

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OMURİLİK HASARLI SIÇANLARDA EMBRİYONİK
NÖRAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ENZİM
AKTİVİTELERİ, TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE VE
DNA HASAR DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Biyokimya (Eczacılık) Programı

Yüksek Lisans Tezi

Eczacı

Şermin GÜLELİ

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Sibel KONYALIOĞLU

İZMİR
2007

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Sibel KONYALIOĞLU

(Danışman)

.....

Üye : Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU

.....

Üye : Doç. Dr. Emrah KILINÇ

.....

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarıyla bana destek olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım danışman hocam sayın *Yrd. Doç. Dr. Sibel KONYALIOĞLU*'na, çalışma materyalinin sağlanmasında, kök hücrelerin hazırlanmasında büyük katkıları olan ve bilgilerinden yararlandığım Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden sayın *Öğr. Gör. Dr. Taner DAĞCI*'ya, Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı sayın *Prof. Dr. Aysun PABUÇÇUOĞLU*'na, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına ve Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim görevlisi hocalarıma ve öğretim elemanı arkadaşlarıma, gerekli maddi desteği "Hızlı Destek Sağlama Programı" (Proje No: TBAG-HB/83) ile yapan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca bana her zaman güvenen ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.

Ecz. Şermin GÜLELİ

İZMİR, 2007

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii

BÖLÜM GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. GENEL BİLGİLER	3
1.1.1. Kök Hücreler	3
1.1.1.1. Kök Hücrelerin Tarihsel Gelişimi	4
1.1.1.2. Kök Hücrelerin Çeşitleri	5
1.1.1.3. Kök Hücrelerin Kaynakları	7
1.1.1.4. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)	8
1.1.1.5. EKH'lerin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması	9
1.1.1.6. Embriyonik Nöral Kök Hücreler (ENKH'ler)	10
1.1.1.7. EKH'lerin Kullanım Alanları	12
1.1.2. Omurilik Hasarı	13
1.1.2.1. Omurilik Hasarının Tedavisi	17
1.1.3. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)	19
1.1.4. Antioksidan Enzimler	22
1.1.5. Plazma Total Antioksidan Kapasitesi (TAK)	28
1.1.6. Oksidatif DNA Hasarı ve Comet Yöntemi	31

BÖLÜM II GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler	35
2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	36
2.3. Kullanılan Çözeltiler	38

2.3.1. Comet Yönteminde Kullanılan Tam Kan Örneklerini Saklama Çözeltisi (Flash-Freezing Solution)	38
2.3.2. Omurilik NOS ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri ile NO Tayininde Kullanılan Homojenizasyon Çözeltisi	38
2.3.3. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler	39
2.3.4. NO Kitine Ait Çözeltiler	39
2.3.5. NOS Kitine Ait Çözeltiler	40
2.3.6. SOD Kiti Çözeltileri	40
2.3.7. CAT Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler	41
2.3.8. GPx Kit Çözeltileri	41
2.3.9. TAK Tayininde Kullanılan Çözeltiler	42
2.3.10. Oksidatif DNA Hasarı Tayininde (Comet Yöntemi) Kullanılan Çözeltiler	42
2.4. Deney Protokolü	44
2.4.1. Embriyonik Nöral Kök Hücrelerin (ENKH) Hazırlanması	44
2.4.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması	45
2.4.3. Sıçanlara Omurilik Hasarı Uygulanması	47
2.4.4. ENKH'lerin Hasarlı Omurilik Dokusuna Transplantasyonu	47
2.4.5. Operasyon Sonrası Hayvan Bakımı	47
2.4.6. Çalışma Materyalinin Toplanması	48
2.5. Omurilik Hasarlı Bölge Dokusunun Homojenizasyonu	49
2.6. Kullanılan Yöntemler	49
2.6.1. Protein Miktar Tayini	49
2.6.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	50
2.6.3. Non-enzimatik NO Miktar Tayini	51
2.6.4. Non-enzimatik NO Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	52
2.6.5. NOS Aktivitesi Tayini	53
2.6.6. NOS Aktivitesi Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	54
2.6.7. SOD Aktivitesi Tayini	55
2.6.8. SOD Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Örneklerin SOD Aktivitesinin Hesaplanması	56
2.6.9. CAT Aktivitesi Tayini	57
2.6.10. GPx Aktivitesi Tayini	58

2.6.11. Plazma Örneklerinde TAK Tayini	60
2.6.12. TAK Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması	61
2.6.13. Comet Yöntemi ile Oksidatif DNA Hasarı Tayini	62
2.6.14. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi	64
2.7. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi	65
2.8. Etik Kurul Onayı	65

BÖLÜM III BULGULAR

3.1. Standart Eğri Çizimleri	66
3.1.1. Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi	66
3.1.2. NO Tayini Standart Eğrisi	67
3.1.3. NOS Tayini Standart Eğrisi	68
3.1.4. TAK Tayini Standart Eğrisi	69
3.2. Omurilik Hasarlı Bölgesi NO Düzeyleri	70
3.3. Omurilik Hasarlı Bölgesi NOS Aktivitesi Sonuçları	71
3.4. Hasarlı Omurilik Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları	73
3.5. Hasarlı Omurilik Dokusu CAT Aktivitesi Sonuçları	75
3.6. Hasarlı Omurilik Dokusu GPx Aktivitesi Sonuçları	76
3.7. Plazma TAK Düzeyleri	78
3.8. Comet Yöntemi Sonuçları	80

BÖLÜM IV TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Sayısı ile İlgili Tartışma	84
4.2. Omurilik Hasarı Oluşturulmasına İlişkin Tartışma	85
4.3. Deney Gruplarına İlişkin Tartışma	85
4.4. Çalışma Materyalinin Seçimi ve Saklama Koşullarına Yönelik Tartışma	87
4.5. Yöntemlere İlişkin Tartışma	88
4.5.1. NO, NOS Tayin Yöntemlerine İlişkin Tartışma	88
4.5.2. Antioksidan Enzimlerin Tayin Yöntemine İlişkin Tartışma	89
4.5.3. Plazma TAK Tayin Yöntemine İlişkin Tartışma	90

4.5.4. Comet Yöntemine İlişkin Tartışma	91
4.6. Bulgulara Yönelik Tartışma	93
4.6.1. NO ve NOS Düzeylerine Yönelik Tartışma	93
4.6.2. Antioksidan Enzim Aktivitelerine Yönelik Tartışma	95
4.6.3. Plazma TAK Tayini Bulgularına Yönelik Tartışma	97
4.6.4. Comet Yöntemi Sonuçlarına İlişkin Tartışma	98
4.7. Omurilik Hasarı ve ENKH Uygulaması ile İlgili Tartışma	99
ÖZET	101
ABSTRACT	104
YARARLANILAN KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	116

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo I.	Antioksidan bileşiklerin organizmadaki plazma konsantrasyonları ve TAK içerisindeki konsantrasyonlarının yüzdesi	30
Tablo II.	SOD ölçüm kuvvetlerindeki çözeltiler ve miktarları	56
Tablo III.	Katalaz ölçüm kuvvetlerindeki çözeltiler ve miktarları	58
Tablo IV.	GPx ölçüm kuvvetlerindeki çözeltiler ve miktarları	59
Tablo V.	BSA ile standart eğri çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri	66
Tablo VI.	Nitrit ile standart eğri çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri	67
Tablo VII.	Nitrat standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri	68
Tablo VIII.	Trolox standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri	69
Tablo IX.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein cinsinden NO düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları	70
Tablo X.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve kök hücre (ENKH) nakledilmiş gruplara ait omurilik lezyon bölgesinde $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein cinsinden NO düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları	71
Tablo XI.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde nmol/mg protein cinsinden NOS aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	72
Tablo XII.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve kök hücre (ENKH) nakledilmiş kronik grupların omurilik bölgesindeki nmol/mg protein cinsinden NOS aktivitesi sonuçları ve ortalama \pm S.H.'ları	72
Tablo XIII.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesindeki $\text{Ü}/\text{mg}$ protein cinsinden SOD aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	74
Tablo XIV.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik hasar bölgesindeki $\text{Ü}/\text{mg}$ protein cinsinden SOD aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	74
Tablo XV.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinin $\text{Ü}/\text{mg}$ protein cinsinden CAT aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	75

Tablo XVI.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik bölgesinin Ü/mg protein cinsinden katalaz aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	76
Tablo XVII.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde Ü/mg protein cinsinden GPx aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	77
Tablo XVIII.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik hasar bölgesindeki Ü/mg protein cinsinden GPx aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları	77
Tablo XIX.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakli yapılmış akut hasarlı grupların mmol trolox eşdeğeri/mg protein cinsinden TAK düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları	79
Tablo XX.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların mmol trolox eşdeğeri/mg protein cinsinden TAK düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları	79
Tablo XXI.	Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH uygulanmış akut hasarlı grupların comet parametrelerine ait sonuçlar ve ortalama \pm S.H.'ları	81
Tablo XXII.	Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların comet parametreleri sonuçları ve ortalama \pm S.H.'ları	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Fare blastosistinin gelişimi ve blastosistteki iç hücre kitlesinin mikroskopik görünümü	6
Şekil 2.	Çeşitli kök hücre tipleri	7
Şekil 3.	EKH'lerin kültürde üretilme tekniği	10
Şekil 4.	Nöral kök hücre ve kaynaklık ettiği hücreler	11
Şekil 5.	Omuriliğin boyuna ve enine kesiti ile bölümleri	14
Şekil 6.	Sıçan omurilik kesitinde torakal bölgenin gösterimi	14
Şekil 7.	Omurilik hasarının mekanizmaları	17
Şekil 8.	NO'in fizyolojik ve patolojik etkileri	19
Şekil 9.	NO'in L-Arjininden hareketle biyosentezi	20
Şekil 10.	NO'in peroksinitrit ve nitrite dönüşümü reaksiyon denklemi	22
Şekil 11.	Biyolojik sistemlerde oksijen radikallerinin oluşum mekanizması	23
Şekil 12.	Kimyasal redüksiyon ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu	24
Şekil 13.	Fiziksel redüksiyon ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu	24
Şekil 14.	SOD'nin katalizlediği reaksiyon denklemi	25
Şekil 15.	CAT'ın katalizlediği reaksiyon denklemi	26
Şekil 16.	GPx'in katalizlediği reaksiyon denklemleri	27
Şekil 17.	Hücrede serbest radikal oluşum mekanizmaları ve antioksidan savunma sitemleri	28
Şekil 18.	Comet yöntemi uygulamasının şematik gösterimi	33
Şekil 19.	Comet yapısının bölümleri	34
Şekil 20.	NO'nun nitrit ve nitrate dönüşümü	31
Şekil 21.	SOD aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi	55
Şekil 22.	Katalaz aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi	57
Şekil 23.	GPx aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi	59
Şekil 24.	Sığır serum albümininin absorbans, konsantrasyon eğrisi	67
Şekil 25.	Nitrit absorbans, konsantrasyon eğrisi	68
Şekil 26.	Nitrat absorbans, konsantrasyon eğrisi	69
Şekil 27.	Trolox % inhibisyon, konsantrasyon eğrisi	70
Şekil 28.	Akut-kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik dokusundaki NO düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	71

Şekil 29.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik dokusundaki NOS aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	73
Şekil 30.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik bölgesindeki SOD aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	75
Şekil 31.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik hasarlı bölgesindeki CAT aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	76
Şekil 32.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik hasarlı bölge dokusundaki GPx aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	78
Şekil 33.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait plazma TAK düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	80
Şekil 34.	Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait kuyruk momenti ve % kuyruk DNA'sı düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı	83
Şekil 35.	Oksidatif DNA hasarının comet yöntemi ile agaroz jel üzerinde kalitatif olarak belirlenmesinde kullanılan örnek mikroskop görüntüleri	89

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik yaralanmalarına bağlı oluşan hasarı, bütünüyle önleyebilecek tedavi yöntemi tüm araştırmalara rağmen henüz bulunamamıştır. Kuzey Amerika'da her yıl yaklaşık 10.000, İngiltere'de ise 700 tane omurilik hasarı vakası bildirilmektedir. Türkiye'de ise bu oran yılda 1600-2000 vaka civarındadır (51, 75).

Omurilik yaralanmalarının en sık rastlanan sebepleri trafik kazaları (%41), düşmeler, şiddet ve spor yaralanmalarıdır. Omurilik yaralanmasında primer hasar mekanik çarpmanın etkisi ile gerçekleşir ve mekanik yaralanmanın, biyokimyasal mekanizmaları tetiklemesi sonucu sekonder hasar gelişir (97). Yaralanmadan sonra başlayan bu ikincil hasar kaskadının durdurulması ya da yavaşlatılması klinik tedavinin asıl amacıdır ve “**nöroproteksiyon (nöral koruma)**” olarak adlandırılmaktadır. Bu amaçla ilaç tedavileri, doku oksijenlenmesinin düzeltilmesi, omurilik basısının kaldırılması, vertebranın sabitlenmesi, kök hücre transplantasyonu gibi birçok medikal ve cerrahi yaklaşım denenmektedir (12, 14). Özellikle son 20 yılda omurilik yaralanmasında farmakolojik korumaya yönelik pek çok çalışma yapılmış, ancak bunlardan hiçbiri standart bir tedavi yöntemi olarak kullanılamamıştır (78).

Omurilik yaralanmasına bağlı komplikasyonlara ilişkin tanı, izleme ve tedavi yöntemlerinde sağlanan büyük ilerleme ile omurilik hasarlı hastaların ortalama yaşam süreleri oldukça uzamıştır ancak sağlıklı kişilere oranla halen daha kısadır. Bunun başlıca nedeni hastalık sonrasında görülen metabolik bozukluklardır (15). Omurilik yaralanmasını izleyen akut dönemde protein; subakut ve kronik dönemde ise karbonhidrat ve lipid metabolizmalarında önemli değişiklikler ortaya çıkmaktadır.

Bu değişikliklerin nedeni ise omurilik hasarından birkaç dakika ya da saatler sonra hasarlı bölgede farklı mekanizmalarla açığa çıkan serbest radikallerdir. Bu radikaller hücrenin DNA yapısında da hasara neden olmaktadır. Ayrıca omurilik yaralanmasının akut döneminde idrarla azot atılımının artışı ve negatif azot dengesi yaklaşık 1-3 hafta sürmekte ve daha sonra azot dengesi normale dönmektedir (89).

Günümüzde, deneysel omurilik hasarı oluşturulmuş hayvanlarda yapılan çalışmalarda hasar bölgesine schwann hücreleri, olfaktor glial hücreler, embriyonik ve erişkin kök hücrelerin transplantasyonu uygulanmış ve tümü “**hücre tedavileri**” olarak adlandırılmıştır. Ayrıca insanlar üzerinde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalar kısa süre önce yayınlanmış ve omurilik hasarından sonra insana nakledilecek ideal hücrenin özelleşmiş nöral öncü kök hücreler olduğuna karar verilmiştir (32). Deney hayvanları ve insanlar üzerinde yapılan bu çalışmaların sonuçları ümit vericidir ancak uzun süreli, çok merkezli çalışmalar yapılmadan tedavi yöntemi olarak kabul edilemezler.

Literatürlerden elde ettiğimiz bilgiler ışığında, hücre tedavisinin omuriliğin hasarlı bölgesindeki enzim aktiviteleri, total antioksidan kapasite ve DNA yapısı üzerinde ne gibi etkiler yarattığına dair bir çalışma yapılmamıştır. Kök hücre tedavisinin bu hücresel parametreler üzerindeki etkisinin araştırılmasına tarafımızca gerek duyulmuştur.

