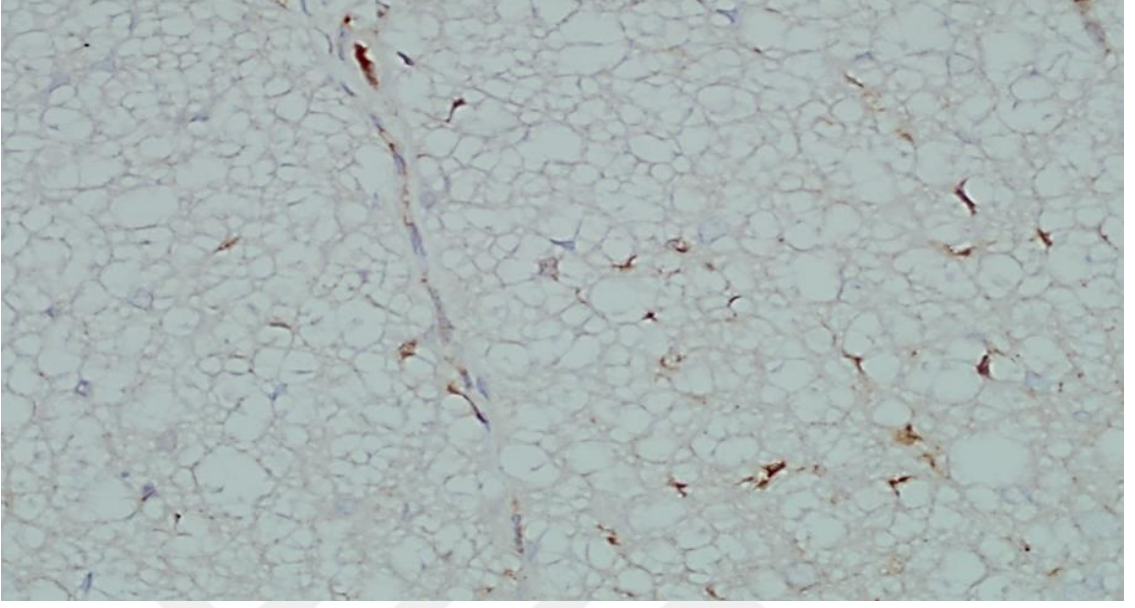
Şekil 4. 5. 1. 2. Kontrol (Grup 2) grubu, Kaspaz 3 ile nükleer boyanan az sayıda apoptotik hücre görülmekte. Kaspaz 3 x400.

Sham (Grup 3) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı $28,71 \pm 2,168$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 3).



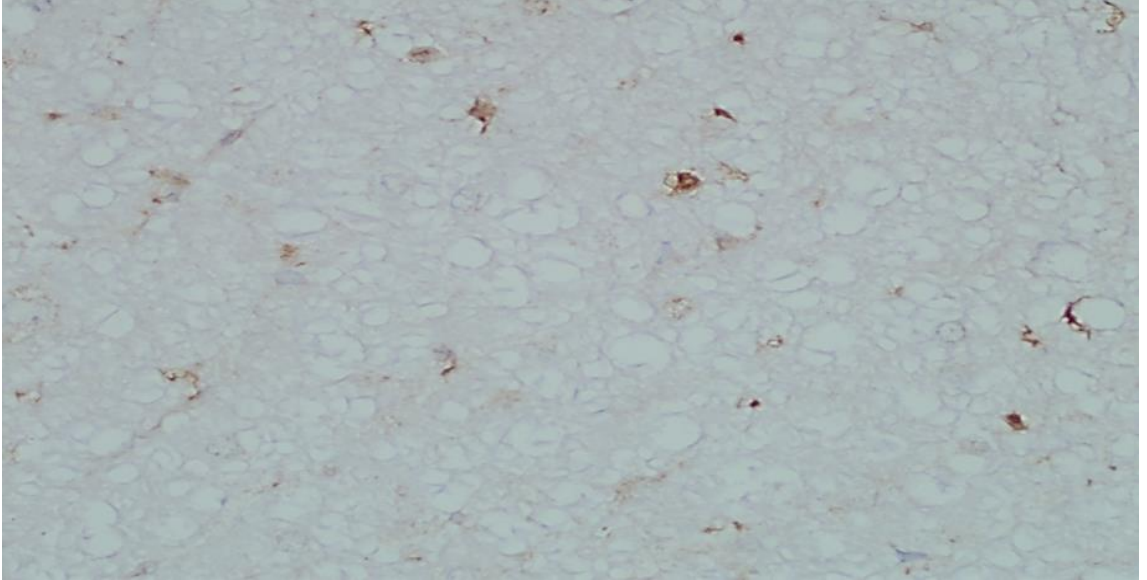
Şekil 4. 5. 1. 3. Sham (Grup 3) grubu, belirgin derecede artmış apoptozis. Kaspaz 3 x400.

Ön koşullama (Grup 5) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı $14,50 \pm 2,012$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 4).



Şekil 4. 5. 1. 4. Ön koşullama (Grup 5) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.

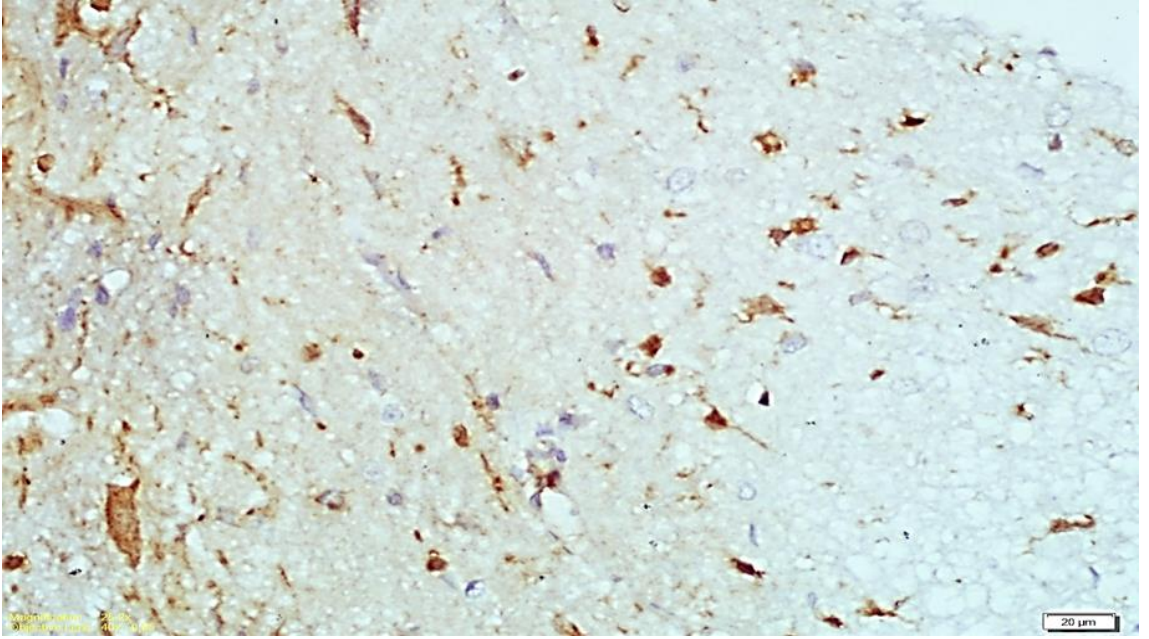
Tedavi (Grup 7) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı ise $12,42 \pm 1,797$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 5).



Şekil 4. 5. 1. 5. Tedavi (Grup 7) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.

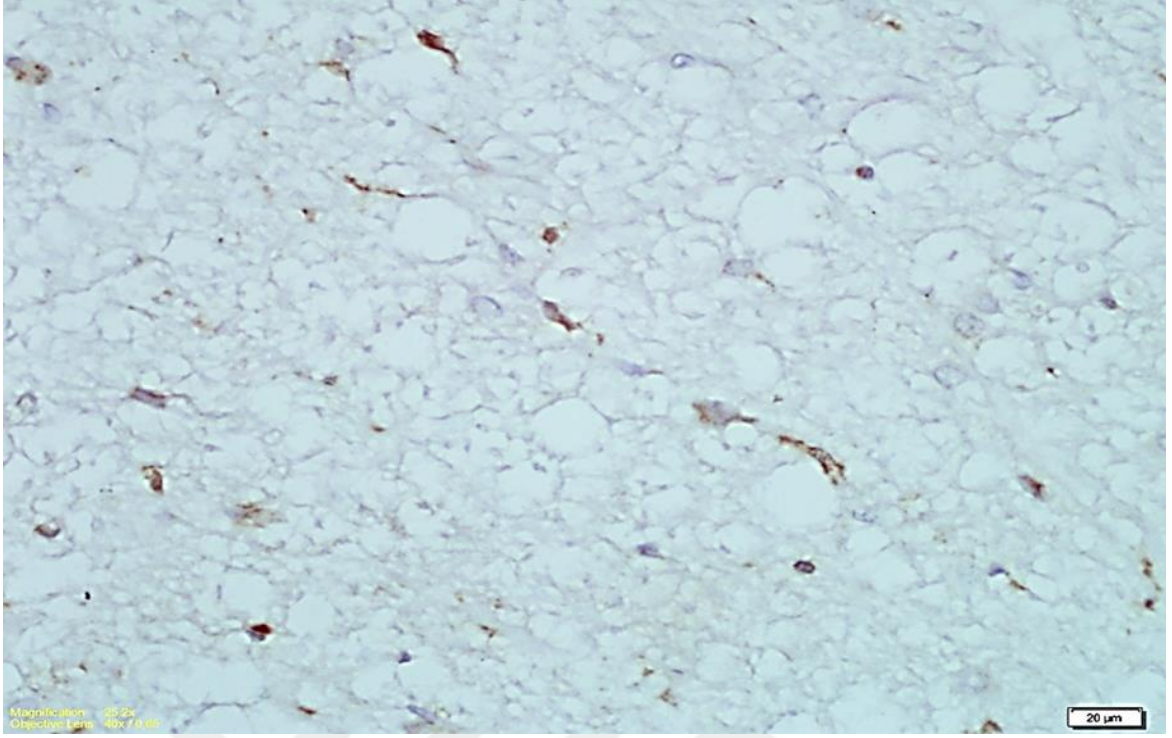
Kaspaz 3 düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 1), ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) gruplarında 1. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) grubunda kaspaz 3 düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$). (Çizelge 4. 5. 1. 1).

Sham (Grup 4) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı $28,37\pm3,530$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 6).



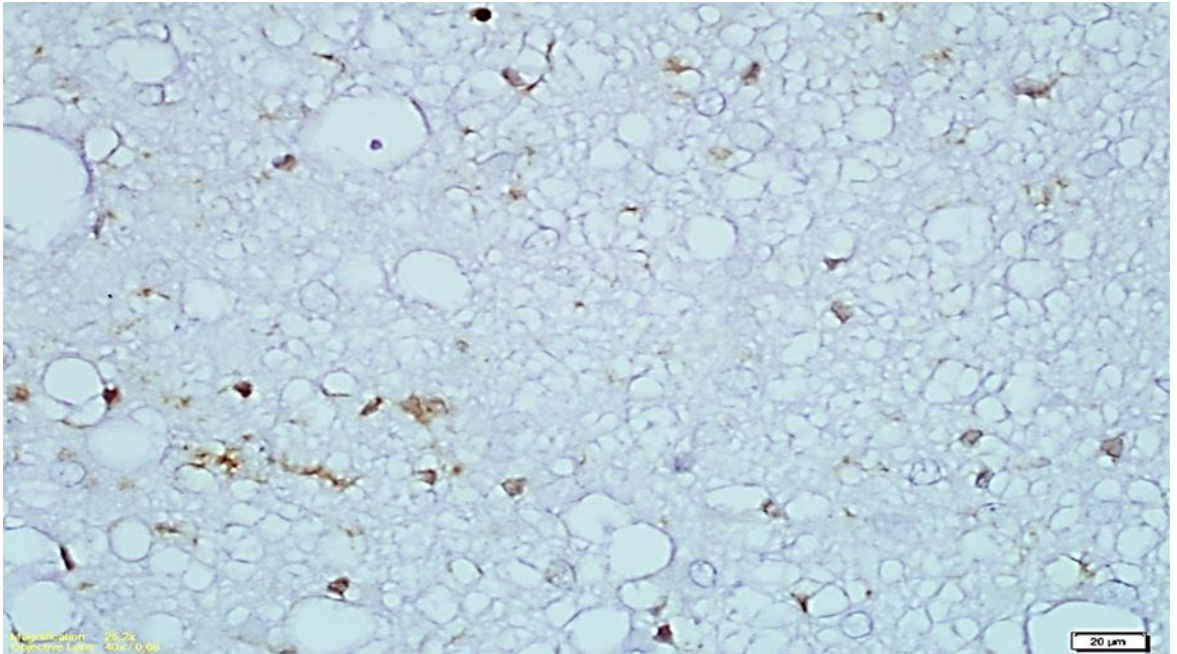
Şekil 4. 5. 1. 6. Sham (Grup 4) grubu, belirgin derecede artmış apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.

Ön koşullama (Grup 6) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı $14,00\pm1,133$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 7).



Şekil 4. 5. 1. 7. Ön koşullama (Grup 6) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.

Tedavi (Grup 8) grubunda birim alana düşen apoptotik hücre sayısı $16,50 \pm 1,414$ olarak bulundu (Şekil 4. 5. 1. 8).



Şekil 4. 5. 1. 8. Tedavi (Grup 8) grubu, apoptotik hücreler. Kaspaz 3 x400.

Kaspaz 3 düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2), Ön koşullama (Grup 6) ve Tedavi (Grup 8) gruplarında 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.001$). Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grubunda kaspaz 3 düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulundu ($p<0.001$). (Çizelge 4. 5. 1. 1).