Çalışmamızda, *in vivo* akut ve kronik omurilik hasarı uygulanmış sıçanlarda embriyonik nöral kök hücre (ENKH) tedavisinin oksidatif stres belirteçleri, total antioksidan kapasite (TAK) ile DNA yapısı üzerindeki etkilerini inceledik. Bu amaçla, sıçanlar akut, kronik hasarlı, kök hücre uygulanmış akut, kronik hasarlı gruplar ile akut, kronik kontrol grupları olmak üzere altı gruba ayrıldı. Bu grupların;

1) Hasarlı omurilik bölgesinde, nitrozatif stres belirteçleri olarak nitrik oksit (NO) düzeyleri, nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesi; antioksidan enzimler olarak glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri,

2) Plazmada organizmanın antioksidan kapasitesinin göstergesi olarak TAK,

3) Tam kanda, comet yöntemi ile oksidatif DNA hasarı tayini yapılmıştır.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, canlı vücudunda çok uzun süre bölünerek kendini yenileyen, aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak bütün doku ve organları oluşturan hücrelerdir (110). Kök hücrelerin, vücuttaki diğer hücrelerden farklı olan üç önemli özelliği vardır. Bunlar;

a) Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilir ve kendilerini yenileyebilirler: Hücrelerin bölünme kapasitesini, bir bakıma ömrünü belirleyen faktörlerden biri doğrusal kromozomların ucunda yer alan ve telomer denilen DNA zincirleridir. Her çoğalma döngüsü sırasında ve oksidatif DNA hasarı gibi nedenlerden dolayı telomerik DNA'nın bir kısmı kaybolur. Bu kaybı önlemek amacıyla telomerler, telomeraz enzimi tarafından uzatılırlar. Somatik hücrelerin çoğunda telomeraz etkin durumda değildir. İnsan germ, tümör ve embriyonik kök hücre serilerinde ise telomeraz etkinliği bulunmuştur. Bu durum, kök hücrelere sınırsız bölünme özelliği kazandırır (112).

b) Özelleşmemişlerdir: Kök hücreler, özelleşmiş işlevleri yerine getirebilecek herhangi bir dokuya özgün yapı taşımazlar. Eritrositler gibi oksijeni dokulara taşıyamaz ya da sinir hücreleri gibi doku ve organlara, gerekli olan elektrokimyasal sinyalleri iletmezler.

c) Özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilirler: Kök hücreler dokulara dönüşmezler ancak kök hücrelerden türeyen öncül hücreler aracılığıyla birçok hücre ve dokuya kaynaklık ederler. Bu durum *farklılaşma* olarak adlandırılır (109).

1.1.1.1. Kök Hücrelerin Tarihsel Gelişimi

Dünyada kök hücre çalışmaları, ilk kez 1878 yılında memeli yumurtalarını vücut dışında fertilize etme girişimleri ile başlamıştır. 1959'da *in vitro* fertilizasyonla ABD'de ilk hayvan (tavşan) üretilmiş, 1960 yılında ise sıçanlarda teratokarsinomların (doğuştan gelen kanser hücreleri) embriyonik germ hücrelerinden kaynaklandığı gösterilmiştir. 1970'de kök hücreler, embriyonik gelişimi göstermek amacıyla kültür ortamında çoğaltılmış, 1978 yılında ise ilk *in vitro* fertilizasyon bebeği, İngiltere'de doğmuştur.

1981'de Evans ve Kaufman 3.5 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden fare embriyonik kök hücrelerini elde edip kültürde çoğaltmayı başarmışlardır. 1989'da Pera, üç ana germ tabakasının herbirinden, insan embriyonal karsinom hücre dizilerini elde etmiştir. *In vitro* fertilizasyon için gönüllülerce verilen örneklerden insan blastosistleri 1994 yılında izole edilmiş ve 1995-96'da hayvanlardan ilk kez *in vitro* embriyonal kök hücre alınmıştır (54).

1998'de James Thomson, insan blastosistlerinin iç hücre grubundan insan embriyonik kök hücrelerini elde etmiş ve kültürde çoğaltmıştır. Aynı zamanda, fetal gonadal dokulardaki izole bir grup hücreden insan embriyonik germ hücreleri ayrıştırılmış ve bu hücreler "**primordial germ hücreler**" olarak adlandırılmıştır. (102).

Embriyonik kök hücrelerin elde edilmesi, araştırılması ve tedavi amaçlı kullanımında ülkelere bağlı olarak görüşler değişmektedir. Örneğin, İrlanda'da kök hücre araştırmaları yasaklanmıştır ve Avusturya'da yalnızca çocuk yapma amaçlı embriyo oluşturulabilmektedir. İsveç, Finlandiya, İngiltere gibi ülkelerde ise kısırlık tedavisi gören insanlar tarafından bağışlanan embriyolar, deneysel olarak kullanılabilir. Amerika'da ise Ağustos 2001'de bilim çevrelerinin eleştirilerine rağmen kök hücre araştırmalarına kısıtlama getirilmiştir (95).

Ülkemizde özellikle kemik iliği, periferik kan ve son zamanlarda kordon kanı kök hücre çalışmaları konusunda önemli gelişmeler olmuştur. İnsan embriyonik kök hücre çalışması yapan ilk kurum İstanbul Memorial Hastanesi'dir. Hacettepe, İstanbul, Akdeniz, Ankara, Ege, Gazi, Bilkent Üniversitesi'nde kök hücre konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Konunun önemi ve halkın bu konu hakkında bilgi sahibi olmaması nedeniyle 2005 yılının başlarında Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) bir rapor yayımlamıştır. Raporda, bugün tartışılan embriyonik kök hücre çalışmalarıyla ilgili bir an önce yasal önlemlerin alınması gerektiği vurgulanmış, Sağlık Bakanlığı ise Eylül 2005'te ülkemizde insan embriyonik kök hücre çalışmalarını yasaklamıştır (7).

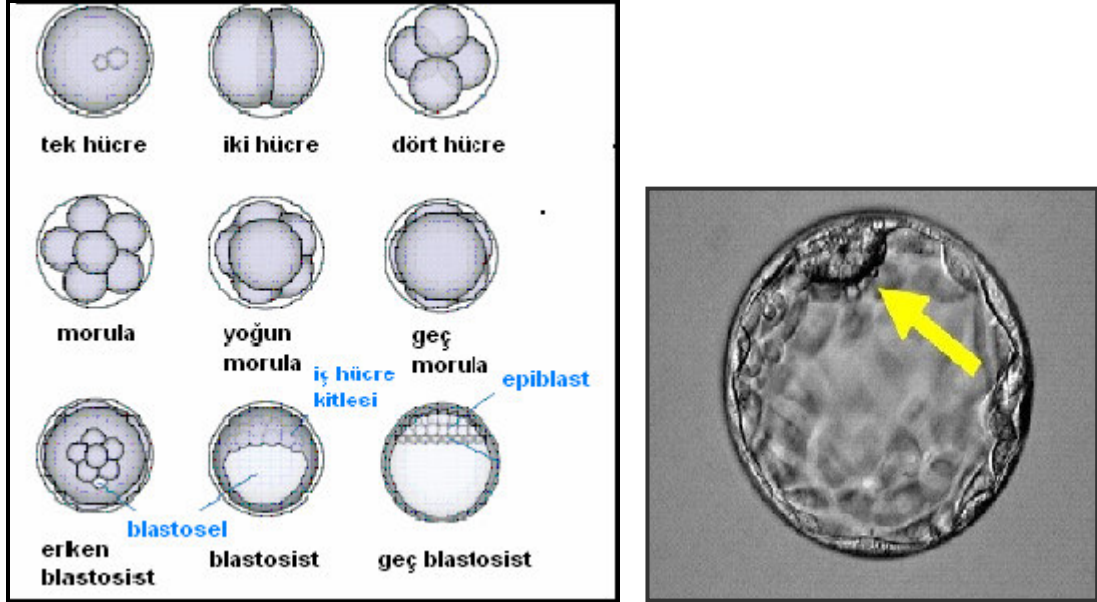
1.1.1.2. Kök Hücrelerin Çeşitleri

Kök hücrelerin totipotent, pluripotent ve multipotent hücreler olmak üzere üç çeşidi vardır.

a) Totipotent hücreler: Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücre sperm ve yumurtanın birleşmesiyle oluşan “**zigottur**”. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında “**totipotent hücre**” denir. Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadarki tüm blastomerler totipotenttir. Bu hücrelerin her birinden ayrı bir birey elde edilebilir yani tam bir embriyo ve embriyo dışı yapıları oluşturabilme yeteneğindedirler. Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Totipotent bir hücre, anne kaynaklı uygun destekle yeni bir bireye kaynaklık edebilen hücredir (24).

b) Pluripotent hücreler: Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde hücreler, ‘**blastosist**’ denilen ortası boşluklu mikroskobik hücre topluluklarına dönüşürler. Blastosist üç yapıdan oluşur: blastosisti çevreleyen hücre tabakası *Trofoblast*, blastosistin içindeki *blastosöl* boşluğu ve blastosölün sonunda yer alan

iç hücre kitlesi. Şekil 1'de fare blastosistinin gelişimi ve iç hücre kitlesinin mikroskopik görünümü verilmiştir (98).

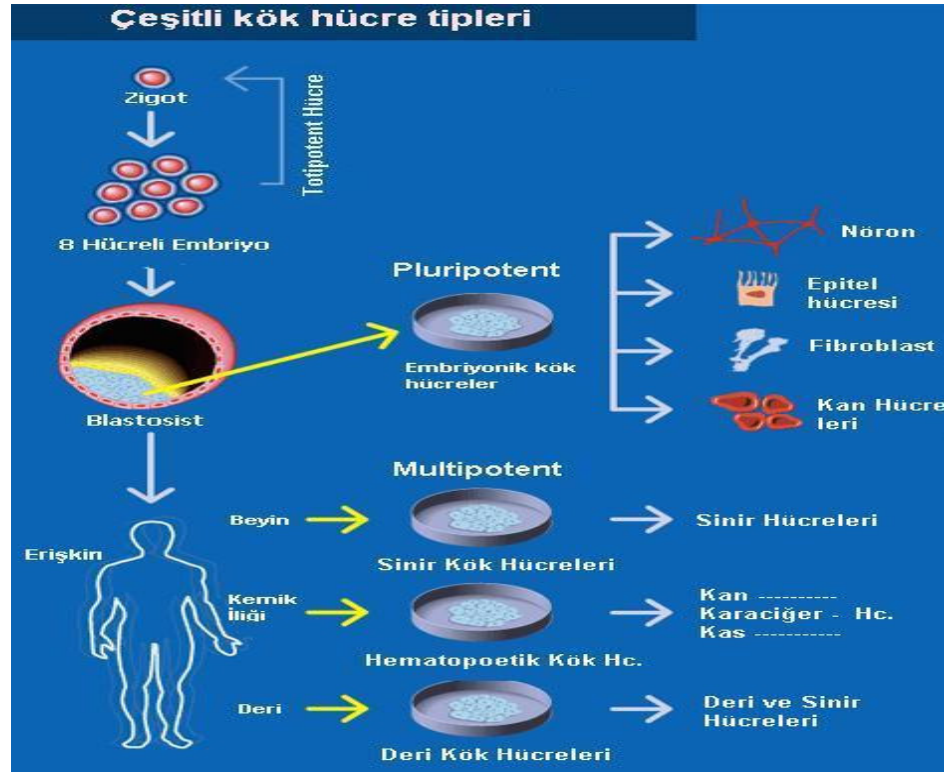


Şekil 1. Fare blastosistinin gelişimi ve blastosistteki iç hücre kitlesinin mikroskopik görünümü (98)

Blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler üç embriyonik tabakadan (endoderm, ektoderm ve mezoderm) köken alır ve birçok hücreye (yaklaşık 270 çeşit hücre) kaynaklık edebilirler. Bu özelliğe sahip kök hücrelere “**pluripotent hücreler**” denir. Blastosist evresi embriyonik dönemin 2. haftasının sonuna kadar devam eder daha sonra yapı embriyo adını alır. Embriyonik kök hücreler blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve pluripotenttirler. Bu hücreler, vücuttaki bütün dokulara kaynaklık edebilirler fakat kendilerinden yeni bir birey meydana gelmez (98).

c) Multipotent hücreler: Embriyonun ilerleyen dönemlerinde (fetal dönem) hücreler daha özel görevlere sahip olan erişkin kök hücrelerine dönüşürler. Bu hücreler, tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Örneğin kemik iliğindeki kök hücreler, kan hücrelerine kaynaklık eder. Bunun yanında, bütün sinir hücre türlerine kaynaklık eden sinir kök hücreleri ve osteoblastlara, kondroblastlara,

fibriblastlara ve adipositlere farklılaşan mezenkimal kök hücreleri vardır. Özelleşmiş olan bu kök hücelere “**multipotent hücreler**” denir (107). Şekil 2’de kök hücrelerin çeşitleri ve organizmadaki dağılımı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2. Çeşitli kök hücre tipleri (107)

1.1.1.3. Kök Hücrelerin Kaynakları

Kök hücreler iki farklı kaynaktan elde edilirler. Bunlar;

I) Embriyonik kök hücreler (EKH): Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler.

II) Embriyonik olmayan kök hücreler: Doğum sonrası dönemde embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilirler. Kaynaklarına göre beş alt sınıfa ayrılırlar:

- Erişkin kök hücreleri
- Fetüs kök hücreleri
- Kadavradan elde edilen kök hücreler

d) Partonet hücreleri

e) Göbek kordonu ve plasenta kök hücreleridir.

Embriyonik olmayan kök hücreler, organizmada beyin, akciğer, kalp, pankreas, karaciğer, böbrek, kıkırdak, kemik iliği, kas ve damarlarda dağılmış durumdadır ve bu hücrelerden hareketle tüm hücreler elde edilebilir. Ancak büyümeleri, çoğalmaları için EKH'lere göre daha uzun zaman gerektirmektedir ve bölünme, değişim potansiyelleri düşüktür (114).

1.1.1.4. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Embriyonun blastosist evresinde yaklaşık 30 adet hücre taşıyan iç hücre kitlesinden elde edilen hücrelerdir, pluripotenttirler. Uygun şartlarda *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda hızlı bir şekilde embriyonik tabakalardaki çoklu hücre tiplerine farklılaşma özelliğindedirler.

EKH'ler daha çok tüp bebek ünitelerinden elde edilir. Erişkin kök hücrelerine göre daha hızlı çoğalır ve kendilerini yenilerler. Çoğalma çeşitliliği olarak da geniş bir yelpazeye sahiptirler. Somatik hücrelerin belirli bir hücre döngüsü vardır. Bu döngü hücrelerin mitoz bölünmeye hazırlık yapmasıyla başlar ve bu faza G_1 fazı denir. G_1 fazından sonra sırasıyla DNA sentezinin gerçekleştiği S fazı, G_2 fazı gelir. G_2 fazından çıkan hücre mitoz bölünmenin olduğu M fazına girer. EKH'ler ise G_1 kontrol noktasından yoksundur ve zamanlarının büyük bir bölümünü S fazında geçirip, DNA sentezlerler. Daha sonra mitoz bölünme ile çoğalırlar. Ayrıca EKH'lerin, somatik hücrelerden farklı olarak DNA replikasyonunu başlatmak için bir uyarana ihtiyaçları yoktur (27).

1.1.1.5. EKH'lerin Elde Edilmesi ve çoğaltılması

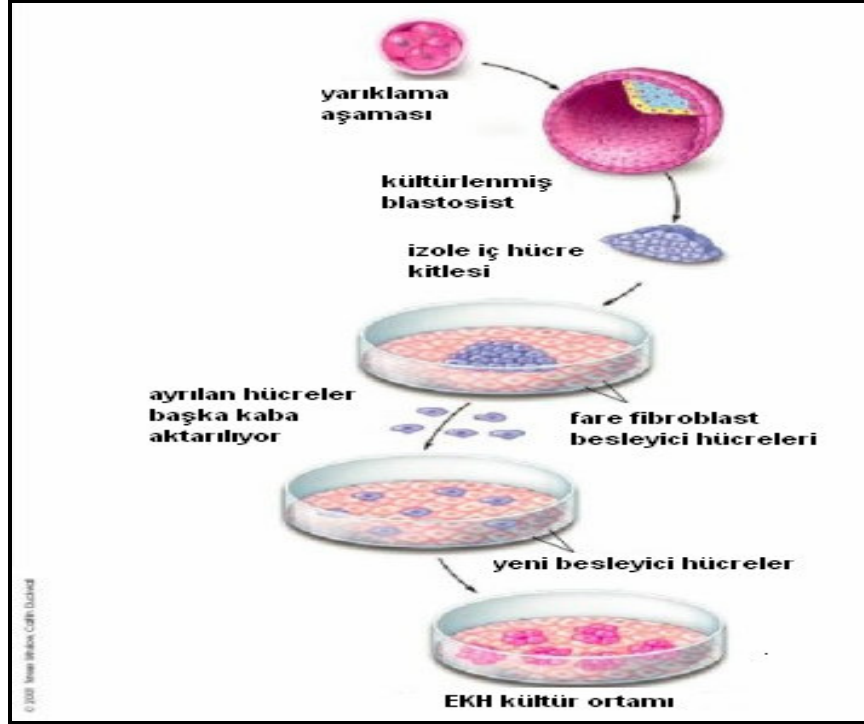
Embriyonik kök hücreler, insanlarda ve sıçanlarda benzer yöntemler kullanılarak blastosistin i hücre kitlesinden elde edilirler. Fare ENKH'lerinin eldesinde, blastosistin tamamı veya blastosist i hücre kitlesi kültür ortamında çoğaltılır. Daha sonra i hücre kitlesi yapıdan izole edilip fare embriyonik fibroblastlarının olduğu bir ortama alınarak EKH kolonilerinin çoğalması sağlanır.

Fibroblastlardan oluşan tabaka gebelik ortasındaki fare fetslerinin kltrlenmesinden elde edilir ve “**besleyici hücre tabakası**” adını alır. Bu tabakadaki hücreler, bölünme ve çoğalma yönünden baskılandıkları için erişkin doku fibroblastlarından farklıdırlar. Bu hücrelerin kültür kabının alt yüzeyini kaplamasının sebebi, i hücre kitlesinden izole edilen hücrelere tutunma yüzeyi sağlamaktır. Fare fibroblastları, insan EKH'lerinin *in vitro* oğalması için de kullanılmaktadır ancak bu tür *in vitro* kültürleme ortamlarının kullanıldığı kök hücre nakillerinin, viral ve enfeksiyöz ajanların alıcıya geçmesi gibi dezavantajları vardır. Bu nedenle insan EKH'lerinin kullanıldığı çalışmalarda fare embriyonik fibroblast besleyici tabakası yerine insan fetal ve erişkin fibroblast besleyici tabakası tercih edilmektedir (19, 95).

Fare EKH'leri, kültür ortamına bir sitokin olan lösemi engelleyici faktör (leukemia inhibitory factor; LIF) ilave edildiğinde besleyici tabaka olmaksızın farklılaşmadan çoğalabilirler, insan EKH'lerinde ise bir değişme olmamaktadır. LIF, fare pluripotent kök hücre topluluğunun canlılığını normal gelişim sürecinin dışında da sürdürmesini sağlamaktadır.

İ hücre kitlesinden alınan hücreler birkaç gün içinde çoğalıp kültür kabını doldurduğunda EKH kolonileri kültür ortamından dikkatli bir şekilde alınarak, yeni kültür kaplarına aktarılırlar. Hücrelerin yer değiştirme işlemi pek çok defa tekrarlanır ve buna “**alt kültürleme (pasaj)**” denir (66). Altı ay ve daha uzun bir süre boyunca

başlangıçtaki 30 hücreli iç hücre kitlesinden milyonlarca EKH elde edilmiş olur ve bu hücrelere “**EKH serisi**” denir. Şekil 3'te EKH'lerin kültürde elde edilme basamakları gösterilmiştir.



Şekil 3. EKH'lerin kültürde üretilme tekniği (87)

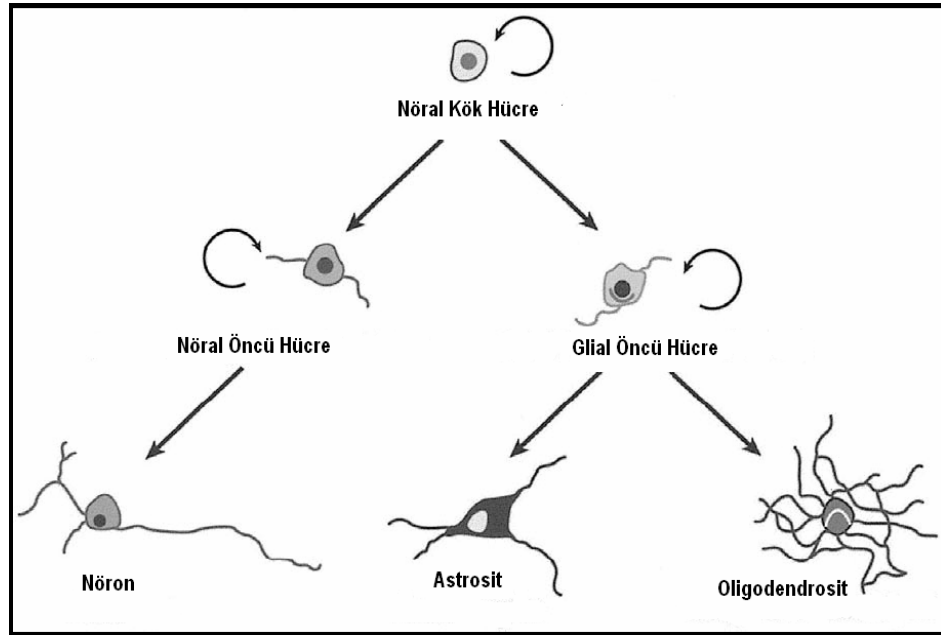
EKH'lerin vücuttaki tüm dokulara kaynaklık edebileceği, sıçanlarda tam olarak gösterilebilmiştir. İnsan EKH'leri ile yapılan çalışmalarda ise çoğu hücre tipi henüz gözlenmemiştir ve çok az çalışmada, farklılaşmış hücrelerin işlevsel oldukları gösterilmiştir (87).

1.1.1.6. Embriyonik Nöral Kök Hücreler (ENKH'ler)

Nöral kök hücreler (NKH'ler), omurgasızlarda nöral gelişim sürecinin araştırılması sırasında nöral öncül hücrelerin bulunması ile keşfedilmiştir. Sonraki çalışmalarda, memeli embriyonunun santral ve periferik sinir sisteminden hareketle

NKH'ler izole edilmiştir (53). Günümüzde sıçan embriyosunun beyin korteksinden, hipokampüsünden, serebellumundan ve omurilik bölgesinden NKH'ler ayrıştırılabilmektedir. Erişkin NKH'leri ise hipokampüs, subventriküler bölge ve omurilikte bulunmaktadır (79).

NKH'lerden türeyen hücre hatları, santral sinir sisteminin (SSS) bölgesine bağlı olarak, nöronları, astrositleri ve oligodentrositleri oluştururlar. Örneğin, beyin korteksindeki nöral kök hücreler önce nörona ait öncü hücreleri oluşturur daha sonra bu hücrelerden hareketle nöronlar gelişir. Glial öncü hücrelerden ise glial hücreler yani astrositler ve oligodentrositler meydana gelmektedir. Bu gelişim süreci Şekil 4'te özetlenmiştir.



Şekil 4. Nöral kök hücre ve kaynaklık ettiği hücreler (113)

Kültür ortamında özelleşmiş öncü hücreler oluşmadan önce ENKH nakli yapıldığında, nakil bölgesinde farklı hücreler ve teratom gelişmektedir (113). Bunu önlemek amacıyla, araştırmalarda genellikle kök hücrelerden hareketle *in vitro* sentezlenen çok sayıda nöral öncü hücreler (oligodendroglial hücre hatları, nöral

öncü hücreler) kullanılmaktadır. Hedef organa nakledilen ENKH'lerin burada uygun kardeş hücrelere dönüşmesi ve yaşamını sürdürmesi gerekmektedir. Ancak bu hücrelerin hangi hücrelere kaynaklık edeceği hedef bölgedeki yerel uyarılar ile belirlenmektedir (88).

1.1.1.7. EKH'lerin Kullanım Alanları

İnsan EKH'lerinin *in vitro* ortamda özgün hücre serilerine farklılaşmasına dayanan araştırmalar bu hücrelerin; gen tedavilerinde, gelişimsel biyolojide teratolojik ve toksik bileşiklerin tanımlanmasında, hücre esaslı tedavilerde hücrelerin ve dokuların üretilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir (28).

İnsanlara ait hücre tiplerinin ve dokuların elde edilebilmesi ile, kronik hastalıkların tedavisi mümkün olmakta, patolojik olaylar ve doğumsal hatalar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Son yıllarda gen mühendisliği ve gen tedavisinde de kök hücrelerden yararlanılmaya başlanmıştır. EKH'lerin kanser hücrelerine olan benzerlikleri kullanılarak kanserin oluşum mekanizması ve tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. İnsan EKH'lerinin en önemli kullanım sahası hücre esaslı tedaviler için hücrelerin ve dokuların üretilmesidir. Bu hücreler ile tedavi edilebilecek hastalıklar arasında Parkinson, Alzheimer, tip I diabet, multiple skleroz, omurilik hasarı, kalp yetmezliği, kanser, genetik ve otoimmün hastalıklar (osteoartrit, romatoid artrit) vardır (9).

Bu yaklaşımların klinikte uygulanabilmesi için bazı sorunların aşılması gerekmektedir. Örneğin, istenilen hücre türünün yeterli sayıda ve saf bir şekilde elde edilmesi zordur ve özgün bir patolojiyi düzeltmek için hangi hücre tipinin nasıl çoğaltılacağı bilinmelidir. EKH'lerin dikkatli bir şekilde takip edilmeleri ve söz konusu işlevler üzerindeki etkilerinin tam olarak bilinmesi gerekmektedir. Hücresel tedavilerde, istenmeyen durumlarda tedavinin sonlandırılması, insan EKH'lerinin

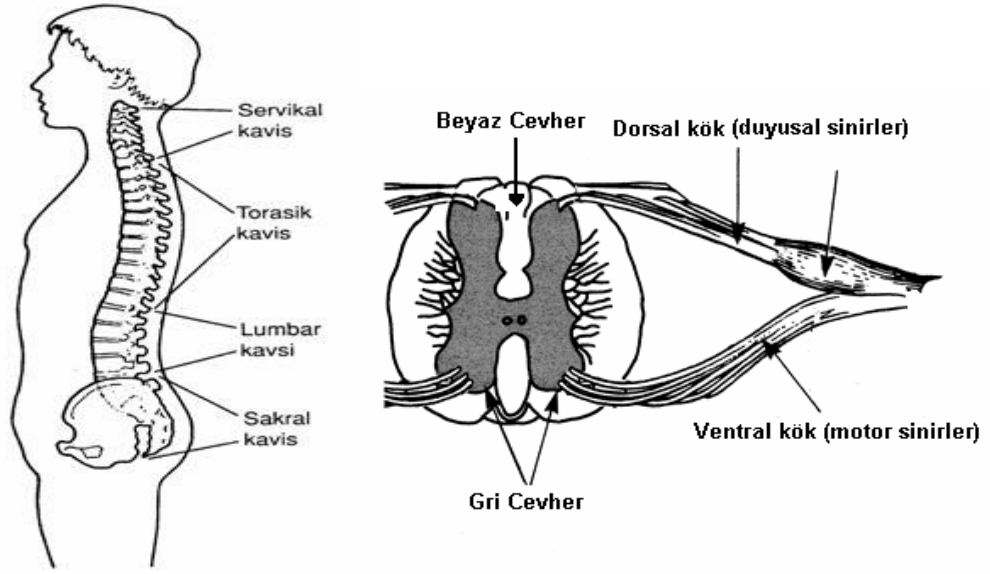
geniş ölçekli saklanması ve bunların besleyici hücrelere gerek duymadan çoğaltılabilmeleri de önemli sorunlardır. EKH serilerinin, zaman içinde ortaya çıkabilecek mutasyonlardan etkilenip etkilenmeyeceği bilinmemektedir ve nakledildikleri bölgede tümör oluşturma potansiyelleri vardır. Nakledilen hücrelerin reddini engellemeye yönelik stratejilerin de geliştirilmesi gerekmektedir (6).

EKH tedavisi, klinik sorunların yanı sıra etik açıdan da birçok tartışmaya neden olmaktadır. Bazı ülkelerde kök hücre çalışmalarına hukuksal kısıtlamalar getirilmiştir, bu çalışmaları destekleyen ülkelerde ise kök hücre uygulamaları geniş çapta yapılmaktadır (33).

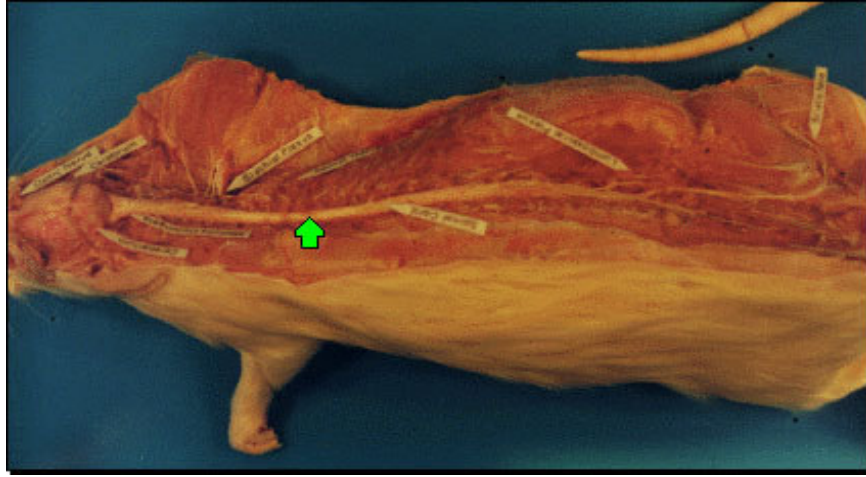
1.1.2. Omurilik Hasarı

Yetişkin insanlarda omuriliğin ortalama uzunluğu 40-45 cm, ağırlığı ise 30-35 gr kadardır. Embriyonik dönemin 3. ayına kadar tüm omurilik kanalını, daha sonraki gelişim döneminde ise bu kanalın daha hızlı büyümesi nedeniyle 2/3'ünü kapsar. Omurilikten 31 çift spinal sinir çıkar. Bunlardan 8 çifti servikal, 12 çifti torakal, 5 çifti lomber, 5 çifti sakral, 1 çifti de koksigeal'dir.

Omuriliğin iç kısmında gri cevher, dışında ise beyaz cevher bulunur ve enine kesiti kelebeğe benzer yapıdadır. Gri cevherde hücre gövdeleri, bazı aksonlar, nöroglia ve kan damarları vardır. Beyaz cevher ise miyelinli sinir lifleri, nöroglia ve kan damarlarını içerir. Merkeze taşınan çevresel uyarıların tümü üst bölümden (servikal) geçtiği için beyaz cevher miktarı omuriliğin üst kısmında fazladır. Gri cevherin miktarı ise uyarılacak kas miktarına bağlıdır. Arka kökten duyu sinirler girerken ön kökten motor sinirler çıkar. Şekil 5'de insanda omuriliğin boyuna ve enine kesiti görülmektedir. Şekil 6'da ise sıçan omuriliğinde torakal bölge gösterilmiştir (70).



Şekil 5. Omuriliğin boyuna ve enine kesiti ile bölümleri (70)



Şekil 6. Sığan omurilik kesitinde torakal bölgenin gösterimi (70)

Omurilik hasarı günümüzde oldukça yaygın görülen, önemli sosyal ve ekonomik problemlere yol açan sağlık sorunlarından biridir. Sıklıkla motorlu araç kazaları, spor yaralanmaları, iş kazaları, düşmeler ve şiddet olayları sonucu ortaya çıkmaktadır. Omurilik yaralanmalarını travmatik ve non-travmatik olarak ikiye ayırmak mümkündür (70).

a) Travmatik yaralanma: Bir darbeye ya da basıya maruz kalma sonucu ortaya çıkan omurilik hasarları bu grupta yer alır. Deney hayvanı modellerinde travmatik yaralanma; akut kinetik ve statik basınç uygulama, çarpma, ağırlık düşürme, kısmi olarak omuriliğin kesilmesi (transseksiyon) şeklinde oluşturulur. Yaptığımız çalışmada sıçanlarda, kısmi transseksiyon yöntemi ile travmatik omurilik hasarı oluşturulmuştur.

b) Non-travmatik yaralanma: Herhangi bir darbeye maruz kalmadan omurilikte hasar oluşması durumudur. İskemi, tümör kompresyonu, kimyasal ve fotokimyasal uyarılar ile lazer indüksiyonu omurilik hasarına neden olabilir.