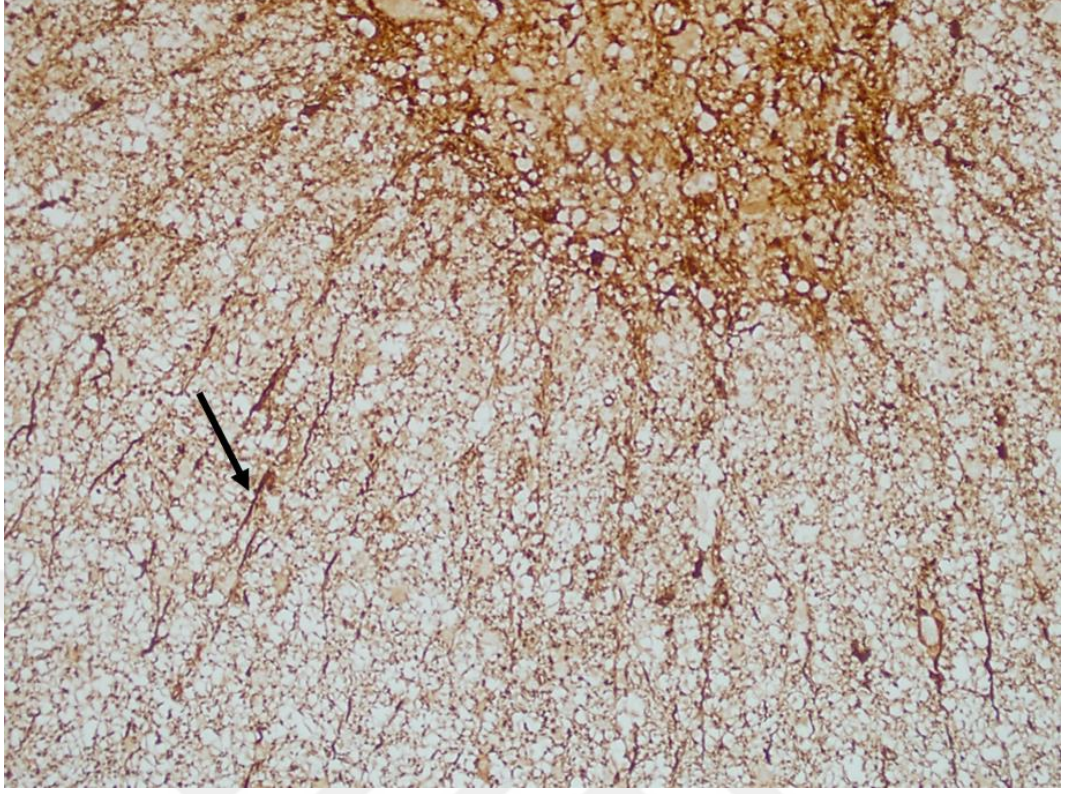
4.5.2. GFAP İmmünohistokimyasal bulguları

Çizelge 4.5.2.1. GFAP değerlerinin istatistiki verileri

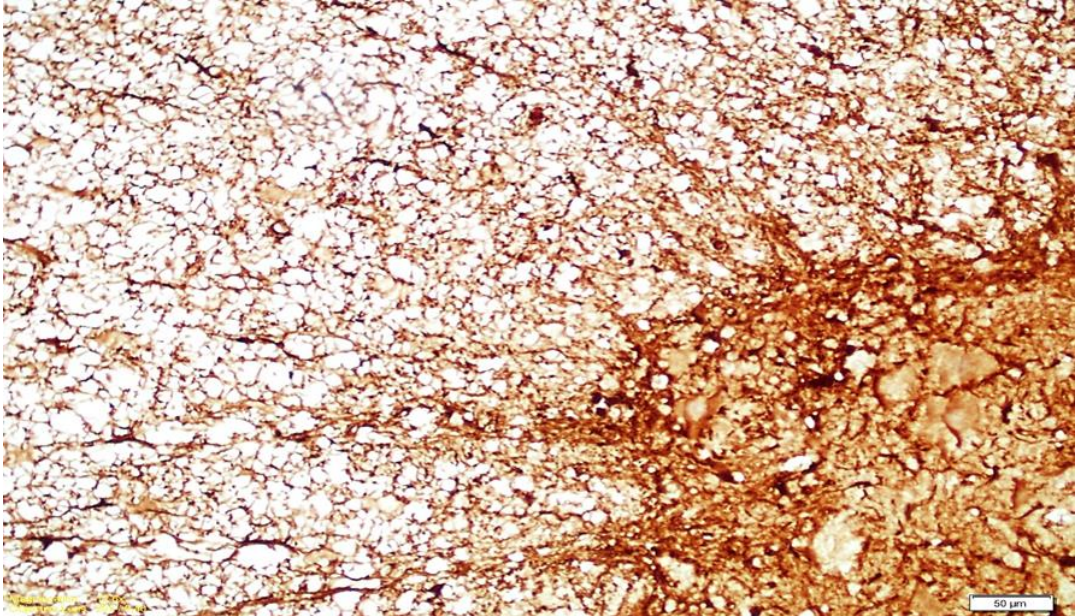
	Kontrol	Sham	Ön koşullama	Tedavi
	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE	Ort±SE
GFAP 1. gün	0,000±0,000	1,714±0,184	1,333±0,210	1,285±0,184
GFAP 7. gün	0,000±0,000	2,750±0,163	1,750±0,250 β	2,125±0,226

(β : sham grubu ile karşılaştırıldığında; $p<0.005$).

Astrositler, merkezi sinir sistemindeki nöronlara destek ve beslenme sağlayan glial hücrelerin en bol türüdür. Reaktif astrogliozis, aksonal rejenerasyonu ve fonksiyonel nöronal iyileşmeyi azaltabilir. Çalışmamızda kontrol gruplarında GFAP ile boyanan reaktif astrositler izlenmedi (Şekil 4. 5. 2. 1 ve Şekil 4. 5. 2. 2).

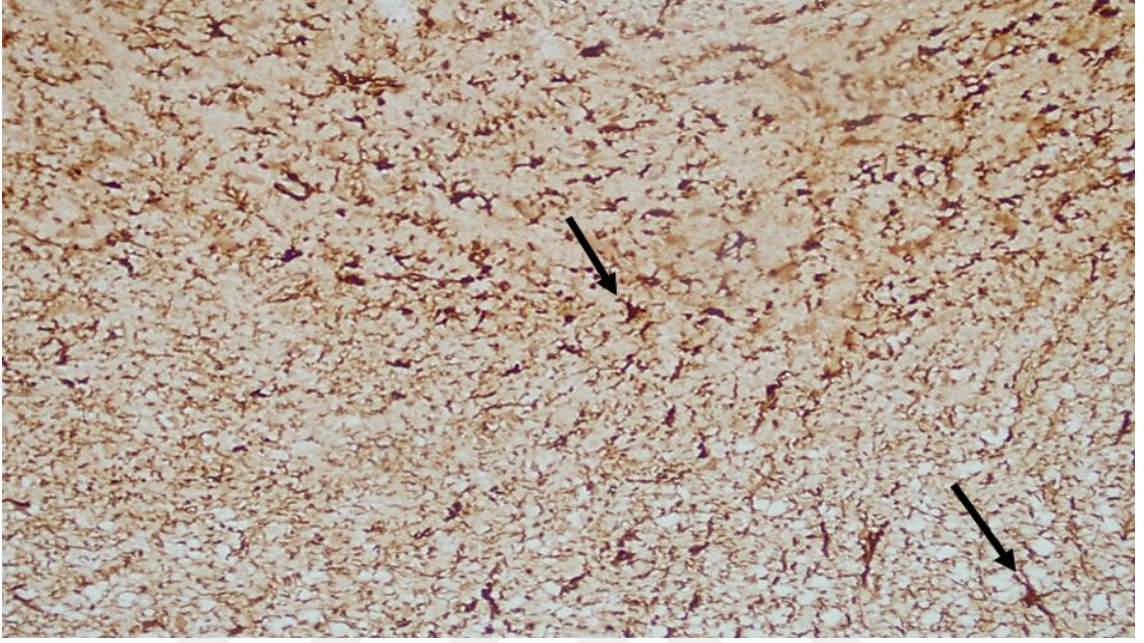


Şekil 4. 5. 2. 1. Kontrol (Grup 1) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrosit görülmemekte. Normal (Ok ile işaretli) morfolojide astrositler izlenmektedir. GFAPX200

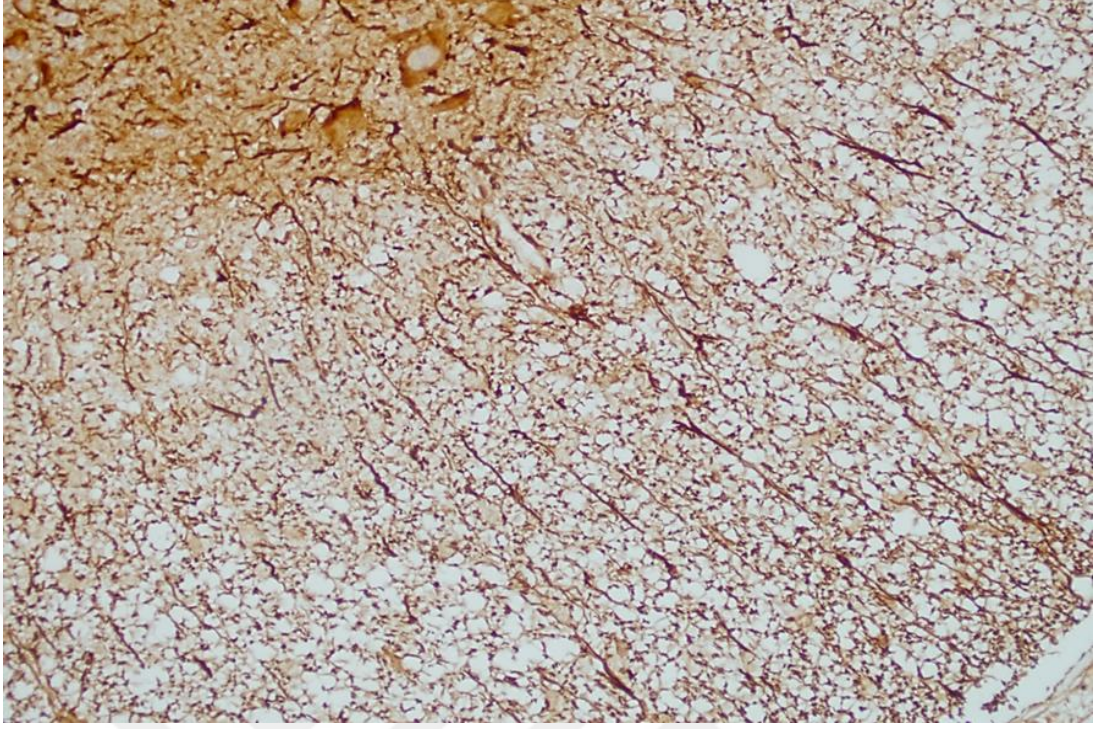


Şekil 4. 5. 2. 2. Kontrol (Grup 2) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrosit görülmemekte. Normal morfolojide astrositler izlenmektedir. GFAPX200

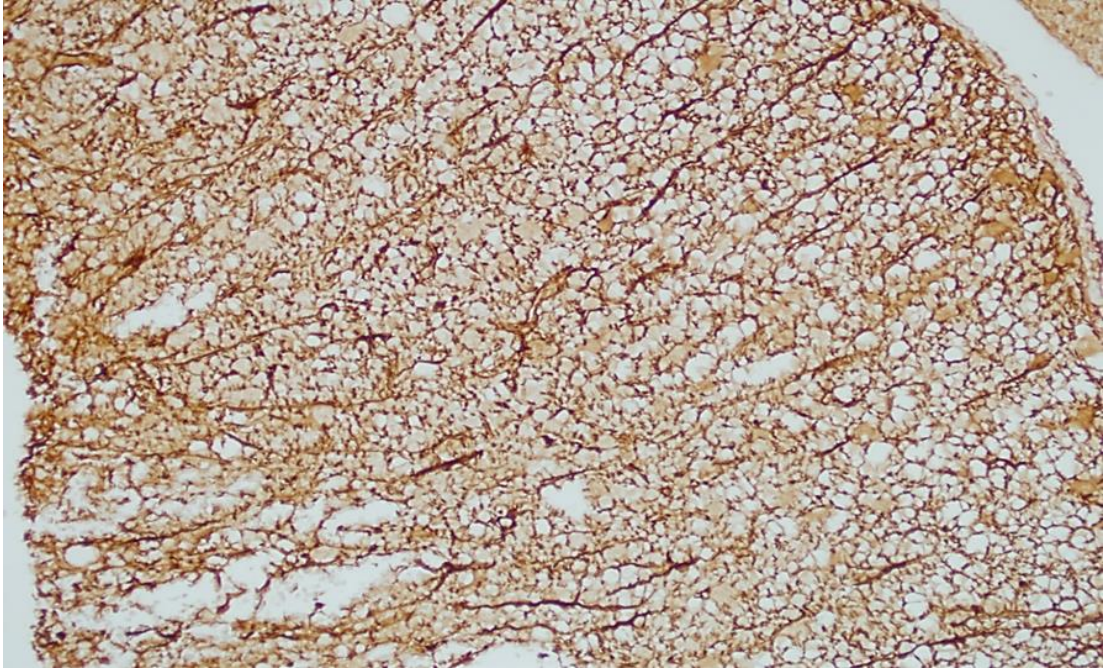
Sham (Grup 3) grubunda orta derece astrogliozis görülürken ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) gruplarında çoğunlukla hafif derecede astrogliozis görüldü (Şekil 4. 5. 2. 3, Şekil 4. 5. 2. 4 ve Şekil 4. 5. 2. 5).



Şekil 4. 5. 2. 3. Sham (Grup 3) grubunda GFAP ile boyanan reaktif astrogliozis görülmekte (ok ile işaretli yıldızsı uzantıları olan astrositler) .GFAPX200



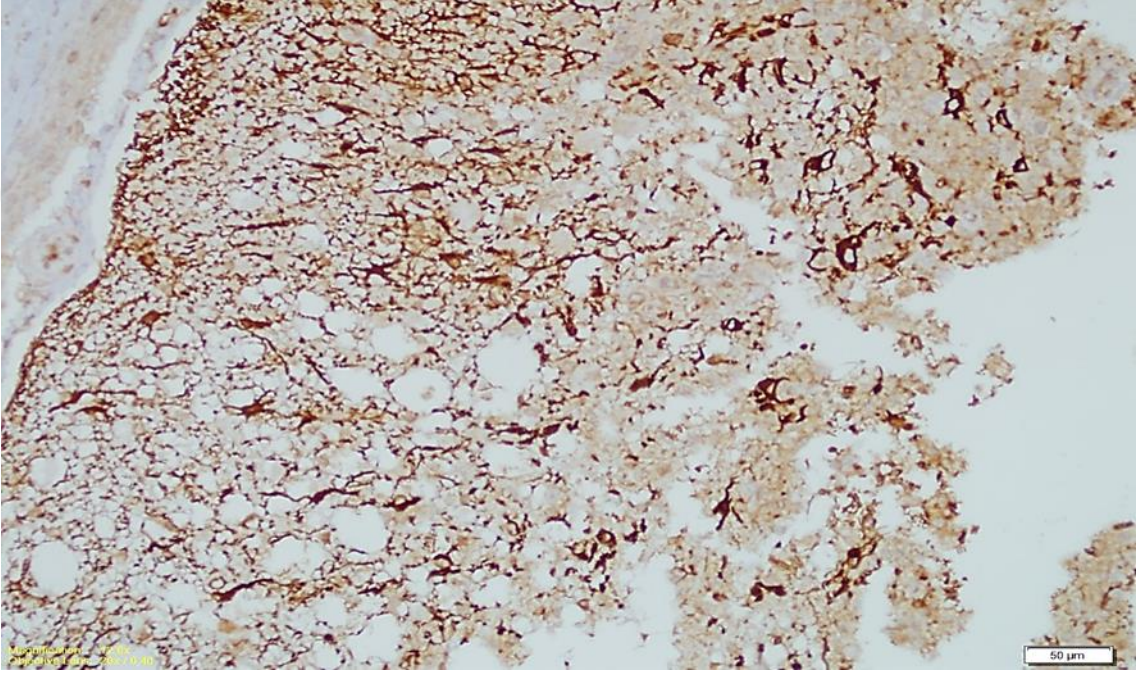
Şekil 4. 5. 2. 4. Ön koşullama (Grup 5) grubunda GFAP boyanan ile hafif şiddette reaktif astrogliozis görülmektedir. GFAPX200



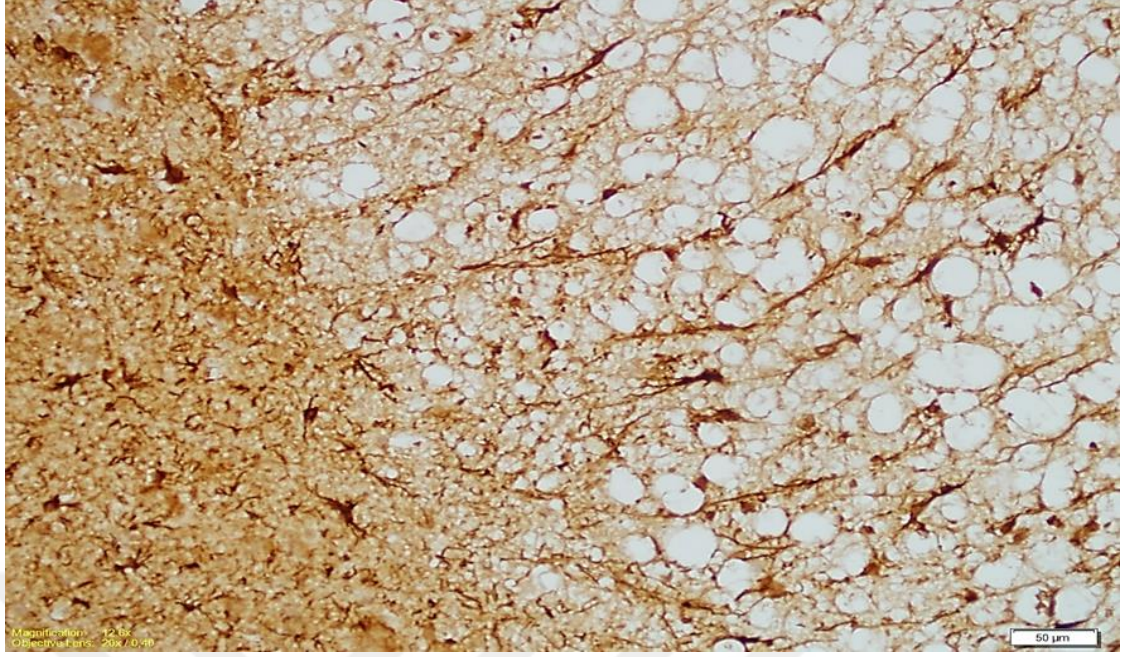
Şekil 4. 5. 2. 5. Tedavi (Grup 7) grubunda GFAP ile boyanan hafif şiddette reaktif astrogliozis görülmektedir. GFAPX200

GFAP düzeyi, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) gruplarında 1. günde istatistiki olarak önemli bir değişiklik bulunmadı ($p>0.05$). (Çizelge 4. 5. 2. 1).

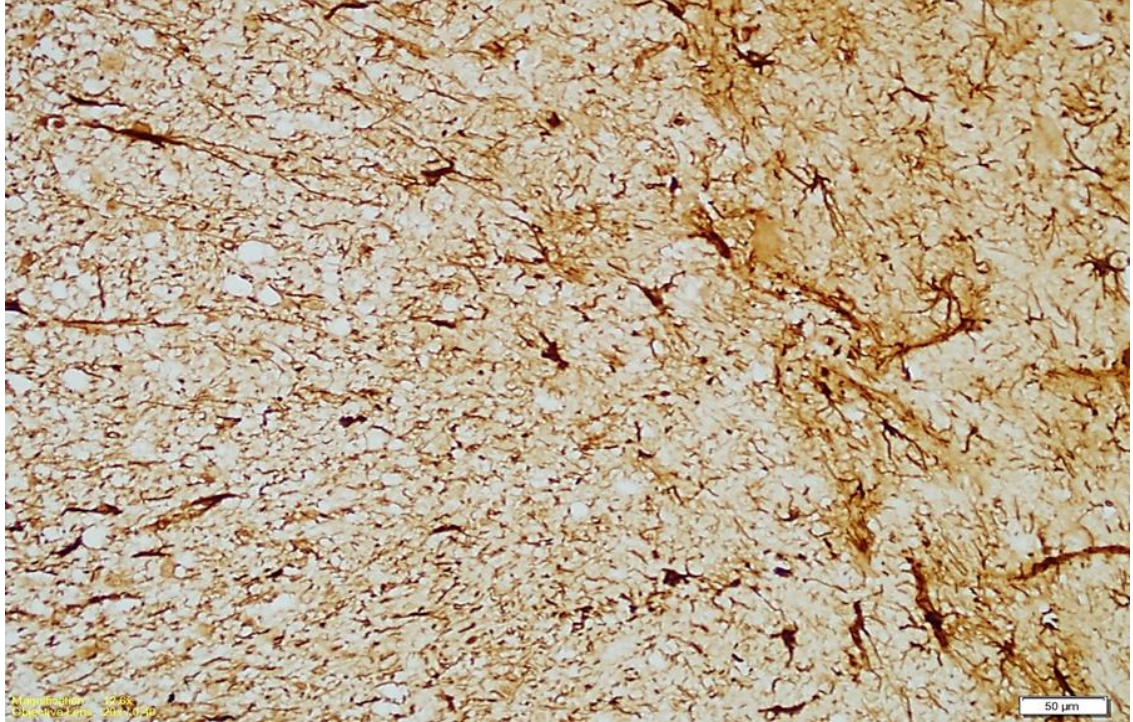
Sham (Grup 4) grubunda yoğun astrogliozis izlendi (Şekil 4. 5. 2. 6). Ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) gruplarında ise astrogliozisin azaldığı saptandı. (Şekil 4. 5. 2. 7 ve Şekil 4. 5. 2. 8). (Çizelge 4. 5. 2. 1).



Şekil 4. 5. 2. 6. Sham (Grup 4) grubunda GFAP ile boyanan şiddetli astrogliozis görülmektedir. GFAPX200



Şekil 4. 5. 2. 7. Ön koşullama (Grup 6) grubunda hafif şiddette astrogliazis alanı. GFAPX200



Şekil 4. 5. 2. 8. Tedavi (Grup 8) grubunda GFAP ile boyanan orta şiddette reaktif astrogliazis görülmekte (ok ile işaretli yıldızlı uzantıları olan astrositler) .GFAPX200

GFAP düzeyi, Sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında kontrol (Grup 2) ve ön koşullama (Grup 6) gruplarında 7. günde önemli düzeyde düşük bulundu ($p < 0.005$).

Sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 7. günde ön koşullama (Grup 6) grubunda GFAP düzeyini azaltarak yangıyı azalttığı ve terapotik etkinlik gösterdiği bulundu. (Çizelge 4. 5. 2. 1).



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, deneysel omurilik hasarında hesperidin kullanımının nöroprotektif ve terapötik etkinliğinin olup olmadığı araştırılmıştır. Hesperidin ile yapılmış birçok dokuda birçok çalışma vardır ancak omurilik yaralanmaları sonrası ortaya çıkan sekonder hasara karşı etkinliği değerlendirilmiş bir çalışma yoktur. Bu çalışma ön koşullu bir çalışmadır ve omurilik travması öncesinde ve sonrasında kullanılan hesperidin nörölojik, histopatolojik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Omurga hasarları, hasta, aile ve ülke ekonomisi üzerinde olumsuz etkilere sahip önemli bir sağlık problemidir. Dünyadaki birçok ülkede genel olarak insidansı yaklaşık milyonda 20-40'tır (Ak ve ark. 2015). Yapılan çalışmalar sonucunda halen evrensel düzeyde kalıcı ve etkili bir tedavi protokolü oluşturulamamıştır (Sengul ve ark. 2013, İstan ve ark. 2014, Rouanet ve ark. 2017). Bununla birlikte medikal ve cerrahi anlamda çok ileri gelişmeler olmasına rağmen tedavi edilemez bir durum olarak kabul edilmiştir (Kim ve ark. 2017). Ancak yapılan çalışmalar sonucunda, motor ya da duyuşal fonksiyonlarda çok az bir iyileşmenin bile hastanın yaşamı üzerinde çok önemli etkileri olacağı bilinmektedir (Rouanet ve ark. 2017).

Sengul ve ark. (2013), birincil yaralanmayı önlemenin imkansız olduğunu, bu nedenle omurilik yaralanmalarında tedavi stratejilerinin sekonder hasarın önlenmesi üzerinde yoğunlaştığını vurgulamışlardır. Çalışmamızda spinal kord hasarı sonrasında oluşacak sekonder hasarların hesperidin ile ne ölçüde önlenebileceği ve klinik anlamda ne kadar fayda sağlayabileceği araştırılmıştır.

Sekonder hasarları azaltmayı amaçlayan nöroprotektif ajanlar spinal kord hasarında önemli bir yer tutar (Rouanet ve ark. 2017). Bilim insanları spinal kord yaralanmasının patofizyolojisini anlayabilmek için uzun süre hayvan omurilik kontüzyon modellerini kullanmışlardır. Kontüzyon modelleri omurilik yaralanmasında progresif sekonder doku hasarı, demiyelinizasyon ve apoptozisin keşfedilmesinde önemli bir rol oynamıştır (Young 2002). Parhiz ve ark. (2015), kullanılan deney modelindeki farklılıkların,

hesperidin ile ilgili çalışmaların sonuçlarını etkileyebileceğini ve ayrı bir yorumlama gerektirebileceğini vurgulamışlardır.

Omurilik yaralanmasının rat modelleri, tedavi stratejilerini değerlendirmek ve omurilik yaralanmalarının patolojik temelini anlayabilmek için önemli memeli bir modeldir ve lokomotor ve duyuşal işlevlerin geri kazanımını değerlendirmek için sağlam testlerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır (Kjell ve Olson 2016). Ayrıca ratlar, nispeten ucuz ve halihazırda kolay buldukları ve spinal kord yaralanması sonrası insanlara benzer işlevsel, elektrofizyolojik ve morfolojik sonuçlar ortaya çıktığı için ön çalışmalarda yaygın olarak da tercih edilir (Cheriyen ve ark. 2014). Kjell ve Olson (2016), rat omuriliğinde farklı seviyelerde tam ve tam olmayan omurilik yaralanma modelleri oluşturulabileceğini, bununla birlikte, servikal düzeyde oluşturulacak iki taraflı yaralanmalara hem ön hem de arka ayakları felç edeceği için etik olarak sıcak bakılmadığını bildirmişlerdir. Cheriyen ve ark. (2014) ise bunun aksine omurilik hasar oluşturulduğunda daha çok torakal seviye tercih edilmekle birlikte klinik öneminden dolayı servikal düzeydeki omurilik yaralanma modellerine odaklanıldığını bildirmişlerdir. Yine Kjell ve Olson (2016), aşağı torakal seviyelerde oluşturulan tam omurilik yaralanmasının arka ayaklarda kalıcı felç oluşturduğunu ve duyuşal ve otonomik sistem fonksiyonlarını bozduğunu söylemişlerdir. Mesanenin manuel olarak boşaltılması ve üriner enfeksiyonların ve yaraların tedavisinin sağlanması şartıyla, bu hayvanların birkaç ay boyunca kontrol edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Sharif-Alhoseini ve ark. (2017), spinal kord hasarı hayvan modellerini değerlendirdikleri bir çalışmada yapılan 2209 adet deneysel spinal kord hasarının 1599'unda (%72.4) rat kullanıldığını bildirmişlerdir. Kjell ve Olson (2016), kontüzyon yaralanmalarının tipik olarak bir ağırlık cihazı kullanılarak gerçekleştirildiğini ve omuriliğe etki eden hızlanan bir çubuğun neden olduğu bir kontüzyon yaralanması, insanların maruz kaldığı yaralanmalara model olarak daha yakın olduğunu belirtmişlerdir. Ancak Cheriyen ve ark. (2014), insan spinal kord yaralanmasının karmaşıklığı göz önüne alındığında, hiçbir modelin yaralanmaların tüm yönlerini kapsayamadığını belirtmişler ve kullanılacak modelin çalışma hedeflerine, spesifik parametrelere ve araştırmanın kaynaklarına bağlı olduğunu bildirmişlerdir. Bizim

çalışmamızda hayvan türü olarak rat kullanıldı, yaralanma modeli olarak ise ağırlık düşürme ile oluşturulan kontüzyon modeli tercih edildi.

Çalışılan en yaygın omurga bölgesi torasik (1790,% 81) bölgedir, sonra servikal (265,% 12), lomber (113,% 5.1), sakral (16,% 0.7), diğer (16,% 0.7) ve bilinmeyen (64,% 2.9) şeklinde devam etmektedir. Literatür temelinde, torasik spinal kord hasar modellerinin güvenilir ve yeniden yapılabilirliği kolaydır. Yaralanma mekanizması olarak ise, mekanik travmatik yaralanma (% 94.5) ve mekanik olmayan yaralanma (% 5.5) olarak sınıflandırılmıştır (Sharif-Alhoseini ve ark. 2017). Çalışmamız da literatürlerle uyumlu olarak T7-T10 torakal vertebra seviyesi tercih edilerek ağırlık düşürme yoluyla mekanik yaralanma oluşturulmuştur.

Tüm ratlarda travma oluşturulduktan sonra aynı düzeyde nörolojik defisit şekillenmesi ve akut dönemde kontrol grupları ile sham grupları değerleri arasındaki anlamlı farklılıklar ($p<0.05$), deneysel modelin güvenilir olduğu anlamına gelir.