Omurilik hasarının patogenezinde (hastalığa neden olan mekanizmaların kökeni) primer ve sekonder hasar mekanizmaları rol alır.

1) Primer Omurilik Hasarı: Omurilik travmasının oluş şekline ve şiddetine bağlı olarak dokulara uygulanan mekanik kuvvet; doku bütünlüğünü bozar, aksonlar ile kan damarlarında hasara ve ödeme neden olarak hücre membranını parçalar. Travma sırasında ortaya çıkan bu tablo “**primer hasarı**” oluşturur. Günümüzde primer omurilik yaralanmasına özel farmakolojik bir tedavi bulunmamaktadır. Yaralanmanın meydana gelmesini engellemek ve yaralanma sırasında aktif ve pasif güvenlik önlemleriyle vücudun sabit kalmasını sağlamak ortaya çıkacak hasarı azaltabilir. Primer yaralanmanın derecesi, yaralanmaya neden olan gücün etki süresine ve omurilik tarafından absorbe edilen enerji miktarına göre değişir. Omuriliğin uzun süre bası altında kalması, nörolojik hasarı artırır. Omurilik yaralanmasını takiben bradikardi ve hipotansiyonla karakterize omurilik şoku ortaya çıkabilir. Hipotansiyonu önlemek amacıyla kan basıncını arttıran ajanların kullanılması, yeterli sıvı tedavisinin yapılması sekonder hasarın etkilerini de azaltır (16).

2) Sekonder Omurilik Hasarı: Sekonder hasar, primer hasarı takiben dakikalar, saatler içinde başlayıp haftalarca devam eden bir süreçtir. Sekonder

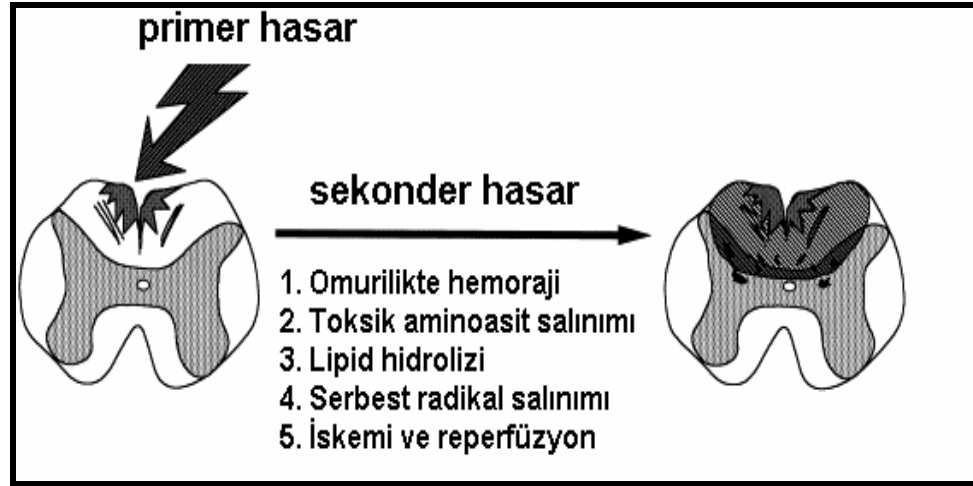
omurilik hasarına yönelik araştırmaların amacı, primer yaralanmadan sonra çevresel nöronlarla bağlantılarını ve canlılığını sürdürmekte olan lezyon bölgesindeki nöronları korumaya, dayanıklılıklarını artırmaya veya bunlara zarar verecek olan patolojik süreçleri durdurmaya yönelik farmakolojik ajanların ve önlemlerin bulunması ve kullanılmasıdır. Sekonder yaralanmayı oluşturan pek çok bileşen vardır. Bu bileşenlerin anlaşılması, gerekli önlemlerin alınabilmesi ve gerekli tedavinin seçimi için önemlidir.

Sekonder yaralanmanın ortaya çıkmasındaki en önemli etkenlerden biri enerji yetersizliğidir (4). Bunun erken dönemdeki başlıca sebebi iskemidir. İskemi, dokulara yeterli glukoz ve oksijen sağlanamamasına, dolaylı olarak da enerji yetersizliğine neden olur. ATP depolarındaki azalmaya bağlı olarak sistem anaerobik solunuma geçer ve bu durum pek çok patolojik sürecin tetiklenmesine yol açar (2).

Nörojenik şoktaki bir hastada, hücre içi sodyum ve kalsiyum iyonlarının yoğunluğunun artmasıyla hücrelerde şişme görülür. Enerji seviyelerindeki azalma, endojen eksitatör amino asitlerin (başlıca glutamat ve aspartat) hücre içi seviyelerinde artışa yol açar ve hücresel düzeyde eksitotoksisteyi başlatır. Eksitotoksiste, gecikmiş apoptotik hücre ölümünden sorumlu mekanizmaların başında gelir. Ayrıca enerji yetersizliğinin yol açtığı mitokondri hasarı ile serbest radikaller ortama salınarak hücre membranındaki doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer ve lipid peroksidasyonunu başlatır. Tüm bu süreç membran bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne ve nörolojik kayıplarda artışa neden olur.

Omurilik hasarında en büyük problemlerden birisi de mesane disfonksiyonudur. Omurilik travmasından hemen sonra üriner retansiyon gelişir. İdrar önce damla damla akar ve bir süre sonra mesane, refleks hareketleri ile boşaltılır. Ancak hastalarda mesane hiçbir zaman tamamen boşaltılamaz ve rezidüel idrar kalır (3).

Bu durum enfeksiyonal böbrek hastalıklarına neden olur. Şekil 7'de omurilik hasarına neden olan mekanizmalar özetlenmiştir.



Şekil 7. Omurilik hasarının mekanizmaları (3).

1.1.2.1. Omurilik Hasarının Tedavisi

Omurilik yaralanmalarında tedavinin amacı sekonder hasarı azaltarak nöron ve buna bağlı gelişen nörolojik fonksiyon kaybını en aza indirmektir. Bunu gerçekleştirmek için temel destek tedavileri, nöron koruyucu ve cerrahi tedaviler uygulanmaktadır. Herhangi bir tedavinin etkinliği ancak iyi yapılmış laboratuvar ve klinik çalışmalar ile ortaya konabilir. Günümüzde ise omurilik yaralanmalarının tedavisinde farklı stratejiler uygulanmaktadır (48).

a) Rejenerasyon stratejileri: Hasarlı nöronların yaşamlarına devam etmeleri, kesilmiş aksonların uzayıp lezyon bölgesini geçmesi, uygun hedeflere uzanarak fonksiyonel sinapsların oluşması rejenerasyon sürecini oluşturan esas basamaklardır. İnsanlarda çevresel sinir sistemindeki aksonlar spontan olarak yenilenirken, SSS'de güçlü bir rejenerasyon görülmez. Yapılan çalışmalarda, deney hayvanlarının lezyonlu nöronlarının yakın çevresine büyümeyi destekleyici materyallerin, schwann hücrelerinin, mikroglial hücrelerin implantasyonunun

rejenerasyonu tetiklediği gösterilmiştir. X ışınlama, glukokortikoidler, tripsin, elastaz veya kollajenaz gibi ajanlarla lezyonun küçültülmesi de omuriliğin rejeneratif kapasitesini artırmaktadır. Ayrıca antioksidanlar, opioid reseptör antagonistleri, tirotropin salgılatıcı hormon ve analogları, sodyum ve kalsiyum kanal blokörleri, kaspaz inhibitörleri gibi ajanlar da sekonder hasarın tedavisinde kullanılmaktadır.

b) Hücre tedavisi stratejileri: Omurilik hasarında omurilik içine hücrelerin tranplantasyonu hücre tedavisi olarak adlandırılmaktadır. Bu amaçla, nöron, astrosit ya da oligodendrosit gibi omurilik hücrelerine dönüşmesi amaçlanan kök hücreler kullanılmaktadır. Bunun dışında yaralanma bölgesinde rejenerasyona destek veren nörotrofik faktörleri salgılayabilecek schwann hücresi ya da olfaktör glia hücresi nakli yapılmaktadır.

Nöral kök hücreler organizmada omurilik merkezini çevreleyen ependimal tabakada bulunmasına rağmen hasar durumunda vücutta aktive olmazlar, kültür ortamına alınıp nestin ile inkübe edildiklerinde nöron üretmeye başlarlar. Bu durum endojen nöral kök hücrelerin *in vivo* inhibe edildiğini göstermiştir. Ayrıca hasardan hemen sonra ortama ENKH uygulanması yalnızca astrositlerin ve glial hücrelerin yapımını uyarırken, nöron yapımında bir gelişme olmadığı kanıtlanmıştır. Bu nedenle ENKH'lerin omurilik hasar bölgesine transplantasyonundan önce ortam koşullarını nöron sentezi için hazırlamak gereklidir. Omurilik hasarından 9 gün sonra hasar bölgesindeki inhibitör etmenlerin ortadan kalktığı bir çalışmada kanıtlanmıştır (84). Başka bir çalışmada, sıçanlarda oluşturulan travmatik yaralanmanın 9. gününde, hasarlı omurilik bölgesine sıçan ENKH'lerinin naklinden sonra bu hücrelerin astrosit, oligodendrosit ve nöronlara farklılaştığı gösterilmiştir (76).

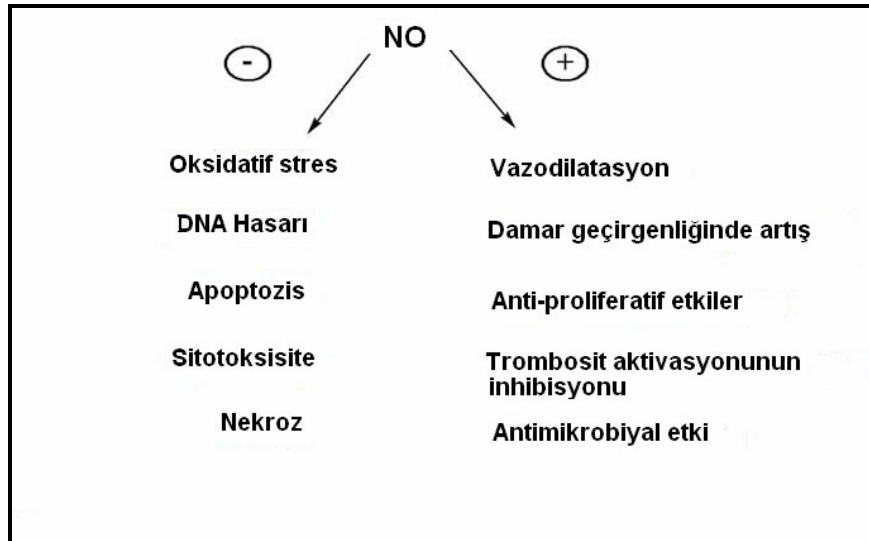
Yapılan laboratuvar çalışmaları omurilik hasarında kök hücre tedavisinin yarar sağlayabileceğini göstermekte ve klinik kullanımını desteklemektedir. Ancak, bu tedavinin hangi hastalarda yarar sağlayabileceği, hastalığın hangi aşamasında

yapılması gerektiği, tedavinin güvenilirliği sorunu halen çözülememiştir. Omurilik hasarının ENKH'ler ile tedavisi konusundaki araştırmalar bu yöntemin ümit verici olduğunu göstermektedir (37).

1.1.3. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)

NO, organizmada ilk olarak endotelyum kaynaklı gevşetici faktör olarak tanımlanmıştır. Biyolojik sistemlerde homeostazın sağlanmasında görev alırken, patolojik yollarda ise sitotoksik etkiler gösterir. Bu zıt etkileri dolayısıyla biyolojik araştırmalara sıklıkla konu olmaktadır (13).

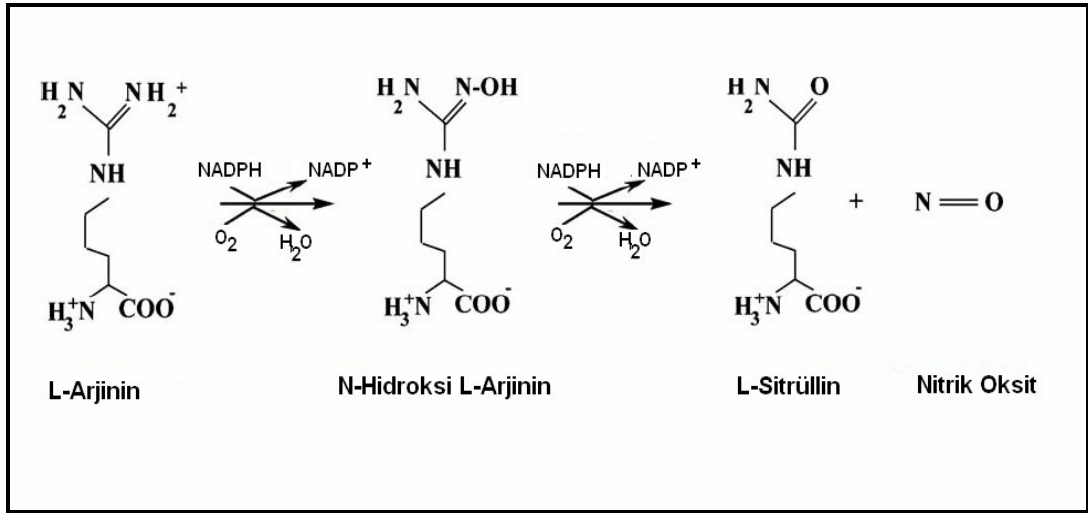
NO, ortaklanmamış elektron taşıyan, membranlardan difüze olabilen gaz yapısında serbest radikal olarak da tanımlanmaktadır. Şekil 8'de özetlendiği gibi NO, sentezlendiği çevreye ve miktara bağlı olarak vazodilatasyon, nörotransmisyon gibi fizyolojik fonksiyonları düzenler. Nörodejeneratif durumlarda ise süperoksit radikalleri ile reaksiyona girerek dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi sitotoksik reaktif nitrojen türlerini oluşturur (13).



Şekil 8. NO'in fizyolojik ve patolojik etkileri (13)

NO, santral ve çevresel sinir sisteminde nöroproteksiyonda, nörotoksisitede, nörotransmisyonunda ve nöroplastisitede rol alır. Omurilikte, nörotransmitter benzeri özellik gösteren ikincil mesajcı gibi davranır. Membran dışına difüze olması ve özelleşmiş salınım-geri alım işlevlerinde görev almasından dolayı diğer nörotransmitterlerden ve modülatörlerden farklıdır. NO, sinaptik veziküllerde depolanmaz ve işlevlerini spesifik membran reseptörleri üzerinden göstermemektedir. Bir nöronda sentezlendikten sonra hücre dışına difüze olarak çevredeki nöronları da etkiler (60).

NO, L-arjinin aminoasitinin NOS enzimi etkisiyle L-sitrülline okside olması ile sentezlenir (Şekil 9).



Şekil 9. NO'nin L-Arjininden hareketle biyosentezi (103)

NOS enziminin organizmada görev alan üç izoformu vardır. Bunlar nöral dokudaki nöronal NOS (nNOS), damar endotelindeki endotelial NOS (eNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS)'tur. Nöronlardaki NO sentezi nNOS aktivasyonuna bağlıdır. nNOS organizmada serebellum, serebral korteks, hipotalamus ve sinir sisteminin farklı bölgelerindeki ganglionlarda bulunur. Damar endotelinde NO sentezi, eNOS aktivasyonuna bağlıdır. eNOS, dokuların oksijenlenmesini sağlar ve

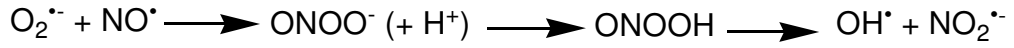
travma, enflamasyon durumlarında kan-beyin bariyerinin bütünlüğünü korur. Ayrıca beyindeki kan dolaşımının düzenlenmesinde görev alarak beyin fonksiyonlarının sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Yapılan çalışmalarda, iNOS aktivasyonuna geç embriyonik ve erken postnatal dönemde sıçan beyindeki damarlarda rastlanmıştır. Doğumdan sonra ise enflamatuvar ajanların etkisi ile glial hücrelerde (astrozitler, mikrogial hücreler) ve makrofajlarda iNOS ekspresyonu görülmüştür. Bu ekspresyon 4-8 gün sürmekte ve nNOS'un sentezlediği NO miktarından 100-1000 kat daha fazla NO sentezlenmekte ve beyinde biyokimyasal değişikliklere neden olmaktadır (103).