Hesperidin (3, 5, 7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside), özellikle narenciye türlerinde (Citrus aurantium, Citrus sinensis ve Citrus unshiu) yoğun olarak bulunan glikozidik yapılu bir flavonoiddir (Crozier ve ark. 2009). Hesperidinin antiinflamatuvar, analjezik, sedatif (Carballo-Villalobos ve ark. 2016), hipolipidemik (Kalpana ve ark. 2009), hiperkolesterolemik (Chen ve ark. 2010) antidepresan, hipoglisemik, hepatoprotektif, hiyaluronidaz inhibisyonu (Duganath ve ark. 2014), antiaterojenik (Visnagri ve ark. 2014), antimikrobiyal, antiplatelet, antiradikal, antimitojenik (Guo ve ark. 2014), antiviral, antifungal (Kaur ve ark. 2006), antiülser (Suarez ve ark. 1998), nöroprotektif (Hwang ve Yen 2008), antialerjik, antihipertansif (Ciftci ve ark. 2015), vazodilatatör (Wilmsen ve ark. 2005), antilipoperoksidan, antiiskemik (Cao ve ark. 1997), kemik kaybını önleme (Xiong ve ark. 2016), antihemoroidal (Alam ve ark. 2014), antidiyabetik, antiinflamatuvar, antiproliferatif, antitrombotik, antitiroidojenik, hepatoprotektif, östrojenik, böcek öldürücü ve antioksidan aktiviteler de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları gösterilmiştir (Orhan ve ark. 2010). Epidemiyolojik çalışmalar, antioksidanların nörodejenerasyonun ilerlemesini geciktirebileceğini göstermiştir (Banji ve ark. 2014). Hosseinimehr ve Nemati (2006) ise hesperidin'in antioksidan kapasitesinin başka bir flavonoid olan Quercetin kadar yüksek etkili olmadığını söylemişlerdir. Çalışmamızda da özellikle akut evrede TAS düzeylerini

anlamli ölçüde artırarak ($p<0.01$) antioksidan özellik göstermiştir (Çizelge 4. 3. 2). Yapılan deneysel çalışmalarda hesperidinin birçok dokuda olumlu yönde etkinliği gösterilmiştir. Ancak spinal kord üzerindeki etkinliği henüz değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda spinal kord travmaları sonrası oluşan hasarda hesperidinin koruyucu ve tedavi edici etkinliği araştırıldı.

Onifer ve ark. (2007) spinal kord hasarlarında, fonksiyonel sonuçların değerlendirilmesinde birçok analiz yönteminin kullanıldığını ve bunlar arasında Gale ve ark. (1985) modifiye ettiği Modifiye Tarlov Skalası, Basso, Beattie ve Bresnahan (BBB) lokomotor değerlendirme ölçeği, ayak izi analizi, yürüme analizi ve kinematik olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda Modifiye Tarlov Skalası kullanılmıştır. Gale ve ark. (1985) yaptığı bir spinal kord yaralanma modelinde, 10 g ağırlığındaki bir metal, sekizinci torakal omur seviyesine 2.5, 5, 10 ve 17.5 cm yükseklikten düşürülerek nörolojik fonksiyonları değerlendirilmiştir. Değerlendirme kriterlerini Modifiye Tarlov Skalası, eğik zemin testi, parmak açma testi, ayak yerleştirme refleksi, çekme refleksi, doğrulma refleksi, sıcak zemin ve yüzme refleksleri oluşturmuştur (Gale ve ark. 1985). Çalışmamızda spinal kord hasarı sonrası nörolojik bozukluğun derecesini değerlendirmek için Modifiye Tarlov Skalası, eğik zemin testi ve parmak açma testlerini kullanıldı.

Şirin ve ark. (2012) yapmış oldukları bir rat spinal hasar çalışmasında operasyon sonrası hiçbir grupta Modifiye Tarlov Skalası değerlerinde değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (1997) ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada T8 seviyesinden omuriliğe kompresyon uygulamışlar ve kombine antiinflamatuvar tedavisi ile Tarlov Skalasında lokomotor iyileşme sağladıklarını belirtmişlerdir. Çalışmamızda Modifiye Tarlov Skalası değerleri, kontrol grupları ile 1. günde sham grupları, ön koşullama grupları ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.001$). Modifiye Tarlov Skalası (MTS) değerlerine bakıldığında, ön koşullama gruplarında MTS değerlerinin diğer gruptakilerden yüksek çıkması, travma öncesi içirilen hesperidinin travmayı takiben klinik anlamda etkili olabileceğini ortaya koymuştur. Sham grupları arasındaki değerler kıyaslandığında MTS değerlerinde artış olması travmanın hemen sonrasında şekillenen hasarın bir haftalık süreçte vücudun antiinflamatuvar yanıtına bağlanabilir. Sham (Grup 3) ile ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) grupları

karşılaştırıldığında hesperidinin birinci günde klinik yararının olabileceği ortaya konmuştur. Sham (Grup 4) ile ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grupları karşılaştırıldığında hesperidin birinci günde ön koşullama (Grup 6) grubunda önemli bir klinik yarar sağlarken, tedavi (Grup 8) grubunda ise bir fark görülmemiştir. Sham (Grup 4), ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grupları, üçüncü ve yedinci günde kıyaslandığında MTS değerlerinin ön koşullama (Grup 6) grubunda diğerlerinden daha yüksek bulunması travma öncesi içirilen hesperidinin klinik anlamda fayda sağladığını ortaya koymuştur.

Birçok çalışmada, spinal kord hasarından sonra ratlarda fonksiyonel sonucu değerlendirmek için eğimli düzlem kullanılmıştır (Onifer ve ark. 2007, Sharif-Alhoseini ve ark. 2017). Gale ve ark. (1985) deneysel spinal kord travmalarında eğik zemin testinde sağlıklı hayvanlardaki eğik zemin açısının 50°-60° olduğunu bildirmişlerdir. Onifer ve ark. (2007) ise eğik zemin testinde eğik zeminin normal açısının 80° olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda bu değer kontrol gruplarında sırasıyla 81,87±2,03; 82,75±1,99 çıkmıştır (Çizelge 4. 2. 2. 1). Eğik zemin testi değerlerinde 1. günde kontrol grupları ile ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p<0.005$). Yine 1. günde sham (Grup 3) ve tedavi (Grup 7) grubu arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Hesperidin kullanımı klinik anlamda birinci günde fayda sağlamazken, yedinci günde yararlı etkileri olduğu söylenebilir (Çizelge 4. 2. 2. 1).

Sharif-Alhoseini ve ark. (2017) 2209 çalışmanın dahil edildiği bir derlemede refleks değerlendirilmesinde parmak açma refleksinin önemini vurgulamışlardır. Berg ve Rucker (1985) 50 g/cm ile oluşturdukları spinal kord hasarından 4 hafta sonra parmak açma testi değerlerinde bir değişiklik olmadığını bildirmişlerdir. Gale ve ark. (1985) 175 g/cm ile oluşturdukları spinal kord hasarından 4 hafta sonra parmak açma testi değerlerinde azalma olduğunu vurgulamışlardır. Şirin ve ark. (2012) 50 g/cm ile oluşturdukları spinal kord hasarından sonra parmak açma testi değerlerinde belirgin azalma görüldüğünü söylemişlerdir. Çalışmamızda da parmak açma testi değerlerinde travma sonrası azalma görülürken, hesperidin kullanılan gruplarda artış görülmüştür (Çizelge 4. 2. 3. 1). 1. günde kontrol grupları ile sham, ön koşullama ve tedavi grupları arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p<0.001$). 1. günde sham (Grup 3) grubu ile ön koşullama (Grup 5) grubu arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Yine 7.

günde sham (Grup 4) grubu ile ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grubu arasındaki farklar önemli bulunmuştur ($p < 0.05$). Parmak açma testi değerlerine bakıldığında sham grubu ile karşılaştırıldığında hesperidin kullanımının klinik anlamda fayda sağladığı söylenebilir.

Serbest radikal üretimindeki artma ve antioksidan mekanizmadaki azalma oksidatif stres ile sonuçlanır. Bundan dolayı, antioksidan seviyelerindeki azalma veya metabolitlerindeki artma oksidatif stresi gösterebilir (Eken 2016). Ancak, bu tür değişiklikler klinik olarak anlamlı veya patojenik bir olayı yansıtmayabilir ve sadece antioksidan savunma sisteminin çalıştığını gösterir (Blumberg 2004). Antioksidan mekanizma reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisini azaltmak veya tamamen yok etmek için vardır. Bunu enzimatik ve nonenzimatik olmak üzere iki şekilde yapar. Enzimatik olarak, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz enzim sistemleri ile nonenzimatik olarak ise özellikle C ve E vitaminleri, proteinler, indirgenmiş glutatyon ve β -karoten gibi maddeler ile sağlar (Kılıç ve ark. 2015). Tamilselvam ve ark. (2013), yaptıkları in vitro nörodejenerasyon modelinde hesperidin ROS üretimini baskıladığı, antioksidan enzimlerden GPx (Glutatyon peroksidaz), SOD (Süperoksit dismutaz) ve CAT (Katalaz) aktivitesini arttırırken, hücre içi antioksidan molekül olan GSH (Glutatyon) düzeyini ise anlamlı derecede arttırdığını rapor etmişlerdir. Yine Khan ve Parvez (2015), nöronal metal toksikasyonu modelinde hesperidin hücrelerde GSH seviyelerini anlamlı derecede arttırarak nöroprotektif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yine aynı şekilde Javed ve ark. (2015), yaptıkları streptozotosin uyarımlı fare duyu kaybı modelinde hesperidin artan konsantrasyonlarda GSH seviyesini önemli seviyelerde arttırarak koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Liu ve ark. (2017), yaptıkları rat diabetik retinopati modelinde hesperidin özellikle SOD, CAT enzim ve GSH miktarlarını arttırarak antiapoptotik etkinlik gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Selmi ve ark. (2017), in vivo alkol uyarımlı oksidatif stres ve peptik ülser modelinde, hesperidin 50 mg/kg/gün uygulaması sonrası artan hidrojen peroksit ve malondialdehit (MDA) gibi total oksidan kapasiteyi yansıtan parametre değerlerini anlamlı derecede azalttığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte hesperidin, antioksidan kapasite parametrelerinden SOD, CAT ve Gpx enzim aktivitesini anlamlı derecede arttırdığını bildirmişlerdir. Li ve ark. (2016), in vitro UV uyarımlı deri oksidatif stres ve yangı modelinde, hesperidin SOD aktivitesini arttırarak antioksidan etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Ansar ve ark.

(2017), yaptıkları çinko oksit nanopartikülü uyarımlı nörotoksitede hesperidinin CAT, GPx ve GR (Glutasyon redüktaz) enzim aktivitesi ile hücreiçi GSH miktarını arttırarak antioksidan etkinlik gösterdiğini rapor etmişlerdir. Antunes ve ark. (2014), yaşlı farelerde 6-hidroksidopamin ile Parkinson hastalığı oluşturmuşlar ve hesperidinin, dopamin seviyesini arttırarak ve reaktif oksijen türlerini azaltarak davranışsal parametrelerde iyileşme sağlandığını bildirmişlerdir. Tirkey ve ark. (2005), ratlarda karbon tetraklorid ile karaciğer ve böbrek üzerinde oluşan oksidatif stresin hesperidin ile azaldığını bildirmişlerdir. Ciftci ve ark. (2015), farelerde deneysel oluşturdukları otoimmün ensefalomyelitis'in tedavisinde hesperidinin antioksidatif ve radikal süpürücü etkilerinde dolayı yarar sağladığı sonucuna varmışlardır. Michel de Oliveira ve ark. (2013), ratlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada egzersiz ile artan oksidatif strese karşı hesperidinin antioksidan kapasiteyi arttırdığını ortaya koymuşlar ve kalp sağlığı açısından da faydalı olabileceği kanısına varmışlardır. Yine Bensaoula ve ark. (2016) da, diyabetik ratlarda kullanılan hesperidinin antioksidan özelliği ile serbest radikalleri nötralize ederek sinirsel davranış bozukluklarında faydalı olabileceğini vurgulamıştır. Cho (2006), yapmış olduğu in vitro bir çalışmada hesperidin ve hesperetinin, nöroprotektif etkilerini incelemek için nöronal ve nöronal olmayan hücreleri içeren sıçan kortikal hücrelerinin birincil kültürleri kullanmış ve kültürlenmiş hücreleri H₂O₂ veya X/XO'ya maruz bırakarak oksidatif nöronal hücre hasarı oluşturmuştur. Hem hesperidinin hem de hesperetinin, H₂O₂ kaynaklı oksidatif hasarı önemli ölçüde azalttığını ama hesperidinin X/XO kaynaklı oksidatif hasarda etkisiz kaldığını tespit etmiştir. Bununla beraber radikal süpürücü aktivite sergilediğini bildirmiş, ancak hesperetinin hesperidin'den biraz daha güçlü olduğunu söylemiştir. Parhiz ve ark. (2015), yeni bulguların hesperidinin antioksidan aktivitesinin sadece radikal süpürücü aktivitesiyle sınırlı kalmayıp, ERK/Nrf2 sinyal yolu ile antioksidan hücresel savunmaları da arttırdığını ortaya koyduğunu ve enflamasyonun ise, farklı sinyal yollarının aktivasyonu yoluyla çeşitli proenflamatuar mediyatörlerin veya sitokinlerin aşırı üretimini içeren karmaşık bir biyolojik süreç olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda, hesperidinin oksidatif stres indeksi üzerine etkileri zaman bağımlı olarak değişiklik göstermiştir. Deneyin birinci gününde hesperidinin total antioksidan kapasiteyi (TAS), sham grubu ile karşılaştırıldığında hem ön koşullamada (Grup 5) (p<0.01) hem de tedavi (Grup 7) (p<0.01) grubunda anlamlı düzeyde arttırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte, 1

haftalık uygulanımı, TAS seviyelerinde ne ön koşullamada (Grup 6) ne de tedavi (Grup 8) grubunda olumlu etkiler göstermemiştir. Buna karşın hesperidinin oksidan kapasiteyi 1. günde ön koşullama ile geriletirken, 1 haftalık periyotda ön koşullama (0.572 ± 0.04 , $p < 0.01$) ve tedavi (0.663 ± 0.05) gruplarında TAS düzeylerini azalttığı için total antioksidan statüyü etkilemediği tespit edilmiştir. TOS düzeyi, 1. günde kontrol grubuna (7.26 ± 0.26) göre sham grubunda (7.70 ± 0.50) artmıştır ($p > 0.05$). Buna karşın hesperidinin ön koşullu uygulanması TOS düzeyini düşürmüştür (7.50 ± 0.56). Yine tedavi grubunda 1 günlük hesperidin uygulanımı TOS düzeyini istatistiki olarak anlamlı olmasa da önemli düzeyde arttırmıştır (8.20 ± 0.55 , $p > 0.05$, Çizelge 4. 3. 2). Çalışmamızın 7. gününde ise TOS düzeyi kontrol grubuna (6.83 ± 0.64) göre sham grubunda (6.76 ± 0.15) anlamlı olmayan düzeyde azalmıştır. Ancak hesperidin 7 günlük kullanımının ön koşullama (Grup 6) (7.24 ± 0.50) grubunda oksidan kapasiteyi azaltmada yetersiz kalmasına rağmen tedavi grubunda (Grup 8) TOS seviyeleri azalmıştır (6.57 ± 0.80 , $p > 0.05$).