Tüm NOS izoformları, homodimerik yapıda olan ve substrat olarak L-Arjinini, kofaktör olarak da nikotinamid adenin dinükleotit fosfatı (NADPH) kullanan enzimlerdir. nNOS ve eNOS'tan hareketle NO sentezi hücre içindeki kalsiyum/kalmodulin oranına bağlıdır. Bu nedenle hücre içi kalsiyum miktarını arttıran agonist moleküller NO sentezini de artırır. iNOS'un aktivasyonu kalsiyum/kalmodulinden bağımsız olarak gerçekleşmekte ve genellikle endotoksinler, endojen proinflamatuvar moleküller ile indüklenerek NO sentezlenmektedir.

Sinir sisteminde NO, iyon kanallarının kontrolünden ve nörotransmitter salınımından sorumludur ve bu etkilerini kanal proteinleri ile doğrudan etkileşerek ya da guanilat siklaz enzimini aktive ederek siklik guanilat monofosfat (cGMP) sentezi üzerinden gösterir. NO, özellikle omurilikteki nöronlarda cGMP artışına bağlı olarak metabolik değişikliklere sebep olmaktadır (43).

NO, bulunduğu ortamda süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ile etkileşerek yüksek oksidan özelliğe sahip peroksinitrite ($ONOO^-$) dönüşür. Peroksinitrit dokularda üç farklı yol ile hasar oluşturur;

- 1) Üzerine proton alarak hidroksi radikali ve nitrite parçalanır (Şekil 10).



Şekil 10. NO'in peroksinitrit ve nitrite dönüşümü reaksiyon denklemi (43)

2) Direkt ve hızlı bir şekilde sülfidril gruplarını, DNA'yı, lipidleri, proteini oksidasyona uğratar.

3) Nitronyum bileşiğine dönüşerek proteinlerdeki fenilalanin ve tirozin aminoasitlerine nitro grubu aktarır.

SOD enzimi varlığında, ortamdaki süper oksit anyonu uzaklaştırılacağı için NO peroksinitrite dönüşemez ve nörotoksik etkisi gözlenmez (10).

Düşük konsantrasyonlardaki NO sinir sisteminde, nöroprotektif ve nörotransmisyonu düzenleyici etkilerde bulunur ancak omurilik hasarı, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda yüksek miktarda sentezlenir ve nörodejenerasyona neden olur.

NO ve NOS'un omurilik hasarının patogenezindeki rolü, nNOS enziminin artmış ekspresyonları veya NOS enziminin substratı olan NO'in sulu çözeltilerdeki son ürünleri (nitrit ve nitrat) üzerinden tayin edilebilir. Yapılan çalışmalarda akut omurilik hasarlı sıçanlarda omurilik bölgesinin NO miktarında ve NOS aktivitesinde bir artış olduğu, kronik hasarda ise NOS aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (17).

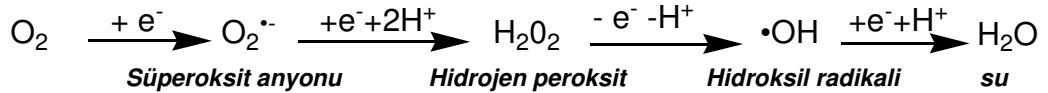
1.1.4. Antioksidan Enzimler

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, nörodejeneratif hastalıkların gelişiminde organizmadaki serbest radikallerin rolü olduğu kanıtlanmıştır. Serbest radikaller, yapısında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, nötral, pozitif veya negatif yüklü kimyasal ürünlerdir. Biyolojik sistemlerde çoğunlukla elektron transferi ile oluşurlar. Aerobik organizmaların, solunum ve oksidasyon tepkimeleri sonucu

açığa çıkan reaktif oksijen ürünlerine karşı organizmayı koruyucu etkilere sahip antioksidan sistemleri bulunmaktadır.

Serbest radikaller, vücuttaki oksijen metabolizması sonucu açığa çıkar. Moleküler oksijenin (O_2) tek elektron ile redüksiyonu sonucu süperoksit ($O_2^{\bullet-}$) radikali oluşur. Süperoksit, biyokimyasal tepkimelerde ilk oluşan ve en çok bilinen radikaldir. Bu radikalden hareketle daha toksik olan serbest radikaller sentezlenir. Süperoksit radikali bir elektron (e^-) ve $2H^+$ ile tepkimeye girerek hidrojen perokside

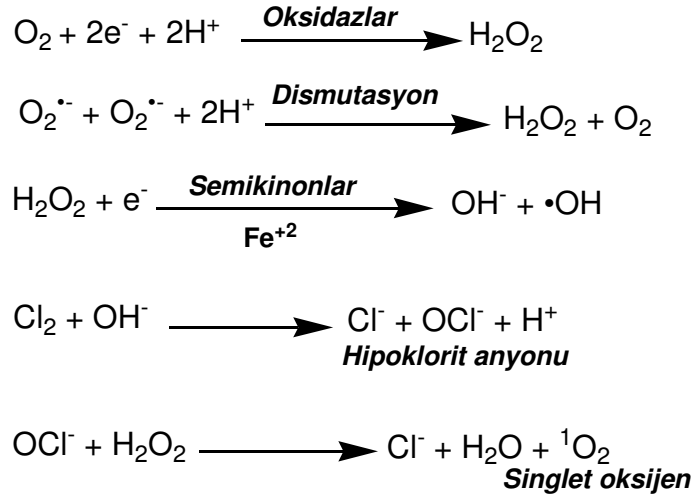
(H_2O_2) dönüşür. Bu molekül serbest radikal değildir ancak oksijen metabolizmasında önemli basamaklarda görev alır ve hidrofobik membranlardan kolayca difüze olur. H_2O_2 üzerine e^- ve H^+ alarak suya indirgenebilir (29). Şekil 11'de Biyolojik sistemlerde oksijen radikallerinin oluşum mekanizması gösterilmiştir.



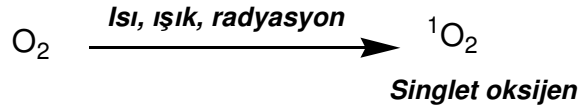
Şekil 11. Biyolojik sistemlerde oksijen radikallerinin oluşum mekanizması (29)

O_2 , oksidazların katalizörlüğünde $2e^-$ ve $2H^+$ alarak H_2O_2 'ye dönüşür. Ortamdaki iki molekül $O_2^{\bullet-}$ $2H^+$ ile dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 'ye çevrilir. H_2O_2 , Fe^{+2} ve semikinonların varlığında Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikali ($\bullet OH$) ve hidroksil anyonunu (OH^-) verir. Hidroksil radikalının biyolojik sistemlerdeki yarılanma ömrü diğer radikallere göre daha kısadır ve etkinliği en yüksek olan serbest radikaldir. Membran lipidlerindeki doymamış bağlara hidrojen ekleyerek ya da çıkararak oksidatif etki gösterir. OH^- iyonu, ortamda klorür (Cl_2) varsa hipoklorit anyonunu (OCl^-) oluşturur ve bu anyonun H_2O_2 ile reaksiyona girmesi sonucu da singlet oksijen (1O_2) meydana gelir. Kimyasal reaksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallere ek olarak O_2 ısı, ışık ve radyasyon gibi dış kaynakların etkine maruz kalarak 1O_2 radikaline dönüşmektedir (74). Şekil 12'de kimyasal redüksiyon ile Şekil

13'de ise fiziksel redüksiyon ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu gösterilmiştir.



Şekil 12. Kimyasal redüksiyon ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu (74)



Şekil 13. Fiziksel redüksiyon ile biyolojik sistemlerde serbest radikallerin oluşumu (74)

Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemindeki nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin etkinliği için gerekli olsa da organizmada üretimlerinin artması ile doku hasarı ve hücre ölümü gerçekleşir. Hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, alerji gibi birçok hastalığa neden olurlar. Reaktif oksijen moleküllerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bu mekanizmaların tamamına “**antioksidan savunma sistemleri**” denir. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılardır ve oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Hücre içinde antioksidan

savunma sisteminde görev alan enzimler; SOD, CAT ve GPx'tir. Bakır, çinko, selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (18).

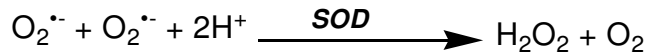
Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum “**oksidatif denge**” olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızının artması ya da antioksidan savunma sisteminin etkinliğinin azalması ile oksidatif denge bozulur ve bu durum biyolojik sistemlerde oksidatif strese neden olur (18).

Oksidatif stres, iskemik ve travmatik omurilik yaralanmalarının patolojisinde önemli role sahiptir. Nöral dokular özellikle omurilik, yapısındaki doymamış yağ asitlerinin fazlalığı nedeniyle serbest radikallerin saldırısına oldukça hassastır. Omurilik dokusunun hasarlanması ve iskemi, hücresel ve enflamatuvar reaksiyonları tetikleyerek oksidatif strese neden olur (45).

Oksidatif stresin önlenmesinde görev yapan enzimlere “**antioksidan enzimler**” denir. Bunlar SOD, CAT ve GPx'tir.

a) Süperoksit Dismutaz (SOD):

SOD, süperoksit radikalının O_2^- ve H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir. Bu reaksiyon ile açığa çıkan H_2O_2 CAT ve GPx enzimleri ile parçalanır. SOD'nin katalizlediği reaksiyon denklemi Şekil 14'te verilmiştir.



Şekil 14. SOD'nin katalizlediği reaksiyon denklemi (45)

SOD'nin, hücre içinde sitozolde bulunan bakır ve çinko iyonu içeren SOD (Cu/Zn-SOD) ile manganez iyonu taşıyan mitokondriyal SOD (Mn-SOD) olmak üzere iki izoenzimi vardır. Mn-SOD homotetramer yapısında bir enzim olup, her bir

alt ünitesinde birer tane mangan elementi taşır. Mangan, dismutasyon tepkimesi sırasında indirgenir ve reaksiyon sonunda tekrar yükseltgenir. Cu/Zn-SOD ise iki alt üniteden oluşur ve her bir alt ünitesinin aktif bölgesinde histamin amino asitine bağlı bakır veya çinko elementi bulunur. Yapılan bir çalışmada, sağlıklı sıçanlarda Mn-SOD'nin hayati önemi bulunduğu Cu/Zn-SOD'nin ise hücre metabolizmasında daha az önemli olduğu gösterilmiştir (67). SOD aktivitesi dokuların oksidasyon derecesine göre farklılık göstermektedir. En yüksek aktivitenin görüldüğü dokular arasında karaciğer, dalak, adrenal bezler, böbrek ve kalp vardır.

b) Katalaz (CAT):

CAT, ortamda bulunan H₂O₂'nin su ve O₂'ye parçalanmasını katalizleyen enzimdir. Aynı reaksiyonu katalizleyen bir diğer enzim GPx'dir. Bu iki enzimin substratlarına afiniteleri birbirinden farklıdır. Ortamda düşük konsantrasyonda H₂O₂ varsa substrata GPx bağlanırken, yüksek konsantrasyonlarda ise tepkimeye katalaz enzimi girer. CAT'ın katalizlediği reaksiyon denklemi Şekil 15'de verilmiştir.

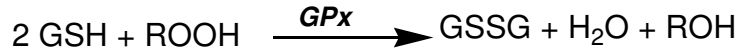
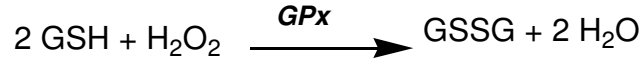


Şekil 15. CAT'ın katalizlediği reaksiyon denklemi (72)

Katalaz, tetramerik yapıda bir enzim olup, her bir alt ünitesine ferriprotoporfirin bağlıdır. SOD enzimi gibi, katalaz aktivitesi de dokularda birbirinden farklıdır. Karaciğerde, böbrekte ve eritrositlerde CAT aktivitesi yüksektir.

c) Glutatyon Peroksidaz (GPx):

GPx enzimi, dokularda oluşan H₂O₂'nin ve organik peroksitlerin suya indirgenmesini katalizler ve reaksiyona giren glutatyon, bu sırada okside glutatyona dönüşür. GPx'in katalizlediği reaksiyon denklemleri Şekil 16'da verilmiştir.

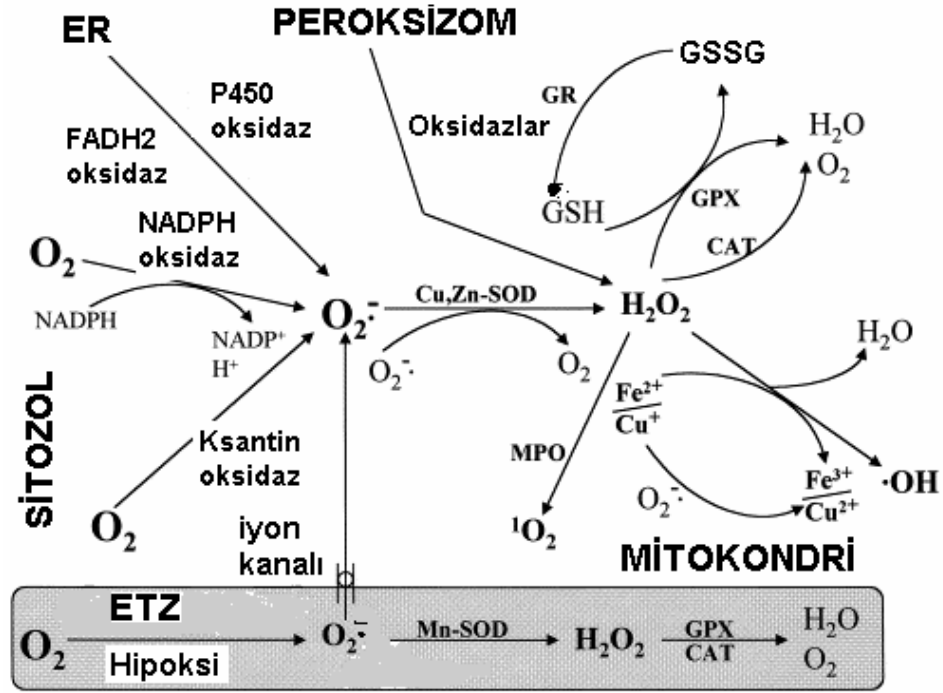


Şekil 16. GPx'in katalizlediği reaksiyon denklemleri (72)

GPx, tetramerik yapıda bir enzim olup, her bir alt ünitesi enzimin aktivitesi için gerekli olan selenosistein taşır. Memeli hücrelerinde GPx'in beş farklı izoenzimi tanımlanmıştır. Sitozolik ve mitokondriyal GPx, eritrositlerde, karaciğerde ve böbrekte daha çok bulunmaktadır. Fosfolipid hidroperoksit GPx, peroksidede olmuş membranlardaki fosfolipidleri, yağ asitlerini, kolesterolü ayrıca okside lipoproteinleri direkt olarak indirgeyen GPx enzimidir ve en çok böbrek epitelyum hücrelerinde görülür. Dördüncü izoenzim ekstraselüler GPx'tir ve dokularda az miktarda bulunur. Son izoenzim ise sıçan epididiminde tanımlanmış, selenyumdan bağımsız GPx'tir.

GPx, katalaz ile aynı substratı kullanmakla birlikte, lipid ve organik hidroperoksitler üzerinde de antioksidan etki gösterir. Biyolojik sistemlerde düşük seviyelerdeki oksidatif strese karşı koruma sağlar (100).

Şekil 17'de hücre organellerinde meydana gelen serbest oksijen radikallerine karşı çalışan antioksidan savunma sisteminin toplu bir özeti sunulmuştur.