Kumar ve ark. (2013), İL-1 β ve TNF- α gibi sitokinlerin, kaspaz da dahil olmak üzere birçok apoptoz düzenleyici genin aktivasyonunda yer aldığını bildirmişlerdir. Selmi ve ark., (2017), in vivo alkol uyarımlı oksidatif stres ve peptik ülser modelinde, hesperidinin 50 mg/kg/gün uygulanımı sonucu, alkol uyarımlı artan TNF- α ekspresyonlarını ise hesperidinin anlamlı derecede baskıladığını rapor etmişlerdir. Cheng ve ark. (2017), yaptıkları LPS uyarımlı in vitro makrofaj çalışmasında, sitrus flavonoidlerinin tümör nekrozis faktör alpha (TNF-alfa), interleukin-1 beta (İL-1 β) ve İL-6 düzeylerini azaltarak anti inflamatuvar etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Carballo-Villalobos ve ark. (2017), yaptıkları in vivo çalışmada, hesperidinin (100 mg / kg) antihiperallere karşı yanıtı esas olarak omuriliğin birkaç bölümünde sitokinlerin (TNF-alfa ve İL-1 β) varlığı ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Rotimi ve ark. (2016), yaptıkları endotoksin uyarımlı in vivo inflamasyon çalışmasında 15 gün hesperidinin uygulanımı sonrası doz bağımlı olarak (50, 100 ve 200 mg/kg) interlökin 1 β , interlökin 1 reseptö, interlökin 6 ve tümör nekrozis faktör- α (TNF- α) gen ekspresyonlarını anlamlı olarak baskıladığını rapor etmişlerdir. Yine aynı çalışmada hesperidinin glutatyon hücre içi düzeyini ve glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz ile glutatyon-S-transferaz enzim aktivitelerini arttırarak antioksidan özellik gösterdiğini bildirmişlerdir. Martinez ve ark. (2016), yaptıkları UV-B irradasyon uyarımlı inflamasyon modelinde, hesperidinin metil

kalkon derivatının, GSH miktarının azalmasını önlediği ve TNF- α ve İL-1 β gen ekspresyonlarını baskıladığını rapor etmişlerdir. Li ve ark. (2016), in vitro UV (ultraviyole) uyarımlı deri oksidatif stress ve yangı modelinde, hesperidinin TNF-alfa ve İL-1 β gen ekspresyon düzeyini ve hücre içi protein düzeyini de azaltarak yangıyı önlediğini rapor etmişlerdir. Ansar ve ark. (2017), yaptıkları çinko oksit nanopartikülü uyarımlı nörotoksitede hesperidinin TNF- α ve İL-1 β gen ekspresyonunu baskılayarak yangı önleyici etkilerinin olduğunu rapor etmişlerdir. Raza ve ark. (2011) ratlarda orta serebral arterde 2 saat oklüzyon ve 22 saat reperfüzyon ile fokal serebral iskemi oluşturmuş ve reperfüzyon süresinin bitiminde nörolojik durumları değerlendirildikten sonra sakrifiye edilmiştir. İskemi öncesi 15 gün boyunca günde bir kez hesperidin (50 mg/kg PO) içirilmiştir. MCAO (orta serebral arter oklüzyonu) grubunda antioksidan enzimler olan, glutasyon peroksidaz (GPx), glutasyon redüktaz (GR), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutasyon (GSH) aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı, hesperidin ile ön koşullama yapılan MCAO grubunda ise belirgin şekilde korunduğu görülmüştür. Hesperidin+MCAO grubunda, TNF- α ve İL-1 β gibi inflamatuvar mediatörler, MCAO grubu ile karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda sham grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama ve tedavi grubunda İL-1 β düzeyini düşürerek yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulunmuştur ($p<0.01$). 7. günde ise hem ön koşullama hem de tedavi grubunda İL-1 β düzeylerini istatistiki olarak önemli düzeyde etkilemediği tespit edilmiştir ($p>0.05$). Sham grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama ve tedavi grubunda TNF- α düzeyini düşürerek yangıyı azalttığı ve terapötik etkinlik gösterdiği bulunmuştur. Ancak hesperidin kullanımının 7. günde hem ön koşullama (366.3 ± 15.5) hem de tedavi grubunda (482.5 ± 35.0 , $p<0.01$) etkisiz kaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4. 3. 1). Araştırmada hesperidinin proinflamatuvar sitokinler üzerine etkileri zaman bağımlı olarak değişiklik göstermiştir. Deneyin birinci gününde hesperidinin yangı giderici etkileri bulunmuşken, bir haftanın sonunda bu etkilerin kalmadığı tespit edilmiştir.

Doku onarımı, sağkalım için çok önemli ve oldukça korunmuş evrimsel mekanizmalardan biri olduğu için, diğer organlarda olduğu gibi omurilikte de benzer bir yara onarımı süreci bulunur (Zhang ve ark. 1997). Sharif-Alhoseini ve ark. (2017), çalışmaya dahil ettikleri yapılan 2209 spinal kord travma modeli çalışmasının

%46.9'unda Hematoksilen-Eozin (HE) boyası kullanıldığını ve Hematoksilen-Eozin boyasının iyi bilinen genel yapısal bir boyama yöntemi olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızda da dokuların boyanmasında Hematoksilen-Eozin başarılı bir şekilde kullanılarak benzer kanaate varılmıştır.

Sengul ve ark. (2013), yapmış oldukları bir spinal kord hasar modelinde fizyolojik salin grubunda histopatolojik değerlendirmede hemoraji, ödem, nöron dejenerasyonu ve inflamatuvar hücrelerde belirgin bir artış gözlendiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da sham grubunda, gri cevherde belirgin laserasyon, yaygın hemoraji, yoğun ödem ve nöronlarda belirgin dejenerasyon (nissle kayıpları, kırmızı dejenerasyon) vardı. Beyaz cevherde ödem, yoğun aksonal dejenerasyon ve sferül yapıları mevcuttu (Şekil 4. 4. 3). PMNL (Polimorf nötrofil lökositleri) infiltrasyonu yer yer izlendi ve akut dönemde görmemiz gereken bulgular ile uyumlu idi. Hesperidin bu bulguların hepsinde iyileşme sağladı.

Ahuja ve ark. (2017), primer spinal kord hasarını takiben sekonder spinal kord hasarı başladığını, kan-omurilik bariyerinin bozulmasının bir sonucu olarak yaralanma alanına, makrofajlar, mikroglialar, T-hücreleri ve nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerin sızdığını bildirmişlerdir. Kjell ve Olson (2016) ise spinal kord hasarından sonraki ilk 3-6 saat yaralanma bölgesine nötrofillerin sızdığını, yaralanma sonrası 3. gün monositlerin sızmaya başladığını ve muhtemelen apoptozis sebebiyle de bölgede artık nötrofillerin görülmeyeceğini söylemişlerdir.

Ahuja ve ark. (2017), travmadan sonraki 0-48 saat arası süreyi akut yaralanma, 2-14 gün arası süreyi subakut yaralanma, 2 hafta-6 ay arası süreyi intermediat yaralanma ve 6 ayı aşan süreyi de kronik yaralanma olarak nitelendirmişlerdir. Akut yaralanma döneminde (0-48 saat), kanama, ödem ve proapoptotik faktörlerin (örn., Sitokinler, K⁺, DNA, nekrotik doku, vb) devam eden hücre ölümüne katkıda bulunacağını bildirmişlerdir. Çalışmamızda akut yaralanma sonrası kanama, ödem, laserasyonlar, nöronal dejenerasyon belirlenirken subakut dönemde ise yoğun makrofaj infiltrasyonu ve nekroz ağırlıklı alanlar görüldü.

Kjell ve Olson (2016), spinal kord hasarının, kan-beyin bariyerini bozarak kanama ve ödeme yol açacağını ve bunların kan dolaşımını bozacağını ve hasar görmüş kan

damarları ile dura mater içindeki artan basınç nedeniyle de iskemi oluşacağını söylemişlerdir. Çalışmamızda da uyumlu bulgular görüldü.

Lin ve ark. (2011), spinal kord hasarının altta yatan patolojilerinde hipoksi, iskemi, lipid peroksidasyonu, serbest radikal üretimi, nötral proteaz aktivasyonu, prostaglandin üretimi ve programlanmış hücre ölümü veya apoptoz gibi çeşitli moleküler yolların rol oynayabileceğini belirtmişlerdir. Omurilikte şekillenen primer hasarın hücre zarlarını bozduğunu, miyelin ve aksonları tahrip ettiğini ve mikro dolaşımı bozarak yıkıcı etki yaratan sekonder hasarı tetiklediğini söylemişlerdir. Sekonder hasar kaskadlarının ise, lokal inflamasyon, serbest radikallerin üretimi ve hiperoksidasyon da dahil aktif biyolojik süreçler olduğu ve sonuç olarak, hastaların spinal kord hasarından günler veya haftalar sonra şekillenen hasardan kurtulmuş olsalar bile, bazı nöronların ve glial hücrelerin öldüğünü vurgulamışlardır.

Oztanir ve ark. (2014) farelerde karotis arteri 15 dakika süreyle klempledikleri bir iskemi-reperfüzyon (I/R) modelinde işlem sonrası 10 gün boyunca hesperidin (100 mg/kg) uygulamışlar ve hesperidin ile tedavi edilen grupta, I/R'nin oksidatif etkilerini önemli ölçüde tersine çevirdiğini ve histopatolojik olarak nörodejeneratif etkileri inhibe ettiğini bildirmişlerdir. I/R grubunda, Sham (SH) grubuna göre kapsamlı histolojik hasar tespit edilmiş olup, I/R grubunda, vasküler konjesyon, mononükleer hücre infiltrasyonu, sitoplazmik büzüşme ve geniş koyu renkli piknotik nöronal çekirdeklerin varlığına ek olarak, serebral kortekste fokal iskemik alanların tespit edildiği bildirilmiştir. I/R+HP grubunda, bu histolojik değişikliklerin azaldığı ve histolojik görünümde bir iyileşme gözlemlendiği görülüp hesperidin, iskemiye bağlı histolojik değişikliklere karşı önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu söylenmiştir.

Gaur ve Kumar (2010), ratlarda iki taraflı karotis damarını 30 dakika süreyle klempleyip 24 saat reperfüzyon uyguladıkları bir iskemi/reperfüzyon (I/R) çalışmasında, yedi gün boyunca hesperidin (50 ve 100 mg/kg, PO) ile ön tedavi yapmışlar ve I/R hasar grubu ile karşılaştırdıklarında belleğin geri gelmesinde anlamlı bir iyileşme olduğunu göstermişlerdir. Aynı zamanda histopatolojik olarak da hesperidin ile tedavi edilen grupta (100 mg/kg), gözle görülebilir hücre çekirdeği ve sürekliliği olan hücre zarları ile optimum boyutlu ve hasarsız nöronal hücreler gözlemlenmiştir, bu doğrultuda da hesperidin serebral iskemi durumlarında koruyucu etkisi olduğunu belirtmişlerdir.

Raza ve arkadaşları (2011) erkek wistar ırkı ratlarda orta serebral arterde bir oklüzyon-reperfüzyon çalışması yapmışlar ve 15 gün boyunca günde bir kez 50 mg/kg dozunda hesperidin vererek enfarktüs boyutunu küçültmüş ve nörolojik defisitleri azalttığını gözlemlemişlerdir. Kamisli ve ark. (2015) yapmış oldukları bir nörotoksisite çalışmasında ratlara tek doz sisplatin (CP) ve 14 gün boyunca da hesperidin vermişler (sırasıyla 7 mg/kg ve 50 mg/kg), sisplatinin lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde indüklediğini ve beyin ile siyatik sinirde antioksidan savunma sisteminin gücünü zayıflattığını söylemişlerdir. Buna rağmen hesperidin, bu etkileri önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, sisplatin siyatik sinirde elektromiyografik (EMG) değişikliklerin yanı sıra başta apoptoz olmak üzere histopatolojik hasara yol açmasına rağmen hesperidin bu etkileri geri çevirdiğini belirtmişlerdir. Zhang ve ark. (1997), spinal kord hasarlarında akut inflamatuvar yanıtın, endotelial hücre hasarına ve vasküler bütünlüğün kaybına yol açan bir başlangıç reaksiyonu olduğunu ve ardından nötrofil aktivitelerinin baskın olduğu bir aşama ile karakterize olduğunu bildirmişler ve ileriki dönemde nekroz ve kaviteasyonların oluştuğunu söylemişlerdir. Norenberg ve ark. (2004) spinal kord hasarı sonrası oluşan kanamanın gri cevherde postkapiller venüllerin ve sulkal arteriollerin yırtılması sonucu ortaya çıktığını spinal kordda hematoma oluşturabileceğini söylemişlerdir. Yine, Norenberg ve ark. (2004), progresif iskemik nekrozda, omurilik lezyonlarının giderek arttığını ve sıvılaşma nekrozuna maruz kaldığını ve sonuçta omurilikte yavaş yavaş kaviteasyonların oluştuğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda da buna uyumlu olarak akut dönemde yaygın hemoraji ve nötrofil infiltrasyonu görülürken progresif dönemde kaviteasyonlar ortaya çıkmıştır. Bu histopatolojik reaksiyonun, rat, yaban gelinciği, kedi, köpek ve maymun gibi birçok memeli türünde ortaya çıktığını söylemişler, farelerde ve kış uykusundaki sincaplarında ise, omurilik yaralanması sonrası iskemik nekroz ve kaviteasyon gelişmediğini söylemişlerdir. Mevcut çalışmada da ratlarda subakut dönemde kistik boşluklar mevcuttur. Norenberg ve ark. (2004) akut yaralanmalardan sonra aksonal şişlikler olan sferoid yapılarının oluştuğunu söylemişlerdir. Çalışmamızda da sham (Grup 3) grubunda beyaz cevherde ödemle birlikte aksonal dejenerasyon ve sferül yapıları mevcuttur (Şekil 4. 4. 3). Grup 5 ön koşullama (1. gün) grubunda sham (Grup 3) grubuna göre laserasyon, kanama, ödem, nekroz, aksonal ve nöronal dejenerasyon ile nötrofil lökosit infiltrasyonunun azaldığı görülürken Grup 6 ön koşullama (7. gün) grubunda sham (Grup 4) grubu ile

kıyaslandığında kanama ve aksonal ve nöronal dejenerasyon açısından belirgin fark bulunmadı. Ancak makrofaj infiltrasyonu, ödem ve nekroz nispeten daha az olarak belirlendi. Grup 7 tedavi (1.gün) grubunda Grup 3 sham grubuna göre kanama, laserasyon, ödem, aksonal ve nöronal dejenerasyon hafif daha azdı. Bununla beraber Grup 8 tedavi (7. gün) grubu sham (Grup 4) grubu ile kıyaslandığında kanama ve aksonal ve nöronal dejenerasyon açısından belirgin fark izlenmezken, makrofaj infiltrasyonu, ödem ve nekrozun daha az olduğu tespit edildi (Çizelge 4. 4. 1). Özet olarak hesperidin kullanımı histopatolojik olarak bakıldığında hemoraji, laserasyon, aksonal ve nöronal dejenerasyon, nekroz, inflamatuvar reaksiyon ve ödem gibi parametrelerin hepsinde azalma sağlayarak hem ön koşullama gruplarında hem de tedavi gruplarında terapötik etkinlik göstermiştir.