Şekil 17. Hücrede serbest radikal oluşum mekanizmaları ve antioksidan sistemler. GR: glutasyon redüktaz; GSH: glutasyon; GSSG: okside glutasyon; ER: endoplazmik retikulum; ¹O₂: singlet oksijen; MPO: miyeloperoksidaz (72)

Yapılan çalışmalarda, omurilik hasarının sekonder mekanizmasında serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonun artışına bağlı ortaya çıkan oksidatif stresin önemli etkilerinin olduğu saptanmıştır. Travmatik omurilik hasarından sonraki haftalarda organizmayı oksidatif stresten koruyan antioksidan enzim aktivitelerinde ne gibi değişikliklerin olduğu halen araştırılmaktadır (31).

1.1.5. Plazma Total Antioksidan Kapasitesi (TAK)

Biyolojik sistemlerde, serbest radikallerin etkilerinden organizmayı koruma görevini üstlenen antioksidan sistemler vardır. Bu sistemler, enzimatik ve non-enzimatik olarak ikiye ayrılırlar. Enzimatik olanlar SOD, CAT, GPX'tir. Enzimatik olmayanlar ise organizmada metabolik faaliyetler sonucu oluşan ve beslenme ile vücuda alınan antioksidanlardır. Bu sistemler, dokularda ve kanda bulunurlar (57).

Plazmada bulunan antioksidanların konsantrasyonları ayrı ayrı tayin edilebilmektedir. Ancak zaman aldığı, pahalıya mal olduğu ve kompleks teknikler gerektirdiği için tercih edilmez. Bu nedenle plazmada total antioksidan kapasitenin tayini için yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, literatürde total antioksidan kapasite (TAK), total antioksidan aktivite (TAA), total antioksidan güç (TAOP), total antioksidan durum (TAS) tayini gibi farklı isimler kullanılarak tanımlanmalarına rağmen hepsinin amacı ve prensibi aynıdır (94).

TAK tayini ile plazmada entegre olmuş antioksidanların toplam aktivitesi bulunur. Plazmadaki her bir antioksidanın aktivitesinin hesaplanıp değerlerin toplanmasından sonra elde edilen değer ile TAK sonuçları birbirinden farklıdır. Bu yöntem ile plazmadaki bilinen ve bilinmeyen antioksidan maddelerin ve bunların sinerjik etkileşimleri sonucu ortaya çıkan antioksidan kapasite tayin edilir. Bu şekilde oksidan/antioksidan sistemler arasındaki *in vivo* denge daha kolay anlaşılmaktadır (92).

Kanda farklı antioksidan bileşikler bulunmakla birlikte en fazla aktivite gösteren yapılar proteinlerdir ve bu etkilerini serbest tiyol grupları üzerinden gösterirler. Linoleik asit de yapısında tiyol grubu taşımaktadır ancak kanda düşük konsantrasyonlarda bulunduğu için tiyol gruplarının temel kaynağı proteinlerdir. Sağlıklı bireylere ait plazma örneklerinin antioksidan kapasitesinin % 52.9'unu proteinler oluşturmaktadır (34).

C vitamini de antioksidandır ve bu etkisini serbest radikal ile reaksiyona girip okside şekline dönüşürken, reaktif oksijen molekülünü indirgeyerek gösterir. C vitamini, plazmanın antioksidan etkisinin % 4.7'sinden sorumludur. Geçmişte, safra pigmenti olan bilirubinin, katabolizma sırasında açığa çıkan toksik bir artık olduğu düşünülmüştür günümüzde ise bilirubinin organizmayı ateroskleroz, koroner arter hastalıkları ve enflamasyondan koruyan fizyolojik bir antioksidan olduğu

anlaşılmıştır. Bilirubin, plazma antioksidan kapasitesinin % 2.4'ünden sorumludur (73).

Ürik asit, plazmadaki serbest radikalleri yakalayarak etkisiz hale getiren bir antioksidandır. Plazmadaki konsantrasyonu, C ve E vitaminlerinkinden on kat daha fazla bulunmuştur. Sağlıklı bireylere ait plazma örneklerinin antioksidan kapasitesinin % 33.1'ini ürik asit oluşturmaktadır. Meyve, sebze ve çay gibi gıdalar, yapılarındaki antioksidan polifenolik bileşiklerden dolayı antioksidan özelliğe sahiptir. Bir çalışmada çayın antioksidan bileşiği olan kateşinin C vitamini, bilirubin, ürik asit ve glutatyondan daha fazla antioksidan etkisi olduğu gösterilmiştir (11). Tablo I'de Antioksidan bileşiklerin organizmadaki plazma konsantrasyonları ve TAK içerisindeki konsantrasyonlarının yüzdesi verilmiştir.

Tablo I. *Antioksidan bileşiklerin organizmadaki plazma konsantrasyonları ve TAK içerisindeki konsantrasyonlarının yüzdesi (30).*

Plazma Antioksidan Öğeleri	Plazma Konsantrasyonu (µmol/L)	TAK'daki konsantrasyon (mmol trolox eşdeğeri/L)	TAK'daki % konsantrasyon
-SH grubu	303-525	0.91	52.9
Ürik asit	150-470	0.57	33.1
C Vitamini	28-85	0.08	4.7
Total bilirubin	3-17	0.04	2.4
E Vitamini	12-45	0.03	1.7
Diğerleri	--	0.09	5.2
Toplam	--	1.72	100

TAK tayini spektrofotometrik, fluoresans, kemilüminesans yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Ancak fluoresans ve kemilüminesans teknikleri pahalı

olduğu ve her laboratuvarında gerekli aletler bulunmadığı için spektrofotometrik yöntemler tercih edilir ve çoğunlukla mavi-yeşil renkli ABTS** [2,2'-Azinobis (3- etilbenzotiyazolin-6-sülfonikası)] radikali kullanılır. Bu radikal, ABTS'nin oksidasyonu sonucu oluşur ve okside olabilen bir bileşik ile karşılaştığında indirgenerek tekrar renksiz ABTS bileşiğine dönüşür. Rengin inhibisyonundan hareketle TAK tayini yapılmaktadır. TAK tayini, biyolojik sıvılar için kullanılabileceği gibi bitki ve gıda ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde de tercih edilen bir yöntemdir (92).

1.1.6. Oksidatif DNA Hasarı ve Comet Yöntemi

Omurilik yaralanmalarının ardından organizmada reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin üretimi artmaktadır. Bu artış, antioksidan sistem tarafından dengelenemezse oksidatif strese neden olmakta ve başta DNA olmak üzere birçok biyolojik yapıda hasara yol açmaktadır.

Serbest radikaller, tamir mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda DNA'da zincir kırıkları yaparak ve pürin, pirimidin bazlarının yapısını değiştirerek, oksidatif DNA hasarına neden olur. Kırılma, DNA'nın tek zincirinde oluyorsa tamiri daha hızlı gerçekleşirken, çift zincir kırılmaları ve bazlardaki değişikliklerin tamiri daha uzun sürmektedir (46).

Travmatik beyin hasarından sonra beyin dokusunda süperoksit ve peroksinitrit radikali, omurilik hasarından sonra ise hasarlı bölgede NO ve peroksinitrit radikalinin oluşumunun arttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (99). Omurilik hasarından sonra kandaki DNA yapısının hangi ölçüde etkilendiği yani bu hasarın sistemik olup olmadığı henüz belirlenmemiştir.

Son otuz yıl içerisinde, DNA hasarını tayin etmek amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. İlk olarak 1976'da Cook, non iyonik deterjan ile derişik sodyum klorür

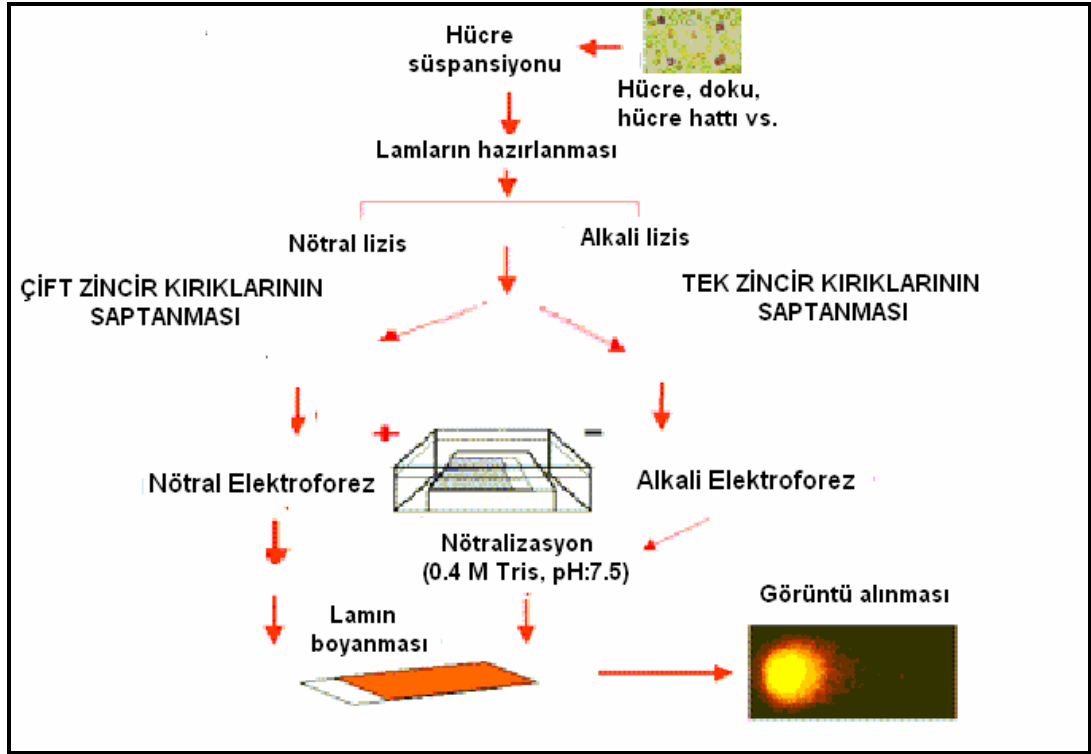
(NaCl) kullanarak hücreleri parçalamış ve böylece membran, sitoplazma, nükleoplazma ortamdan uzaklaşmış, histonlar da NaCl ile çözünerek geriye DNA, RNA ve proteinlerden oluşan bir kompleks kalmıştır. Bu ortama etidyum bromür, gümüş nitrat gibi interkalatör bir boya eklendiğinde, DNA yapısı açılarak boyayı içine almış ve renk sinyali oluşturmuştur. Sinyalden hareketle DNA hasarı tayin edilmiştir (23).

1984'te ise Johanson ve arkadaşları, comet yöntemi olarak bilinen mikrojel elektroforezi tekniğini geliştirmiştir. Bu teknikte, agaroz jel ile karıştırılmış hücreler mikroskop lamalarına alınıp deterjan ve tuzla muamele edilerek istenmeyen yapılarından kurtarılmış daha sonra pH'ın nötr olduğu ortamda elektroforez yapıp, jel fluoresan bir boya ya da gümüş boyası ile boyanarak comet (kuyruklu yıldız) benzeri görüntüler elde edilmiştir. Bu görüntülerin baş kısmında sağlam DNA bulunurken, kuyruk kısmında hasara uğramış ya da kopmuş DNA parçaları yer almaktadır. Ancak bu teknik ile yalnızca çift zincirli DNA molekülleri analiz edilebilmiştir (49).

Birkaç yıl sonra nötral comet yöntemi, Singh tarafından geliştirilerek yüksek alkali ($\text{pH} > 13$) koşullar altında yapılmıştır. Bu yöntem DNA sarmalının açılarak denatüre olmasını sağlamış, elektroforez ve görüntüleme basamaklarında tek zincir kırıkları da tayin edilebilmiştir. Alkali comet tekniği, düşük seviyelerdeki DNA zincir kırıklarını yüksek hassasiyet ile saptamaktadır (101).

Lizis ve elektroforezin yapıldığı pH'a bağlı olarak comet yönteminin tayin ettiği yapılar değişkenlik göstermektedir. Nötral comet tekniği DNA'nın çift sarmal kırıklarının tayinine olanak sağlarken, alkali comet yöntemi ise alkali ile işaretlenebilen DNA bölgelerinin ve tek zincir kırıklarının saptanmasında kullanılmaktadır. Bu nedenle, comet yönteminin uygulanacağı pH, araştırmanın amacına göre değişmektedir. Günümüzde bu teknik kullanılarak birçok hücre tipindeki çift zincir, tek zincir kırılmaları, DNA bazlarının oksidatif hasarı, DNA-DNA,

DNA-protein, DNA-ilaç etkileşimleri ile DNA onarımı tayin edilebilmektedir (101). Şekil 18'de comet tayin yönteminin basamakları sırasıyla gösterilmiştir.

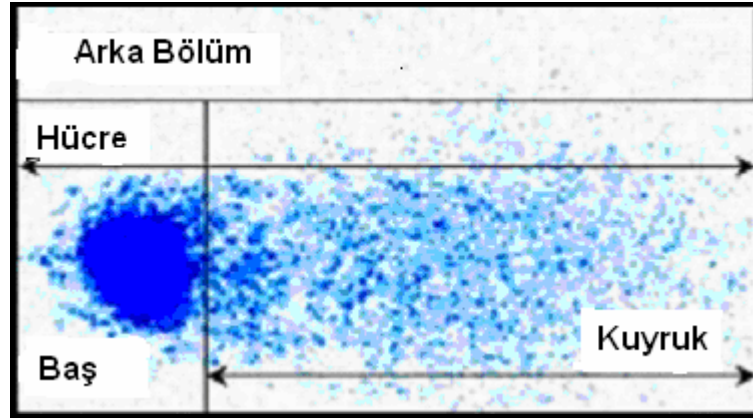


Şekil 18. Comet yöntemi uygulamasının şematik gösterimi (101)

Oksidatif DNA hasarından sonra katlanmış DNA yapısındaki zincirlerde kırılmalar meydana gelmekte ve DNA molekülünün boyu kısalmaktadır. Bu durumdaki hücreler kullanılarak comet yöntemi yapıldığında, negatif yüklü DNA kırıkları elektriksel alanda anoda doğru sürüklenerek comet yapısını oluşturmaktadırlar. Alkali koşullarda denatürasyon gerçekleştiği için alkali ile işaretlenmiş bölgeler tek zincir kırıkları olarak ifade edilmektedir. Elektroforezden sonra lamlar propidyum iyodür ya da etidyum bromür gibi fluoresan bir boya ile boyanabileceği gibi gümüş boyaması tekniği de kullanılmaktadır (22).

Comet yönteminde DNA diğer elektroforez tekniklerinde olduğu gibi fragmanlar şeklinde yol almaz. DNA göçü, zincir kırıklarının sayısının ve boyutunun bir fonksiyonu olarak gerçekleşir. Ayrıca, comet kuyruğunun uzunluğu parçaların

uzunluğuna değil hasarın boyutuna bağlıdır. DNA hasarı gerçekleştiğinde katlanmış yapı açılarak DNA'nın yapıtaşları olan parçalar çekirdek etrafına dağılır. Bu parçalar comet yönteminde elektriksel alanda sürüklenerek cometin kuyruğunu oluştururlar (5). şekil 19'da comet yapısının bölümleri verilmiştir.



şekil 19. Comet yapısının bölümleri (21)

Comet yöntemi bazı kaynaklarda tek hücre jel elektroforezi olarak da tanımlanmaktadır. Çünkü elektroforez sırasında oluşan comet görüntüsünün herbiri bir hücreye aittir ve jele ilave edilen hücre sayısı kadar comet figürü oluşmaktadır. Bu yöntem, hızlı sonuç veren, hassas ve pahalı olmayan, birçok hücre çeşidinde kullanılabilen DNA hasarı tayin tekniğidir. Ayrıca 20-40 μ l gibi küçük miktarlardakirnekler tayin için yeterli olmaktadır. Bu teknik, genetik toksikolojide, ekotoksikolojide, hastalıkların epidemiyolojisinin tayininde, DNA hasarının ve onarımının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (21).