GFAP, omuriliğin klasik histolojik göstergelerinden birisidir ve GFAP monoklonal antikorunu, normal ve reaktif astrositleri ve omuriliğin retiküler yapısını açıkça gösterebilir (Liu ve ark. 2016). Omurilik yaralanması, mikrogliaların, makrofajların ve astrositlerin aktivasyonu ile inflamatuvar bir tepkiye yol açar. Mikroglia ve astrositler aktive olurlar, çoğalırlar ve spinal kord hasarından sonra boyutları artar. Artmış glial fibriler asidik protein (GFAP) ekspresyonu reaktif astrositlerin ayırt edici bir özelliğidir ve bu sitoskeletal protein, aksonal genişlemeyi azaltan glial skarın ürettiği bariyer etkisine katkıda bulunur. Bu nedenle, astrositler reaktif astrogliozise uğrayarak nöronların rejenerasyonunu inhibe eden bir gliyal skar üretir. Astrositlerin nöronların korunmasındaki rolü, önemli bir araştırma alanı olmuştur ve spinal kord hasarı tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olarak ortaya çıkmıştır (Lin ve ark. 2011).

En ağır yaralanmalardan biri olan omurilik yaralanması, nöronlar, oligodendrositler ve astrositler gibi birçok türde hücrenin ölümüne neden olur. Astrositler, toplam glial hücre sayısının % 50'sinden fazlasını içeren merkezi sinir sistemindeki en bol hücre tipidir. Astrosit proliferasyonuna astrositozis, astrosit hipertrofisine ise astrogliazis denmektedir. Astrogliazis, cAMP, STAT3, NF-kB, Rho-kinaz, JNK ve mTOR gibi iyi bilinen birçok yolla düzenlenir (Li ve ark. 2016).

Astrositler, merkezi sinir sisteminde en çok sayıda bulunan ve nöronlara destek ve besin sağlayan glial hücrelerdir. Omurilik yaralanması, astrositlerin aktivasyonu ile karakterize, reaktif astrogliazise yol açan bir inflamatuvar yanıt ile sonuçlanır. Reaktif

astrositler 2-3. haftada pik yaparlar. Reaktif astrogliyozis ise, glial skar oluşturarak aksonal rejenerasyonu ve fonksiyonel nöronal iyileşmeyi azaltabilir. GFAP ekspresyonu, nörolojik hasardan sonra hipertrofi ve astrositlerin proliferasyonunu gösterir (Lin ve ark. 2011). Çalışmamızda kontrol gruplarında GFAP ile reaktif astrositler izlenmedi (Şekil 4. 5. 2. 1 ve Şekil 4. 5. 2. 2).

Raza ve ark. (2011) ratlarda orta serebral arterde 2 saat oklüzyon ve 22 saat reperfüzyon ile fokal serebral iskemi oluşturmuşlar ve reperfüzyon süresinin bitiminde sakrifiye etmişlerdir. İskemi öncesi 15 gün boyunca günde bir kez hesperidin (50 mg/kg PO) verilmiştir. Şekillenen astrosit upregülasyonunun aktivasyonu, serebral iskemide oluşan nöronal hücre ölümüyle ilişkilendirilmiştir. MCAO grubunun iskemik hemisferinde GFAP ekspresyonunun belirgin olarak yüksek ($p<0.001$) olduğu bulunmuştur. Hesperidin ile ön koşullama yapılan grupta, MCAO grubu ile karşılaştırıldığında, GFAP ekspresyonunda gözle görülür bir azalma ($p<0.01$) olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda GFAP ekspresyonu spinal kord hasarı sonrası immun boyama yapılarak araştırıldı ve GFAP ile reaktif astrosit aktivasyonu gösterildi ve hesperidin astrogliozisi azalttığı belirlendi. Sham (Grup 3) grubunda orta derece astrogliozis görülürken ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) gruplarında çoğunlukla hafif derecede astrogliozis görüldü. Ancak GFAP düzeyleri, sham (Grup 3) 1. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) gruplarında istatistiki olarak önemli bir değişiklik göstermedi ($p>0.05$). Sham (Grup 4) grubunda yoğun astrogliozis izlenirken, ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) gruplarında astrogliozisin azaldığı saptandı. GFAP düzeyi, sham (Grup 4) 7. gün ile karşılaştırıldığında ön koşullama (Grup 6) grubunda önemli düzeyde düşük bulundu ($p<0.005$) (Çizelge 4. 5. 2. 1). Böylelikle hesperidin tedavisi ile inflamatuvar reaksiyonların kontrol edilebileceği, travma sonrası nöronal doku onarımına katkıda bulunabileceği ve nörolojik muayene bulgularına da dayanarak fonksiyonel iyileşme sağlayabileceği söylenebilir.

Sistein proteaz ailesinden olan kaspazların, apoptozun efektör evresinde önemli rol oynadığı, özellikle de kaspaz-3'ün, sinirsel gelişim ve spinal hasarda önemli olduğu gösterilmiştir (Emery ve ark. 1999). Yılmaz ve ark. (2014), kaspazların apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklendiğini ve omurilik hasarında kaspaz aktivasyonunun

aşırı derece yükseldiğini ve apoptozun en belirleyici moleküler işaretleyicisi olduğunu belirtmişlerdir.

Oztanir ve ark. (2014), farelerde karotis arteri 15 dakika süreyle klempledikleri bir iskemi-reperfüzyon (I/R) modelinde, kaspaz 3 için pozitif boyanan hücre sayısı, IR grubunda belirgin olarak arttığı gözlemlenmiştir. İmmünohistokimyasal kaspaz 3 pozitif boyanan hücrelerin oranı IR+hesperidin grubunda IR grubuna göre azaldığı, bu nedenle de hesperidin tedavisinin, kaspaz 3 pozitif hücrelerde IR ile indüklenen artışı önemli ölçüde azalttığını söylemişlerdir.

Roohbakhsh ve ark. (2014), insanlarda yaptıkları çalışmalarında bazı flavonoidlerin eksik alınması sonucu Parkinson hastalığına yakalanma riskinin artabileceğini ve Alzheimer hastalığı olan hastaların dörtte birinde de flavonoid eksikliği olduğu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada spinal kord hasarı modelinde ön koşullama gruplarında 7 gün boyunca hesperidin uygulamasının kaspaz 3 ile boyanan hücrelerde birim alanda apoptotik hücre sayısındaki azalmalar ile GFAP ile daha az derecede astrogliosis görülmesi hesperidin antiapoptotik koruyucu etkinliğini göstermektedir (Çizelge 4. 5. 1. 1; Çizelge 4. 5. 2. 1). Roohbakhsh ve ark. (2014), hesperidin, nöroprotektif etkisini esas olarak antioksidan ve antiinflamatuvar aktiviteleri üzerinden sağladığını, bununla birlikte, kaspaz-3 aktivitesinin zayıflatılmasını, kalsiyum iyonu regülasyonunu, nöronal enerji metabolizmasının iyileştirilmesini ve mitokondriyal disfonksiyonun tersine çevrilmesini de nöroprotektif etkilerine bağladığını bildirmeleri mevcut çalışmadaki ön koşullama 1. gündeki İL-1 β daki önemli düzeydeki ve TNF- α düzeylerindeki azalmalar ile TAS düzeyindeki artışlar ile uyumlu bulunmuştur.

Kamisli ve ark. (2015) yapmış oldukları bir nörotoksisite çalışmasında ratlara tek doz sisplatin (CP) ve 14 gün boyunca da hesperidin vermişler (sırasıyla 7 mg/kg ve 50 mg/kg) ve immunohistokimyasal analizlerde beyinde sisplatin grubundaki kaspaz-3 pozitif hücrelerin yüzdesinin diğer gruplardan anlamlı olarak daha yüksek olduğunu ve CP+HP grubunda ise kaspaz-3 boyalı hücrelerin yoğunluğunun minimal olduğunu vurgulamışlardır. Siyatik sinir enine kesit olarak değerlendirildiğinde de CP ve CP+HP gruplarında siyatik sinir dejenerasyonu (aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyon) belirlenmiş ve CP grubuyla karşılaştırıldığında CP+HP gruplarında dejenerasyonun azaldığını görmüşlerdir.

Hwang ve Yen (2008), H₂O₂ ile oluşturdukları PC12 hücrelerindeki in vitro sitotoksite modelinde hesperidin, hesperetin ve neohesperidinin, kaspaz-3 aktivitesindeki artışı zayıflattığını ve nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Ciftci ve ark. (2015), bir Citrus flavonoidi olan hesperidinin (HP), C57BL / J6 fare modelinde deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) iyileştirici etkilerini araştırmışlardır. 40 fare üzerinde yapmış oldukları çalışmada oluşturdukları ensefalomyelit sonrası 7 gün 100 mg/kg/gün miktarında hesperidin kullanmışlar ve yedinci gün sonunda sakrifiye etmişlerdir. İmmünohistokimyasal olarak EAE grubunda kaspaz-3 benzeri immünreaktivite sayısının yüksek olduğunu ancak, EAE+HP grubunda kaspaz-3 benzeri immünreaktivite hücrelerinin oranının minimal olduğunu bildirmişlerdir. Diğer taraftan histopatolojik değerlendirmede EAE grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında histolojik hasarın önemli ölçüde arttığını hesperidin verilen grupta ise, histolojik ve immünohistolojik hasarların skorlanmış değerler açısından anlamlı olarak azalttığını belirtmişlerdir. Tamilselvam ve ark. (2013) ise, hesperidinin, Akt ve ERK1/2 gibi sinyal yollarının aktivasyonu ile apoptoz sinyal düzenleyici kinaz 1 (ASK1), BAD, kaspaz 3 ve 9 gibi proapoptotik proteinlerin salınmasının önlenmesinde rol oynayarak nöroprotektif etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, sham (Grup 3) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin 1. günde ön koşullama (Grup 5) ve tedavi (Grup 7) grubunda kaspaz 3 düzeyini azaltarak yangıyı azalttığını ve terapötik etkinlik gösterdiğini bulunmuştur (p<0.001). 7. günde ise, sham (Grup 4) grubu ile karşılaştırıldığında hesperidinin ön koşullama (Grup 6) ve tedavi (Grup 8) grubunda kaspaz 3 düzeyini azaltarak yangıyı azalttığını ve terapötik etkinlik gösterdiğini bulunmuştur (p<0.001). Sonuç olarak birinci ve yedinci günde hesperidin apoptotik hücre sayısında azalma sağlayarak apoptozisi azalttığını ve nöroprotektif etki sağladığını söylenebilirken, ön koşullama ile tedavi grupları arasında belirgin fark olmadığı tespit edildi.

6. SONUÇ

Bu çalışma ile ratlarda deneysel spinal kord yaralanması sonucu şekillenen sekonder hasarın önüne geçilmesi veya minimuma indirilmesi amaçlandı. Travma öncesi ve travma sonrası kullanılan hesperidinin nörolojik, biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal değerler üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışma deneysel spinal kord hasarı sonrası ortaya çıkan sekonder hasarda hesperidinin etkilerinin değerlendirildiği ilk çalışma olup varılan sonuçlar aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Modifiye Tarlov Skalası, Eğik zemin testi ve Parmak açma testi değerlerine bakılarak hesperidinin özellikle de subakut dönemde klinik olarak bir iyileşme sağladığı söylenebilir.
2. Hesperidinin akut dönemde, ön koşullama ve tedavi grubunda İL-1 β düzeyini düşürerek yangıyı azalttığı ve terapotik etkinlik gösterdiği söylenebilir. Ancak subakut dönemde etkisiz kalmıştır.
3. Hesperidinin akut dönemde, ön koşullama ve tedavi grubunda TNF- α düzeyini düşürerek yangıyı azalttığı ve terapotik etkinlik gösterdiği söylenebilir. Ancak subakut dönemde etkisiz kalmıştır.
4. Hesperidin ön koşullanması akut dönemde sham grubu ile karşılaştırıldığında TAS düzeyini arttırarak antioksidan etkinlik göstermiştir.
5. Hesperidinin ön koşullu uygulanması akut dönemde TOS düzeyini düşürerek oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.
6. Histopatolojik olarak akut ve subakut dönemde hemoraji, laserasyon, aksonal ve nöronal dejenerasyon, nekroz, inflamatuvar reaksiyon ve ödemi azaltarak terapötik etkinlik gösterdiği söylenebilir.
7. Hesperidinin akut ve subakut dönemde ön koşullama ve tedavi gruplarında apoptotik hücre sayısını azaltarak terapötik etkinlik gösterdiği söylenebilir.
8. Hesperidinin subakut dönemde ön koşullama (Grup 6) grubunda astrogliozisi azaltarak terapötik etkinlik gösterdiği söylenebilir.

Bu bilgiler ışığında sonuç olarak;

1. Spinal kord yaralanmalarında şekillenen sekonder hasarın etkilerini minimuma indirmede bir flavonoid olan hesperidinin kullanımı önerilebilir.
2. Hesperidinin spinal kord travmaları sonrasında oluşan sekonder hasara karşı etkinliği ilk defa bu çalışmada araştırılmış olması daha sonraki süreçlerde yapılacak spinal kord travması hasarına karşı hesperidin kullanılan çalışmalara referans olma niteliği taşımaktadır.
3. Daha sonraki hesperidin ile ilgili yapılacak çalışmalarda spinal kord hasarlarında hesperidinin etkinliğinin tam olarak ortaya konması için farklı travma modelleri, farklı doz kullanımları ve uzun dönem takiplerin yapılmasının da faydalı olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Agrawal YO, Sharma PK, Shrivastava B, Ojha S, Upadhya HM ve ark.** Hesperidin Produces Cardioprotective Activity via PPAR-c Pathway in Ischemic Heart Disease Model in Diabetic Rats. *Plos One*, **2014**, 9(11)
2. **Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, Wilson J, Kwon B ve ark.** Traumatic Spinal Cord Injury Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, **2017**, 80: 9–22
3. **Ak H, Gülşen İ, Karaaslan T, Alaca İ, Candan A ve ark.** The effects of caffeic acid phenethyl ester on inflammatory cytokines after acute spinal cord injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.*, **2015**, 21: 2
4. **Alam P, Alam A, Anwer MK, Alqasoumi SI.** Quantitative estimation of hesperidin by HPTLC in different varieties of citrus peels. *Asian Pac J Trop Biomed*, **2014**, 4(4): 262-266
5. **Al-Ashaal HA, El-Sheltawy ST.** Antioxidant capacity of hesperidin from Citrus peel using electron spin resonance and cytotoxic activity against human carcinoma cell lines. *Pharmaceutical Biology*, **2011**, 49(3): 276–282
6. **Alkan Ö, Kızılkılıç O.** Vertebra Travmalarında Radyolojik Görüntüleme. *Türkiye Klinikleri/J Neurosurg-Special Topics*, **2015**, 5(2)
7. **Amato ACM, Stolf NAG.** Anatomy of spinal blood supply. *J Vasc Bras.*; **2015**, 14(3): 248-252
8. **Ansar S, Abudawood M, Hamed SS, Aleem MM.** Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles Induces Neurotoxicity and Proinflammatory Response: Amelioration by Hesperidin. *Biol Trace Elem Res.*, **2017**, Feb;175(2):360-366
9. **Antar V.** Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph'nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. *Uzmanlık Tezi, Türkiye*, sayfa: 54, **2005**
10. **Antunes MS, Goes ATR, Boeira SP, Prigol M, Jesse CR.** Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's Disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice. *Nutrition*, **2014**, 30: 1415–1422
11. **Aydin HE, Ozkara E, Ozbek Z, Vural M, Burukoglu D ve ark.** Histopathological Evaluation of the Effects of CAPE in Experimental Spinal Cord Injury. *Turk Neurosurg.*, **2016**, 26(3):437-44
12. **Balakrishnan A, MenonVP.** Antioxidant properties of hesperidin in nicotine-induced lung toxicity. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, **2007**, 21, 535–546
13. **Banji JFO, Banji D, Ch K.** Curcumin and hesperidin improve cognition by suppressing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by D-galactose in rat brain. *Food and Chemical Toxicology*, **2014**, 74; 51–59
14. **Baptiste DC, Fehlings MG.** Pharmacological Approaches To Repair the Injured Spinal Cord. *Journal Of Neurotrauma*, **2006**, 23:3-4
15. **Bayraktaroğlu AG.** Deneklerin Histolojik Özellikleri, Bunların Deneysel Çalışmalarda Sınırlayıcı Yönleri. *Journal of Clinical Analytical Medicine*, **2012**, sy. 33-38
16. **Belanger E, Levi ADO.** The Acute and Chronic Management of Spinal Cord Injury. *J Am Coll Surg*, **2000**, Vol. 190:5
17. **Bensaoula DA, Boukhris N, Tahraoui A.** Hesperidin effects on behavior and locomotor activity of diabetic Wistar rat. *African Journal of Biotechnology*, **2016**, Vol. 15(45), pp. 2572-2577
18. **Berg RJ, Rucker NC.** Pathophysiology and medical management of acute spinal cord injury. *Comp Cont Ed.*; **1985**, 7(8):646-54
19. **Bethea JR, Nagashima H, Acosta MC, Briceno C, Gomez F ve ark.** Systemically Administered Interleukin-10 Reduces Tumor Necrosis Factor-Alpha Production and Significantly Improves Functional Recovery Following Traumatic Spinal Cord Injury in Rats. *Journal Of Neurotrauma*, **1999**, 16:10
20. **Blumberg J.** Use of biomarkers of oxidative stress in research studies. *J Nutr.*, **2004**, 134;ss 3188-3189
21. **Brenner M.** Role of GFAP in CNS injuries. *Neurosci Lett.*, **2014**, April 17; 565: 7–13