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Aletler

- Golden Phoenix sıvı azot tankı, Model YDS-6
- Braun Potter S homojenizatör, Model 853302/4
- Nuvemix otomatik karıştırıcı, Model NM 110
- Grant Bio PHMT ısı ayarlı karıştırıcı (Thermo-Shaker), Model 891336/EEC
- Sartorius hassas terazi, Model 2442
- Whatman Biometra yatay jel elektroforez tankı, Model 2025
- Whatman Biometra elektroforez güç kaynağı, Model PS-304
- Labnet, Spectrafuge Mikrosantrifüj, Model 24D
- Nüve manyetik karıştırıcı, Model MK 318
- Uğur derin dondurucu (-20°C), Model 95-1
- Sanyo ultra low derin dondurucu (-80°C), Model 85
- Molecular Devices-Versamax spektrofotometrik mikrolaka okuyucusu,

Model BN 03252

- Shimadzu dijital spektrofotometre, Model V-1601
- Nüve soğutuculu ultrasantrifüj, Model NF 800R
- Nüve su banyosu, Model BM 302
- Inolab pH metre, Model 0327
- Olympus trinoküler ışık mikroskobu, Model CX31-32C02

- Motic MC görüntüleyici (camera webcam), Model 650936
- Değişik hacimlerde otomatik pipetler, Brand Transperfette
- Tıbbi pens, bistüri ve makas

2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- **Sodyum laurilsarkosinat:** Clariant (Almanya)
- **Agaroz Low EEO ve Agaroz Low Melt 3:** Applichem Biochemical Synthesis Services (Almanya)
- **Amonyum nitrat:** Merck (Almanya)
- **Gümüş nitrat:** UPARC (ABD)
- **Tungstosilisik asit:** Sigma (ABD)
- **Tungstofosforik asit:** Merck (Almanya)
- **Trikloroasetik asit (TCA):** Merck (Almanya)
- **Çinkosülfat heptahidrat:** Merck (Almanya)
- **Dimetil sülfoksit (DMSO):** Panreac Quimica (Avusturya)
- **RPMI 1640 Medium:** Biochorm (Almanya)
- **Fetal bovine serum:** Biochorm (Almanya)
- **Sodyum klorür (NaCl):** Baker Analyzed (Hollanda)
- **Etilendiamintetraasetikasit disodyum tuzu dihidrat (EDTA):** Riedel-de Haen (Almanya)
- **Sodyum hidroksit (NaOH):** Merck (Almanya)
- **Tris(hidroksimetil)aminometan (Tris):** Merck (Almanya)
- **Glasiyel asetik asit:** Merck (Almanya)
- **Triton X100:** Merck (Almanya)
- **Derişik hidroklorik asit (HCl):** Merck (Almanya)
- **Gliserol:** Merck (Almanya)

- **Formaldehid:** Merck (Almanya)
- **2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonikasit)diamonyum tuzu**

(ABTS): Sigma-Aldrich (Avusturya)

- **Potasyum persülfat:** Merck (Almanya)
- **Dipotasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4):** Merck (Almanya)
- **Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4):** Merck (Almanya)
- **Disodyum monohidrojen fosfat heptahidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$):** Merck

(Almanya)

- **Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$):** Merck (Almanya)
- **Potasyum klorür (KCl):** Merck (Almanya)
- **6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit (Trolox):**

Sigma-Aldrich (Avusturya)

- **Hidrojen peroksit (H_2O_2):** Baker Grade (Hollanda)
- **Disodyum monohidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$):** Merck

(Almanya)

- **Kollajenaz I:** Worthington Biochemicals (İngiltere)
- **Dispaz II:** Boehringer Mannheim (Almanya)
- **Hanks tuz tamponu (Hanks Balanced Salt Solution: HBSS):** Sigma-

Aldrich (ABD)

- **NOS Kiti (Kat. No: 22113):** Ölçüm tamponu, nitrat redüktaz, kofaktör hazırlama çözeltisi, nitrat standartı, laktat dehidrojenaz, NADPH tetrasodyum tuzu, Griess Ayracı 1, Griess Ayracı 2, Mikroplaka; Oxis (ABD)

- **Non-enzimatik NO Kiti (Kat. No: 22111):** Granüle kadmiyum, çinko sülfat çözeltisi, mikrosantrifüj tüpleri, Greiss ayracı 1, Griess ayracı 2, nitrit standartı, mikroplaka, 0.1 M HCl, 0.1 M NH_4OH ; Oxis (ABD)

- **GPx Kiti (Ransel Kat. No: RS505):** Ölçüm tamponu, dilüe edici ajan, kümen hidrojen peroksit, belirteç; Randox (İngiltere)

- **SOD Kiti (Ransod Kat. No: Sd125):** Karıştırılmış substrat, ölçüm tamponu, dilüe edici ajan, ksantin oksidaz, standart; Randox (İngiltere)
- **Sığır serum albümini (BSA):** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- **Sodyum karbonat anhidr (Na_2CO_3):** Merck (Almanya)
- **Sodyum potasyum tartarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$):** Merck (Almanya)
- **Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$):** Merck (Almanya)
- **Folin-Ciocalteu reaktifi:** Sigma-Aldrich (Wien, Avusturya)
- **Bidistile su:** Ebiltem (İzmir)
- **HPLC saflığında su:** Ebiltem (İzmir)

2.3. Kullanılan Çözeltiler

2.3.1. Comet Yönteminde Kullanılacak Tam Kan Örneklerini Saklama Çözeltisi (Flash-Freezing Solution)

0.180 g NaCl tartıldı, 1.360 ml DMSO ilave edilip karıştırıldı. Önceden soğutulmuş RPMI 1640 ile 10 ml'ye tamamlanarak 4°C'de saklandı.

2.3.2. Omurilik NOS ve Antioksidan Enzim Aktiviteleri ile NO Tayininde Kullanılan Homojenizasyon Çözeltisi

NaCl içeren 0.01 M izotonik fosfat tamponu (pH=7.4): 9 g NaCl, 2.575 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.274 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak stok çözelti hazırlandı. Kullanılacağı zaman stok çözülden yaklaşık 9 ml alınıp distile su ilavesi ile pH-metre altında 7.4'e ayarlandı. Kullanmadan önce 4°C'de saklandı.

2.3.3. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1) **Stok sığır serum albümin (BSA) standartı (1 mg/ml):** 10 mg BSA tartıldı, distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Protein standart çözeltileri 10-75 µg/ml'lik konsantrasyonlarında olacak şekilde gerekli dilüsyonlar distile su ile yapıldı.

2) **%2 Na₂CO₃ çözeltisi (0.1 N NaOH içinde):** 2 g Na₂CO₃ tartılıp 0.1 N NaOH ile 100 ml'ye tamamlandı.

3) **%2'lik Na-K tartarat çözeltisi:** 2 g Na-K tartarat tartılıp, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

4) **%1 CuSO₄.5H₂O çözeltisi:** 1 g CuSO₄.5H₂O tartılarak, distile suyla 100 ml'ye tamamlandı.

5) **Protein renk reaktifi:** 100 ml %2'lik Na₂CO₃ çözeltisine 1 ml %2'lik Na-K tartarat ve 1 ml %1'lik CuSO₄.5H₂O çözeltileri eklenerek deney günü taze olarak hazırlandı.

6) **Folin-Ciocalteu çözeltisi:** Kullanılacağı zaman 1:1 oranında distile su ile seyreltilerek kullanıldı.

2.3.4. NO Kitine Ait Çözeltiler

Tüm çözeltiler kit içerisinde hazır bulunmaktadır.

1) **Granüler kadmiyum:** 25 g kadmiyum taneleri.

2) **ZnSO₄ çözeltisi:** 2 ml %30'luk (a/h) ZnSO₄ çözeltisi.

3) **Griess ayracı (1):** 3N HCl içinde çözüldürülmüş 7 ml sülfanilamid (p-aminobenzen sülfonamid).

4) **Griess ayracı (2):** Deiyonize suda çözüldürülmüş 7 ml N-(1-Naftil)-etilendiamin dihidroklorit.

5) **Nitrit standardı:** 1.5 ml 500 μ M NaNO₂.

6) **Kadmiyum yıkama çözeltileri:** 125 ml 0.1 M HCl ve 125 ml 0.1 M NH₄OH.

2.3.5. NOS Kitine Ait Çözeltiler

1) **Deney tamponu:** Deney tamponu şişesinin içeriği, HPLC saflığında su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu tampon örneklerin dilüsyonu için kullanıldı.

2) **Nitrat redüktaz:** Şişe içeriği 1.2 ml deney tamponunda çözündürüldü. Kullanım sırasında buzda bekletildi ve -20°C'de saklandı.

3) **Kofaktör hazırlama çözeltisi:** Şişe içeriği 1.2 ml deney tamponunda çözündürüldü. Kullanım sırasında buzda bekletilerek çalışıldı ve -20°C'de saklandı.

4) **Nitrat standartı:** Şişe içeriği 1 ml deney tamponunda karıştırmak suretiyle çözündürüldü. 2 ile 8°C'de saklandı, donması engellendi.

5) **Laktat dehidrogenaz:** Şişe içeriği 1.2 ml deney tamponunda çözündürüldü. Kullanım sırasında buzda bekletilerek çalışıldı. -20°C'de saklandı.

6) **Greiss ayracı (1) ve (2):** Şişe içerikleri kullanıma hazır haldeydi.

7) **1 mM NADPH tetra sodyum tuzu:** 8.33 mg NADPH tetrasodyum tuzu tartıldı. Deney tamponu ile 10 ml'ye tamamlandı. Deney günü taze hazırlandı.

2.3.6. SOD Kit Çözeltileri

1) **Deney tamponu:** Kullanıma hazırdır.

2) **Karıştırılmış substrat:** 0.05 mmol/L ksantin ve 0.025 mmol/L INT [2-(4-iyodofenil)-3-(3-nitrofenol)-5-feniltetrazolyum klorit] karışımından ibarettir. Bu karışım 20 ml deney tamponu ile karıştırıldı.

3) **Ksantin oksidaz:** Her şişe içinde bulunan 80 Ü/L ksantin oksidaz 10 ml bidistile su ile karıştırılarak kullanıldı.

4) Dilüe edici ajan: Şişe içeriği 200 ml bidistile suda çözüldürüldü.

5) Standartlar: 49 Ünite SOD içeren standart SOD şişesi, 10 ml bidistile su ile karıştırıldığında elde edilen konsantrasyon 4.9 Ü/ml'dir (stok standart). Bu stokdan hareketle gerekli seyreltmeler dilüe edici ajanla yapılarak sırasıyla 2.450, 1.225, 0.612 ve 0.204 Ü/ml konsantrasyonlarında SOD standart çözeltileri hazırlanmıştır.

2.3.7. CAT Aktivite Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1) Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.0):

A: 0.681 g KH_2PO_4 tartıldı. 100 ml'ye distile su ile çözüldürülerek tamamlandı.

B: 1.789 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ tartıldı. 100 ml'ye distile su ile çözüldürülerek tamamlandı.

A çözeltisi üzerine B çözeltisi pH-metre altında azar azar ilave edilerek pH 7.0'e ayarlandı.

2) 30 mM Hidrojen peroksit çözeltisi: % 30'luk H_2O_2 'den 340 µl alındı. 50 mM fosfat tamponu (pH: 7.0) ile 100 ml'ye tamamlandı.

2.3.8. GPx Kit Çözeltileri

1) Deney tamponu (4.3 mM/L EDTA içeren 0.05 M/L fosfat tamponu) (pH: 7.2): Kullanıma hazırdır. 2 ile 8°C'de çalışma süresince saklandı.

2) Belirteç: 4 mM/L glutatyon, 0.5 Ü/L glutatyon redüktaz ve 0.34 mM/L NADPH karışımı 10 ml çalışma tamponu ile karıştırıldı ve 37°C'de 5 dk. inkübe edildi.

3) 0.18 mM/L H₂O₂ Hazırlanması: Kümen H₂O₂'den 10 µl alınarak renkli küçük bir şişede 10 ml deiyonize su ile manyetik karıştırıcıda devamlı çalkalanmak suretiyle çözündürüldü. Çalışma günü taze hazırlandı.

4) Dilüe edici ajan: Şişe içeriği 200 ml deiyonize suda çözündürüldü.

2.3.9. TAK Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1) 7 mM stok ABTS^{••} radikal çözeltisi: 38.407 mg ABTS tartıldı ve 6.620 mg potasyum persülfat ile karıştırıldı. Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti, 30°C'de ve karanlıkta 12-16 saat etüvde bekletildi. Böylece ABTS[•] radikali oluşturuldu. Bu radikalin iki gün süreyle stabil olduğu bildirilmiştir (92).

2) 5 mM Fosfat tamponu (pH: 7.4): 0.340 g KH₂PO₄ ve 0.435 g K₂HPO₄ tartıldı. Her biri distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. İki çözelti eşit oranda karıştırıldı HCl veya NaOH çözeltileri kullanılarak pH 7.4 e ayarlandı.

3) Standart trolox çözeltisi: 50 mM trolox çözeltisi hazırlamak için 1.251 g trolox tartıldı ve 5 mM fosfat tamponu kullanılarak 100 ml'ye tamamlandı. 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15 mM'lık standartlar için gerekli seyreltmeler 5 mM fosfat tamponu ile yapıldı.

2.3.10. Oksidatif DNA Hasarı Tayininde (Comet Yöntemi) Kullanılan Çözeltiler

1) Stok çözeltiler:

a) 0.2 M EDTA: 37.224 g EDTA tartılıp bir miktar distile suda karıştırılarak çözündürüldü. Daha sonra 500 ml'ye distile su ile tamamlandı.

b) 10 M NaOH: 100 g NaOH tartılıp 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

c) 4 M Tris: 48,456 g tris tartılarak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

d) 140 mM Fosfat tamponu (pH: 7.4):

a. 0.2 g KH_2PO_4 , 8 g NaCl ve 0.2 g KCl tartılıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

b. 4.075 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ tartılıp, distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

a çözeltisi üzerine b çözeltisi azar azar ilave edilerek, pH-metre altında pH'ı 7.4'e ayarlandı.

e) Stok lizis çözeltisi: 37.24 g EDTA, 146.1 g NaCl ve 4 M'lık Tris çözeltisinden 2.5 ml alınarak bir behere konuldu. Üzerine 700 ml distile su ilave edilerek, karıştırıcıda çözüldürüldü. Çözeltinin son hacmi 1 L olacak şekilde 10 M NaOH ve derişik HCl kullanılarak pH-metrede pH 10'a ayarlandı.

2) Lizis çözeltisi: 10 ml DMSO, 1 ml Triton X100, 934 µl sodyum laurilsarkosinat, stok lizis çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı. Kullanmadan önce en az 30 dk. 4°C'de soğutuldu.

3) Nötralizasyon tamponu (pH: 7.5): 100 ml 4 M'lık stok tris çözeltisinin pH'ı 7.5 olacak şekilde derişik HCl ile ayarlandı. Distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

4) Elektroforez tamponu (pH: 13.1): 10 M NaOH stoğundan 60 ml ve 0.2 M'lık EDTA stoğundan 10 ml alındı. Bu çözeltiler karıştırılıp 2 L'ye distile su ile tamamlandı. 10 M'lık NaOH ile pH: 13.1' e ayarlandı. Kullanıncaya kadar bu tampon buzdolabında saklandı. Çalışmalarımızda aynı tampon en fazla iki kez kullanıldı.

5) Agaroz jellerin hazırlanması:

a) % 1.5 NMP (Normal Melting Point: Normal erime derecesine sahip) agaroz: 375 mg NMP tartılıp, 25 ml 140 mM fosfat tamponunda ısıtılarak tamamen çözüldürüldü.

b) % 0.5 LMP (Low Melting Point: Düşük erime derecesine sahip) agaroz: 25 mg LMP tartılarak, 5 ml 140 mM fosfat tamponu içinde ısıtılarak tamamen çözüldürüldü.