22. **Bulut M, Altındağ A, Deveci Z, Kaya MC, Bülbül F ve ark.** Elektrokonvulzif Tedavi ve Farmakoterapi ile Tedavi Edilen İki Uçlu Bozukluk Hastalarında Oksidatif Parametreler. *Journal of Mood Disorders*, **2013**, 3(3):93-9
23. **Can P, Beşaltı Ö.** Omurilik Hasarında Güncel Tedavi Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics*; **2016**, 2(3)
24. **Cao G, Sofic E, Prior RL.** Antioxidant And Prooxidant Behavior Of Flavonoids: Structure-Activity Relationships. *Free Radical Biology & Medicine*, **1997**, 22:5, pp. 749–760
25. **Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, Pellicer F, López-Muñoz FJ.** Antihyperalgesic Effect of Hesperidin Improves with Diosmin in Experimental Neuropathic Pain. *BioMed Research International*, **2016**, Volume 2016, Article ID 8263463, pp 12
26. **Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, Alvarado-Vázquez N, López-Muñoz FJ.** Pro-inflammatory cytokines involvement in the hesperidin antihyperalgesic effects at peripheral and central levels in a neuropathic pain model. *Inflammopharmacology*, **2017**, Apr;25(2):265-269
27. **Celik E, Oguzturk H, Sahin N, Turtay MG, Oguz F ve ark.** Protective effects of hesperidin in experimental testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Arch Med Sci.*, **2016**, Oct 1;12(5):928-934
28. **Chen MC, Ye YI, Guang JI, Jian-Wen LIU.** Hesperidin upregulates heme oxygenase-1 to attenuate hydrogen peroxide-induced cell damage in hepatic L02 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58(6); 3330–3335
29. **Cheng L, Ren Y, Lin D, Peng S, Zhong B, Ma Z.** The Anti-Inflammatory Properties of Citrus wilsonii Tanaka Extract in LPS-Induced RAW 264.7 and Primary Mouse Bone Marrow-Derived Dendritic Cells. *Molecules*, **2017**, Jul 19;22(7)
30. **Cheriyian T, Ryan DJ, Weinreb JH, Cheriyian J, Paul JC, ve ark.** Spinal cord injury models: a review. *Spinal Cord*, **2014**, 52, 588–595
31. **Cho J.** Antioxidant and neuroprotective effects of hesperidin and its aglycone hesperetin. *Arch Pharm Res.*; **2006**, 29(8): 699-706
32. **Ciftci O, Ozcan C, Kamisli O, Cetin A, Basak N ve ark.** Hesperidin, a Citrus Flavonoid, Has the Ameliorative Effects Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) in a C57BL/6 Mouse Model. *Neurochem Res.*, **2015**, 40(6):1111–1120
33. **Cramer GD, Darby SA.** *Basic and Clinical Anatomy Of The Spine, Spinal Cord, and Ans.* Copyright ©1995 by Mosby, Inc., **1995**, sayfa 63
34. **Cristante AF, Barros Filho TEP, Marcon RM, Letaif OB, Rocha ID.** Therapeutic approaches for spinal cord injury. *Clinics*, **2012**, 67(10):1219-1224
35. **Crozier A, Jaganath IB, Clifford MN.** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, **2009**, 26(8); 1001–1043
36. **Çelik H, Mut S, Harman F, Yılmaz G, Berkman MZ.** Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında Vitamin D3'ün Motor Fonksiyonlar Üzerine Olan İyileştirici Etkisi. *TJN*, **2015**, 21; 2
37. **Çimen MBY.** Flavonoidler ve Antioksidan özellikleri. *T Klin Tıp Bilimleri*, **1999**, 19:296-304,
38. **Çobanoğlu S, Hamamcıoğlu MK, Kılınçer C, Hiçdönmez T, Şimşek O ve ark.** *Nöroşirurji "Beyin-Omurilik-Sinir Cerrahisi Dersleri"*. Nobel Tıp Kitapevleri, Türkiye, **2002**, s:5-6
39. **Demir H, Ecmel Onur Ö, Altınok Denizbaşı A.** Travmatik Beyin Hasarında İnflamatuvar Sitokinlerin Rolü. *Marmara Medical Journal*; **2012**, 25:114-7
40. **Duganath N, Sridhar C, Jayaveera KN.** Synthesis and antibacterial evaluation of some novel hesperidin semisynthetic derivatives. *Der Pharmacia Lettre*, **2014**, 6 (1):87-94
41. **Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, Hurlbert RJ, Boulos PT ve ark.** Acute Spinal Cord Injury, Part I: Pathophysiologic Mechanisms. *Clin. Neuropharmacol.*, **2001**, 24:5
42. **Durdağ E, Kaymaz M, Börcek AÖ, Emmez H, Gülbahar Ö ve ark.** Acute Neuroprotective Effects of Alpha-lipoic asit in Experimental Spinal Cord Injury In Rats. *Journal of Neurological Sciences [Turkish]*, **2013**, 30:(4)38; 640-650
43. **Dursun N.** *Veteriner Anatomi III.* Medisan yayınevi, Türkiye, **2000**, 47. Baskı, sayfa 15-23
44. **Eken A.** Rat Kan ve Doku Örneklerinde Oksidatif Stres Parametreleri, Deney Hayvanı Rat. *Derman Tıbbi Yayıncılık*, Ankara, **2016**, ss.160-169
45. **Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A ve ark.** Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *Neurosurg Focus*, **1999**, 6 (1):Article 7
46. **Eng LF, Ghirnikar RS.** GFAP and Astrogliosis. *Brain Pathology*, **1994**, 4: 229-237

47. **Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL.** Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research*, **2000**, 25:9/10, pp. 1439–1451
48. **Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.*, **2005**, Dec;38 (12):1103-11
49. **Erşahin M, Toklu HZ, Erzik C, Akakın D, Tetik Ş ve ark.** Ghrelin alleviates spinal Cord injury in Rats Via its anti-inflammatory Effects. *Turkish Neurosurgery*, **2011**, 21:4, 599-605
50. **Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR.** Spinal Cord Contusion in the Rat: Behavioral Analysis of Functional Neurologic Impairment. *Experimental Neurology*, **1985**, 88, 123- 134
51. **Garg A, Garg S, Zaneveld LJD, Singla AK.** Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. *Phytotherapy Research Phytother. Res.*, **2001**, 15, 655–669
52. **Gaur V, Kumar A.** Hesperidin pre-treatment attenuates NO mediated cerebral ischemic reperfusion injury and memory dysfunction. *Pharmacological Reports*, **2010**, 62; 635-648
53. **Ghorbani A, Nazari M, Jeddi-Tehrani M, Zand H.** The citrus flavonoid hesperidin induces p53 and inhibits NF- κ B activation in order to trigger apoptosis in NALM-6 cells: involvement of PPARc-dependent mechanism. *Eur J Nutr*, **2012**, 51:39–46
54. **Guo C, Liu S, Guo Y, Yin Y, Lin J ve ark.** Comparative Function-Structural Analysis Of Antiplatelet And Antiradical Activities Of Flavonoid Phytochemicals. *J. Anim. Plant Sci.*, **2014**, 24(3)
55. **Gurcan O, Gurcay AG, Kazanci A, Senturk S, Bodur E ve ark.** Effect of Asiatic Acid on the Treatment of Spinal Cord Injury: An Experimental Study in Rats. *Turk Neurosurg.*, **2017**, 27(2):259-264
56. **Gutteridge JM, Halliwell B.** Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.*, **2000**, 899:136-47
57. **Güleş Ö, Eren Ü.** Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2008**, (2): 73-78
58. **Güzel A, Tatlı M, Ökten Aİ, Çaylı S.** Omurilik Yaralanmasının Patoloji Ve Fizyopatolojisi. *C. Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, **2006**, 28 (2): 73 – 78
59. **Hancı V, Kerimoğlu A, Koca K, Başkesen A, Kılıç K ve ark.** The biochemical effectiveness of N-acetylcysteine in experimental spinal cord injury in rats. *Turkish Journal of Trauma&Emergency Surgery*, **2010**, 16(1):15-21
60. **Hosseinimehr SJ, Nemati A.** Radioprotective effects of hesperidin against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *The British Journal of Radiology*, **2006**, 79, 415–418
61. **Hou QX, Yu L, Tian SQ, Jiang CJ, Yang WJ ve ark.** Neuroprotective effects of atomoxetine against traumatic spinal cord injury in rats. *Iran J Basic Med Sci.*, **2016**, Mar;19(3):272-80
62. **Hughes JT.** The Edwin Smith Surgical Papyrus: An analysis of the first case reports of spinal cord injuries. *Paraplegia*, **1988**, 26; 71-82
63. **Hwang SL, Yen GC.** Neuroprotective effects of the citrus flavanones against H₂O₂-induced cytotoxicity in PC12 cells. *J Agric Food Chem.*, **2008**, 13;56(3):859-64
64. **Idriss HT, Naismith JH.** TNFa and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microscopy Research And Technique*, **2000**, 50:184–195
65. **İstan GK, Erbayraktar Z, Gökmen N, Bağrıyanık A, Kıray M ve ark.** Deneysel Omurilik Yaralanmasında Gabapentinin Nöroprotektif Etkinliğinin Değerlendirilmesi. *Sinir Sistemi Cerrahisi Derg.*, **2014**, 4(4):169-184
66. **Javed H, Vaibhav K, Ahmed ME, Khan A, Tabassum R ve ark.** Effect of hesperidin on neurobehavioral, neuroinflammation, oxidative stress and lipid alteration in intracerebroventricular streptozotocin induced cognitive impairment in mice. *J Neurol Sci.*, **2015**, Jan 15;348(1-2):51-9
67. **Kahle W, Frotscher M.** *Color Atlas and Textbook of Human Anatomy: Nervous System and Sensory Organs.* 6. Ed. Vol. 3, Thieme, New York, USA, **2003**
68. **Kahraman A, Serteser M, Köken T.** Flavonoidler. *Kocatepe Tıp Dergisi*, **2002**, 3, 01-08
69. **Kalfa M, Aksu K.** Anti-tümör nekrozis faktör- α tedavisi ve enfeksiyon. *RAED Dergisi*; **2011**, 3(3-4): 49-56
70. **Kalpna KB, Srinivasan M, MenonVP.** Evaluation of antioxidant activity of hesperidin and its protective effect on H₂O₂ induced oxidative damage on pBR322 DNA and RBC cellular membrane. *Mol Cell Biochem*, **2009**, 323:21–29
71. **Kamisli S, Ciftci O, Kaya K, Cetin A, Kamisli O ve ark.** Hesperidin protects brain and sciatic nerve tissues against cisplatin-induced oxidative, histological and electromyographical side effects in rats. *Toxicology and Industrial Health.*; **2015**, 31 (9): 841-51

72. **Kaur G, Tirkey N, Chopra K.** Beneficial effect of hesperidin on lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity. *Toxicology*, **2006**, 226, 152–160
73. **Kemerdere R.** Omurilik Hasarında Medikal Tedavi. *Türkiye Klinikleri/J Neurosurg-Special Topics*, **2015**, 5(2):59-62
74. **Kerimoğlu A, Paşaoğlu Ö, Kanbak G, Hancı V, Özdemir F ve ark.** Deneysel spinal kord yaralanmasında koenzim Q10'un etkinliği. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, **2007**, 13(2):85-93
75. **Kermani HR, Nakhaee N, Fatahian R, Najar AG.** Effect of Aspirin on Spinal Cord Injury: An Experimental Study. *Iran J Med Sci.*, **2016**, May;41(3):217-22
76. **Kılıç E, Toprak EA, Ayhan SK, Baş A, Duruyen S.** Şizofrenik Hastaların Atak ve Remisyon Dönemlerinde Oksidatif Stress. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **2015**, 7(4):286-298
77. **Kim YH, Ha KY, Kim SI.** Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials. *Clinics in Orthopedic Surgery*, **2017**, 9:1-9
78. **Kjell J, Olson L.** Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies. *Dis Model Mech.*, **2016**, Oct 1;9(10):1125-1137
79. **Khan MH, Parvez S.** Hesperidin ameliorates heavy metal induced toxicity mediated by oxidative stress in brain of Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol.*, **2015**, Jul;31:53-60
80. **Khoshnevisan A, Mardani A, Kamali S.** An Overview of Pharmacological Approaches for Management and Repair of Spinal Cord Injuries. *Iran J Psychiatry*, **2010**, 5:119-127
81. **König HE, Liebich HG.** *Veteriner Anatomi (Evcil Memeliler)*. 6. Baskı, Medipres Matbaacılık Yayıncılık Ltd. Şti, Malatya, **2015**, s39-47 ve s495-526
82. **Kumar B, Gupta SK, Srinivasan BP, Nag TC, Srivastava S ve ark.** Hesperetin rescues retinal oxidative stress, neuroinflammation and apoptosis in diabetic rats. *Microvascular Research*, **2013**, 87: 65–74
83. **Kumar S, Pandey AK.** Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, **2013**, Article ID 162750, 1-16
84. **Kuntic V, Brboric J, Holclajtner-Antunovic I, Uskoković-Marković S.** Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin—A new literature data survey. *Vojnosanit Pregl*, **2014**, 71(1): 60–65
85. **Lebreton, M.** Sur la matiere cristalline des orangettes, et analyse de ces fruits non encore developpes, famille des Hesperidees. *Journal de Pharmacie et de Sciences Accessoires*, **1828**, 14: 377
86. **Li M, Lin XF, Lu J, Zhou BR, Luo D.** Hesperidin ameliorates UV radiation-induced skin damage by abrogation of oxidative stress and inflammatory in HaCaT cells. *J Photochem Photobiol B.*, **2016**, Dec;165:240-245
87. **Li P, Teng ZQ, Liu CM.** Extrinsic and Intrinsic Regulation of Axon Regeneration by MicroRNAs after Spinal Cord Injury. *Hindawi Publishing Corporation, Neural Plasticity*, **2016**, Volume 2016, Article ID 1279051 pp0-11
88. **Lin MS, Lee YH, Chiu WT, Hung KS.** Curcumin Provides Neuroprotection After Spinal Cord Injury. *Journal of Surgical Research*, **2011**, 166, 280–289
89. **Liu D, Hua J, Dong Q, Sun Y, Gan M ve ark.** X-ray therapy promotes structural regeneration after spinal cord injury in a rat model. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **2016**, 11:6
90. **Liu WY, Liou SS, Hong TY, Liu IM.** Protective Effects of Hesperidin (Citrus Flavonone) on High Glucose Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Diabetic Retinopathy. *Nutrients*, **2017**, Dec 2;9(12)
91. **Martinez RM, Pinho-Ribeiro FA, Steffen VS, Caviglione CV, Pala D ve ark.** Topical formulation containing hesperidin methyl chalcone inhibits skin oxidative stress and inflammation induced by ultraviolet B irradiation. *Photochem Photobiol Sci.*, **2016**, Apr;15(4):554-63
92. **Michel de Oliveira D, Dourado GKZS, Cesar TB.** Hesperidin associated with continuous and interval swimming improved biochemical and oxidative biomarkers in rats. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, **2013**, 10:27
93. **Mortazavi MM, Verma K, Harmon OA, Griessenauer CJ, Adeeb N ve ark.** The Microanatomy of Spinal Cord Injury: A Review. *Clinical Anatomy*, **2015**, 28:27–36
94. **Naderi S, Andalkar N, Benzel EC.** History Of Spine Biomechanics: Part I- The Pre-Greco-Roman, Greco-Roman, And Medieval Roots Of Spine Biomechanics. *Neurosurgery*, **2007**, 60:382–391
95. **Norenberg MD, Smith J, Marcillo A.** The Pathology of Human Spinal Cord Injury: Defining the Problems. *Journal Of Neurotrauma*, **2004**, 21: 4, p: 429-440
96. **Oh SK, Jeon SR.** Current Concept of Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury: A Review. *Korean J Neurotrauma*, **2016**, 12(2):40-46
97. **Olby N.** Current Concepts in the Management of Acute Spinal Cord Injury. *J Vet Intern Med*, **1999**, 13:399–407

98. **Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW.** Rat Models of Traumatic Spinal Cord Injury to Assess Motor Recovery. *ILAR Journal*, **2007**, 48: 4, p: 385-395
99. **Orhan DD, Özçelik B, Selda Özgen S, Ergün F.** Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiological Research*, **2010**, 165; 496-504
100. **Oztanir MN, Ciftci O, Cetin A, Aladag MA.** Hesperidin attenuates oxidative and neuronal damage caused by global cerebral ischemia/reperfusion in a C57BL/J6 mouse model. *Neurol Sci.*; **2014**, 35(9):1393-1399
101. **Önyay T, İnal KS, Özbakır BD.** Spinal Nöroanatomi. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Surg-Special Topics*, **2016**, 2(3):1-5
102. **Özbek Z, Özkara E, Arslantaş D.** Travmatik Omurilik Yaralanmaları Epidemiyolojisi ve Korunma Yolları. *Türkiye Klinikleri/J Neurosurg-Special Topics*, **2015**, 5(2)
103. **Özoran K, Tülek N, Düzgün N.** Romatoid Artrit (Ra) ve Sitokinler : İnterlökin-1 (IL-1), İnterlökin-6 (IL-6), Tümör Nekrozis Faktör Alfa (Tnf-A) Ve İnterferon Gama (Ifn-gama). *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*, **1994**, Vol. 47 : 495-504
104. **Öztürk ÖÇ, Gürer B, Kertmen H, Bozkurt H, Kasım E ve ark.** Progesteron'un Tavşan Spinal Kord İskemi/Reperfüzyon Hasarında Nöroprotektif Etkileri. *Türk Nöroşir Derg.*, **2016**, 26 (3): 207-217
105. **Panjabi MM.** Experimental Spinal Cord Trauma A Biomechanical Viewpoint. *Paraplegia*, **1987**, 25, 217-220
106. **Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M.** Antioxidant and Anti Inflammatory Properties of the Citrus Flavonoids Hesperidin and Hesperetin: An Updated Review of their Molecular Mechanisms and Experimental Models. *Phytother. Res.*, **2015**, 29(3): 323-31
107. **Park HJ, Kim MJ, Ha E, Chung JH.** Apoptotic effect of hesperidin through caspase3 activation in human colon cancer cells, SNU-C4. *Phytomedicine*, **2008**, 15,147–151
108. **Polat E, Gökmen N, Öçmen E, Bağrıyanık A, Kuyumcu M ve ark.** Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Aktive Protein C'nin Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması. *Türk Anest Rean Der Dergisi*; **2012**, 40(4):212-221
109. **Polat N, Ciftci O, Cetin A, Yılmaz T.** Toxic effects of systemic cisplatin on rat eyes and the protective effect of hesperidin against this toxicity. *Cutan Ocul Toxicol*, **2016**, 35(1): 1–7
110. **Porter AG, Janicke RU.** Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, **1999**, 6, 99-104
111. **Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K ve ark.** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, **2004**, 15(3): s 415-436
112. **Putz R, Pabst R.** *Sobotta Atlas of human anatomy*. Volume 1, Elsevier Urban & Fischer, 14. Edition, Germany, **2006**
113. **Raza SS, Khan MM, Ahmad A, Ashafaq M, Khuwaja G ve ark.** Hesperidin ameliorates functional and histological outcome and reduces neuroinflammation in experimental stroke. *Brain Research*, **2011**, 1420; 93 – 105
114. **Rezaeyan A, Haddadi GH, Hosseinzadeh M, Moradi M, Najafi M.** Radioprotective effects of hesperidin on oxidative damages and histopathological changes induced by X-irradiation in rats heart tissue. *J Med Phys.*, **2016**, Jul-Sep; 41(3): 182–191
115. **Rizzo DC.** *Fundamentals of Anatomy & Physiology*: Chapter 10 The Nervous System Introduction, Spinal Cord and Spinal Nerves. Third Edition, Delmar Learning, USA, **2010**
116. **Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M.** Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin-A mini-review. *Life Sciences*, **2014**, 113: 1–6
117. **Rotimi SO, Bankole GE, Adelani IB, Rotimi OA.** Hesperidin prevents lipopolysaccharide-induced endotoxicity in rats. *Immunopharmacol Immunotoxicol.*, **2016**, Oct;38(5):364-71
118. **Rouanet C, Reges D, Rocha E, Gagliardi V, Gisele Sampaio Silva GS.** Traumatic spinal cord injury: current concepts and treatment update. *Arq Neuropsiquiatr*, **2017**, 75(6):387-393
119. **Rowland JW, Hawryluk GWJ, Kwon B, Fehlings MG.** Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurg Focus*, **2008**, 25 (5):E2
120. **Sekhon LHS, Fehlings MG.** Epidemiology, Demographics, and Pathophysiology of Acute Spinal Cord Injury. *Spine*, **2001**, Vol: 26, S2-12
121. **Selmi S, Rtibi K, Grami D, Sebai H, Marzouki L.** Protective effects of orange (*Citrus sinensis* L.) peel aqueous extract and hesperidin on oxidative stress and peptic ulcer induced by alcohol in rat. *Lipids Health Dis.*, **2017**, 16: 152

122. **Sencer A, Aydoseli A, Aras Y, Akçakaya MO, Gömleksiz C ve ark.** Effects of combined and individual use of N-methyl-D aspartate receptor antagonist magnesium sulphate and caspase-9 inhibitor z-LEDH-fmk in experimental spinal cord injury. *Turkish Journal of Trauma & Emergency Surgery*, **2013**, 19 (4):313-319
123. **Sengul G, Coban MK, Cakır M, Coskun S, Aksoy H, Hacimuftuoglu A, Saruhan F, Calık M.** Neuroprotective Effect of Acute Interferon-Beta 1B Treatment after Spinal Cord Injury. *Turkish Neurosurgery*, **2013**, Vol: 23, No: 1, 45-49
124. **Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A ve ark.** Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord*, **2017**, 55, 714–721
125. **Suarez J, Herrera MD, Marhuenda E.** In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine*, **1998**, Vol. 5(6), pp. 469-473
126. **Subramanian P, Anandan R, Jayapalan JJ, Hashim OH.** Hesperidin protects gentamicin-induced nephrotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling and inhibits inflammation mediated by NF-κB in rats. *Journal of functional foods*, **2015**, 13 ;89-99
127. **Şahin Kavaklı H, Koca C, Alıcı Ö.** Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. *Turkish Journal of Trauma&Emergency Surgery*, **2011**, 17(1):14-18
128. **Şenel A, Yıldız Ö, Yıldız L, Çokluk C, Tümkaya L ve ark.** Deneysel Medulla Spinalis Travmasında Magnezyum Sülfatın Klinik ve Histopatolojik Etkilerinin İncelenmesi. *Ulusal Travma Dergisi*, **1999**, 5(3):147-151
129. **Şener TE, Tınay İ, Akbal C, Erşahin M, Çevik Ö ve ark.** Tadalafil attenuates spinal cord injury induced oxidative organ damage in rats. *Marmara Pharm.*, **2014**, 18: 49-55
130. **Şirin YS, Keleş H, Beşaltı Ö, Atalay Vural S.** Comparison of ATP-MgCl₂ and Methylprednisolone in Experimental Induced Spinal Cord Trauma. *J Clin Anal Med.*, **2012**, 3(4):442-447
131. **Tamilselvam K, Braidy N, Manivasagam T, Essa MM, Prasad NR ve ark.** Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, **2013**, (8):102741, Epub 2013 Sep 24
132. **Tanrıverdi T.** Omurilik Yaralanmaları: Patofizyoloji. *Türkiye Klinikleri J Neurosurg-Special Topics*, **2015**, 5(2): 31-36
133. **Tator CH.** Update on the Pathophysiology and Pathology of Acute Spinal Cord Injury. *Brain Pathology*, **1995**, 5: 407-413
134. **Tator CH, Fehlings MG.** Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, **1991**, Vol. 75(1): 15-26,
135. **Tirkey N, Pikhwal S, Kuhad A, Chopra K.** Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC Pharmacology*; **2005**, 5(2)
136. **Tomatr AG.** Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *T Klin Tıp Bilimleri*, **2003**, 23:499-508
137. **Tortora GJ, Derrickson BH.** *Principles of Anatomy and Physiology*: Chapter 13; The Spinal Cord and Spinal Nerves. 13th Edition, Biological Sciences Textbooks, John Wiley & Sons, Inc.,USA, **2012**, 492-526
138. **Wallace MC, Tator CH, Lewis AJ.** Chronic Regenerative Changes in the Spinal Cord after Cord Compression Injury in Rats. *Surg Neurol*, **1987**, 27:209-19
139. **Wilmsen PK, Spada DS, Salvador M.** Antioxidant Activity of the Flavonoid Hesperidin in Chemical and Biological Systems. *J. Agric. Food Chem.*, **2005**, 53:12
140. **Whiteneck G, Gassaway J, Dijkers M, Jha A.** New Approach to Study the Contents and Outcomes of Spinal Cord Injury Rehabilitation: The SCIREhab Project. *J Spinal Cord Med.*, **2009**, June, 32(3):251–259
141. **Xiong YJ, Chu HW, Lin Y, Han F, Li YC ve ark.** Hesperidin alleviates rat postoperative ileus through anti-inflammation and stimulation of Ca²⁺-dependent myosin phosphorylation. *Acta Pharmacologica Sinica*, **2016**, 37: 1091–1100
142. **Vasanthi P, Nalini G, Rajasekhar G.** Role of tumor necrosis factor-alpha in rheumatoid arthritis: a review. *APLAR Journal of Rheumatology*; **2007**, 10: 270–274
143. **Visnagri A, Kandhare AD, Chakravarty S, Ghosh P, Bodhankar SL.** Hesperidin, a flavanoglycone attenuates experimental diabetic neuropathy via modulation of cellular and biochemical marker to improve nerve functions. *Pharm Biol*, **2014**, Early Online: 1–15
144. **Yılmaz T, Turan Y, Keleş A.** Pathophysiology of the spinal cord injury. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, **2014**, 5 (1): 131-136
145. **Young W.** *Spinal Cord Contusion Models* (Chapter 17). *Progress in Brain Research*, **2002**, Vol:137, s231
146. **Yu S, Yao S, Wen Y, Wang Y, Wang H ve ark.** Angiogenic microspheres promote neural regeneration and motor function recovery after spinal cord injury in rats. *Sci Rep.*, **2016**, Sep 19;6

147. **Yumnam S, Park HS, Kim MK, Nagappan A, Hong GE ve ark.** Hesperidin Induces Paraptosis Like Cell Death in Hepatoblastoma, HepG2 Cells: Involvement of ERK1/2 MAPK. PLOS ONE, **2014**, 9; 6
148. **Zhang D, Ma G, Hou M, Zhang T, Chen L ve ark.** The Neuroprotective Effect of Puerarin in Acute Spinal Cord Injury Rats. Cell Physiol Biochem., **2016**, 39(3):1152-64
149. **Zhang Z, Krebs CJ, Guth L.** Experimental Analysis of Progressive Necrosis after Spinal Cord Trauma in the Rat: Etiological Role of the Inflammatory Response. Experimental Neurology, **1997**, 143, 141–152



ÖZGEÇMİŞ

Ziya YURTAL, 15.05.1985 tarihinde Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Çankırı'nın Çerkeş ilçesinde tamamladı. 2003 tarihinde Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne başladı ve 5 yıllık eğitimini tamamlayarak 2008 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldu. 3 sene Ankara'da özel kliniklerde çalıştıktan sonra 2011 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak akademik hayatına başladı. 2013 yılında ise doktora eğitimine başladı. Halen aynı kurumda çalışmaya devam etmektedir. Dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.