6) Gümüş Boyama (Silver Staining) Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

a) Fiksasyon çözeltisi: 150 g TCA, 50 g ZnSO₄ ve 50 g gliserol karıştırılarak, distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

b) Boya çözeltisi A (%5 Na₂CO₃): 12.5 g Na₂CO₃ 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

c) Boya çözeltisi B: 100 mg gümüş nitrat ve 100 mg amonyum nitrat tartıldı, bir miktar distile suda çözündürüldü. Daha sonra sıra ile 500 mg tungustosilisilik asit, 250 µl % 37' lik formaldehid ilave edilip 500 ml'ye distile su ile tamamlandı.

d) Çalışma boya çözeltisi: Boya çözeltisi B'den 68 ml ve boya çözeltisi A'dan 32 ml ile alınarak karıştırıldı. Deney günü taze olarak hazırlandı.

e) Durdurma çözeltisi: % 1'lik asetik asit çözeltisidir. 10 ml glasiyel asetik asit 1000 ml distile suda çözündürülerek hazırlandı.

2.4. Deney Protokolü

2.4.1. Embriyonik Nöral Kök Hücrelerin (ENKH) Hazırlanması (64)

13.5 günlük sağlıklı sıçan embriyosunun uzunluğu ortalama 8.5-9 mm'dir. Bu standarda uyan embriyo, anne sıçan rahminden alındıktan sonra, omuriliği çıkarıldı. Dikkatli bir şekilde üzerinde bulunan zarları temizlendi (özellikle lumbar bölge bu dönemde yapışkan karaktere sahip olduğu için, zarların tamamının ayrılmasına dikkat edildi). Daha sonra, temizlenmiş omurilik buz üzerinde bekleyen, santrifüj tüplerindeki DMEM/F12 solüsyonu içine aktarılarak yıkama yapıldı. Omurilik üzerinden tam olarak temizlenemeyen yapışkan kısımları ve zarları ayırmak için, ayrıca 8 dk. oda sıcaklığında kollajenaz/dispaz solüsyonunda bekletildi. Kollajenaz/dispaz ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra, tekrar DMEM12/F12 ile yıkama yapıldı.

Temizlenmiş ve istenmeyen dokulardan arındırılmış omurilik parçaları temiz ve buz üzerinde bekleyen santrifüj tüplerindeki DMEM/F12 ortamına tekrar aktarıldı. Takiben, 1000xg'de 5 dk. santrifüj edildi. Çözelti uzaklaştırıldı ve omurilik üzerine 1 ml % 0.05'lik tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek, 37°C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, 1000 µl'lik steril pipet 800 µl'ye ayarlanarak, dokuların birbirinden ayrıştığını çıplak gözle görene kadar, doku topakları nazikçe pipete alınıp, geri bırakıldı. Tripsinin etkisini ortadan kaldırmak için, 10 ml nöral öncü hücreler (NRP: Neural Restricted Precursors) için hazırlanan kültür ortamı ile karıştırıldı. Oluşan hücre süspansiyonu 40 µl'lik filtreden süzüldü. Filtre üzerindeki hücreler tekrar 10 ml NRP için hazırlanan kültür ortamı ile yıkanarak bir tüpe toplandı. Elde edilen hücre süspansiyonu 1000xg'de 5 dakika santrifüj edilerek tripsin ortamdan uzaklaştırıldı. Süpernatant nazikçe alınarak, 1 ml NRP için hazırlanan kültür ortamında ikinci kez süspand edildi.

Hücre süspansiyonunun 10 µl'si, 10 µl tripan mavisi ile dilüe edilerek hemositometrede hücre sayımı yapıldı. Hücreler laminin ile kaplanmış ve içinde NRP için hazırlanan kültür ortamı bulunan kaplara 3 milyon hücre olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine 10 ng/ml bFGF ve 20 ng/ml NT3 ilavesi yapıldı. 37°C'de % 5 CO₂ ve % 95 O₂ karışımı veren etüvde gelişimleri tamamlanana kadar (takriben 8-9 gün) bekletildi. İki günde bir kültür ortamının üst sıvıları değiştirildi. Böylece nöral ve glial öncü hücreler elde edildi.

2.4.2. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Gruplandırılması

Deneyde 250-270 g ağırlığında 30 adet Sprague-Dawley erişkin dişi sıçan kullanıldı. Deney hayvanları çalışma süresince 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde, iyi havalandırılan ve uygun nem koşullarına sahip, oda sıcaklığının

20-25°C olduğu odalarda bekletildi. Sıçanlar altı gruba ayrıldı ve her grupta 5 hayvan kullanıldı.

Çalışma grupları aşağıda anlatıldığı gibi oluşturulmuştur:

Grup 1: Akut omurilik hasarı uygulanan gruptur. Omurilik hasarından sonra sıçanlar oda koşullarında 7 gün yaşatıldı. 7. günün sonunda hayvanlara anestezi uygulanıp kan ve doku örnekleri toplandı.

Grup 2: Akut omurilik hasarından sonra ENKH ile tedavi edilen gruptur. Hasarın 9. gününde ikinci bir operasyon ile hayvanlara ENKH tranplantasyonunun ardından 7. günün sonunda biyolojik materyal toplandı.

Grup 3: Kronik omurilik hasarı uygulanan gruptur, hasardan sonra sıçanlar oda koşullarında 28 gün yaşatılmış ve daha sonra anestezi altında kan ve doku örnekleri toplanmıştır.

Grup 4: Kronik omurilik hasarından sonra ENKH ile tedavi edilen gruptur. Bu gruptaki sıçanlarda hasar oluşturulduktan sonraki 9. günde ENKH nakli yapıldı. Naklin ardından 28. günün sonunda hayvanlara anestezi uygulandıktan sonra kan ve doku örnekleri alındı.

Grup 5: Grup 1 ve 2 için oluşturulan akut kontrol (sham) grubudur. Bu gruptaki deney hayvanlarının T8-9 omurilik bölgesi hasar oluşturulmadan ameliyatla açıldı, tekrar kapatılarak 7 gün yaşatıldılar. 7. günün sonunda yine kan ve doku örnekleri toplandı.

Grup 6: Grup 3 ve 4 için oluşturulan kronik kontrol (sham) grubudur. Deney hayvanlarının omuriliğinin T8-9 bölgesi hasar oluşturulmadan ameliyatla açıldı ve tekrar kapatılarak 28 gün yaşatıldılar. 28. günün sonunda hayvanlara anestezi uygulanıp gerekli biyolojik materyal alındı.

2.4.3. Sıçanlara Omurilik Hasarı Uygulanması

Sıçanlara 50 mg/kg ketamin ile 5 mg/kg ksilazin karışımı intraperitoneal (i.p.) verilmek suretiyle, anestezi uygulandı. El ile kontrol edilip, en alttaki kaburga ve omur belirlenerek, sırt bölgesinde 2 cm'lik bir kesi oluşturuldu ve omur bölgesi açıldı. T8-9 (torakal 8. ve 9. omurları arası) omurlarına yapılan laminektomiyi takiben, makas ile omuriliği tek taraflı kısmi kesip çıkartmak suretiyle (unilateral partial hemisection yöntemi) lezyon oluşturuldu. Operasyon için açılan paraspinal kaslar orta hatta tekrar birleştirilip derideki kesi 4-0 yara katgütü ile kapatıldı. Vücut sıcaklığı operasyon sırasında ve sonraki 24 saat içinde 37°C'de tutuldu. Sonraki 7 gün boyunca sıçanlara proflaktik amaçlı 150 mg/kg dozunda intramüsküler (i.m.) ampicillin uygulandı.

2.4.4. ENKH'lerin Hasarlı Omurilik Dokusuna Transplantasyonu

Omurilik hasarı uygulanan sıçanlar ikinci kez uyutularak T8-9 omurları açıldı ve daha önce hasarlanmış omurilik ortaya çıkarıldı. Destek elemanına (sünger kollajen) ENKH'ler 1.000.000 hücre olacak şekilde emdirilerek omurilik bölgesine nakledilip dokular sırasıyla kapatıldı.

2.4.5. Operasyon Sonrası Hayvan Bakımı

Opere edilen sıçanlar, kuru zeminli ayrı kafeslerde tutuldu. Sıçanların yatış pozisyonları ilk hafta günde iki defa değiştirildi. İlk iki hafta içinde ise omurilik hasarının yan etkisi olan mesane disfonksiyonu nedeni ile mesanelerine masaj uygulanarak 8 saatte bir idrarları boşaltıldı. Bu işlem sonraki haftalarda günde iki defa uygulandı.

Tüm deney hayvanlarına transplantasyondan 3 gün önce başlayıp, operasyondan sonraki iki hafta boyunca immünosupresif ajan olarak subkutan (s.c.) uygulama ile siklosporin A (SsA) enjeksiyonluk çözeltisi (Sandimmune; Novartis) 1mg/100g/24saat dozlarında verildi. Bu uygulamadan sonra, örnek toplama aşamasına kadar oral SsA çözeltisi (50µg/ml) hayvanların içme suyuna konuldu.

2.4.6. Çalışma Materyalinin Toplanması

Tüm deney gruplarındaki sıçanlara anestezi uygulandıktan [ketamine (50 mg/kg) + xylazine (5mg/kg)] sonra, ön ve arka ayakları sabitlenecek şekilde masaya sırt üstü yatırıldı. Hayvanın toraks bölgesi cerrahi makas ve pens yardımı ile kesilerek açıldı ve önce kan örnekleri daha sonra sırt bölgesi açılarak omurilik doku örnekleri toplandı.

Kan örneklerinin eldesi: Halen atmakta olan kalpten kan enjektörle alındı (direkt kalp ponksiyonu ile kan alma şekli). Örnekler (ortalama 5 ml) comet yöntemi ve TAK tayinleri için farklı yerlerde stoklandı.

Comet yöntemi için, önceden hazırlanıp kryoviale konmuş 100 µl flash-freezing çözeltisi üzerine 100 µl kan örneği konup alt üst edildi ve sıvı azot tankına konup, hızla donduruldu. Bu işlem DNA bütünlüğünün optimum düzeyde kalması için gerekli bir basamaktır (42). Daha sonra kan örnekleri comet yönteminin uygulanacağı güne kadar -80°C'de saklandı.

TAK tayini için, geri kalan kan heparinize tüplere alındı ve birkaç kez alt üst edilerek, pıhtılaşması engellendi. Daha sonra 3000xg'de 10 dk. santrifüj edilerek, plazmaları elde edildi ve otomatik pipet yardımı ile ependorflar içine alınarak, kullanılacağı güne kadar -80°C'de saklandı.

Omurilik hasarlı bölgesinin eldesi: Sıçanların omuriliği tamamen çıkarıldıktan sonra lezyon odağından 1'er cm uzaklıktaki üst (caudal) ve alt (rostral)

bölgeleri ayrılıp, toplam lezyon bölgesi 2 cm olacak şekilde kesilerek toplandı. Çalışmalarda lezyon bölgesi kullanıldı.

2.5. Omurilik Hasarlı Bölge Dokusunun Homojenizasyonu

Operasyon sonucu ayrılan omuriliklerin hasarlı bölgeleri tartılıp 1.5 ml'lik ependorfa alındı. Üzerine tartılan dokunun mg miktarınının 10 katı kadar µl olacak şekilde NaCl içeren 0.01 M izotonik fosfat tamponu (pH=7.4) eklendi. Buz üzerine alınan ependorftaki doku kalın uçlu (çapı: 0.80 mm, iğne uzunluğu: 38 mm) enjektörle küçük parçalara ayrıldı. Şiddetli bir şekilde manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. İnce uçlu enjektörle (çapı: 0.45 mm, iğne uzunluğu: 13 mm) 15 dk. süreyle enjektör içine alınarak hızla bırakıldı. Daha sonra cam uçlu homojenizatörde buz ile soğutma altında 5 dk. 1200 rpm'de homojenize edildi. Homojenatlar 17000xg'de 20 dk. süreyle +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde otomatik pipetle alınarak, kuru ve temiz bir ependorfa aktarıldı. Gerekli seyreltmelerden sonra NO miktar tayini ile SOD, CAT, GPx, NOS aktivite tayinleri yapıldı.

2.6. Kullanılan Yöntemler

2.6.1. Protein Miktar Tayini

Protein miktar tayini Lowry yöntemine göre yapılmıştır (69). Bu yöntem, proteinlerin alkali ortamda bakır iyonları ile biüre tepkimesi vermesi esasına dayanır. Peptid bağları alkali ortamda bakır tuzları ile mor renkli kompleks oluşturur. Aynı zamanda protein yapısındaki tirozin ve triptofan amino asitleri fosfomolibdat-fosfotungstat çözeltisi (Folin-Ciocalteu) ile indirgenir.

Sığır serum albüminin (BSA) ana stok standardı (1 mg/ml) olarak hazırlanmış çözeltilerden 0.2 ml ve 0.4 ml alınıp, 10 ml'ye tamamlamak suretiyle elde edilen 20 µg/ml ve 40 µg/ml BSA içeren çözeltilerden 0.4'er ml alınarak standart tüplerine kondu.

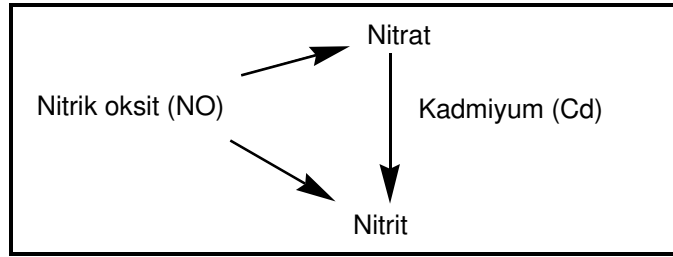
Omurilik hasarlı bölge dokusunun protein tayini için homojenatlar 100 kat seyreltilip elde edilen örneklerden 0.4 ml alınarak numune tüplerine kondu. Her tüpe 2 ml protein renk reaktifi eklendi. Tüpler 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışıma 1:1 oranında distile su ile seyreltilmiş Folin-Ciocalteu çözeltilisinden 0.2 ml kondu ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 750 nm'de köre karşı spektrofotometrede okundu. Kör tüpleri ise örnek yerine distile su konarak hazırlandı ve örnekler ile aynı işleme tabi tutuldu. Omurilik hasarlı bölge dokusu protein miktarları, konsantrasyonu bilinen BSA çözeltileriyle oluşturulan standart eğri yardımıyla hesaplandı.

2.6.2. Protein Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

BSA'nın belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Bunun için 10 mg BSA tartılarak distile su ile 10 ml'ye tamamlandı ve böylece ana stok BSA standardı (1 mg/ml) hazırlandı. Bu stok çözeltilerden alınan belirli hacimler, distile su ile seyreltilerek ml'de 10, 20, 30, 40, 50, 75 ve 100 µg BSA bulunduran standart çalışma çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerden 0.4'er ml alınarak 2.6.1'deki işlemlere tabi tutulduktan sonra spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda protein konsantrasyonlarının karşılık geldiği absorbanslar köre karşı okunup standart eğri çizildi. Her deney günü, iki ya da üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbansı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

2.6.3. Non-enzimatik NO Miktar Tayini

Omurilik hasarlı bölge dokusunda NO miktar tayini, biyolojik örneklerde üretilen NO'nun son ürünü olan nitrit üzerinden Greiss ayracı kullanılarak, kolorimetrik bir yöntemle yapılmıştır (39). Nitrik oksit, sulu çözeltilerde hızla nitrit ve nitrate dönüşür. Nitrat, Greiss ayracı ile reaksiyon vermediği için, granüler kadmiyum (Cd) ile kimyasal redüksiyona uğratarak nitrite indirgenir. Ortamdaki toplam nitrit, Greiss reaksiyonunu takiben spektrofotometrik olarak tayin edilir. Deneyde kullanılan $ZnSO_4$ çözeltisi, biyolojik örneklerdeki proteinleri çöktürür ve çökeleğin ortamdaki uzaklaştırılması ile ölçümlerin daha sağlıklı alınmasını sağlar. Şekil 20'de NO'nun nitrit ve nitrate dönüşümü şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 20. NO'nun nitrit ve nitrate dönüşümü (39)

Asidik çözeltilerde, nitrit nitroz aside dönüşür. Oluşan nitroz asit ile sülfanilamid arasında diazonyum tepkimesi gerçekleşir ve sülfanilamid diazonyum tuzu, N-(1-Naftil)-etilendiamin ile reaksiyona girerek kırmızı bir bileşik oluşturur ve 540 nm dalga boyunda absorbans ölçülür. Nitrat ise sülfanilamid ile diazotizasyona uğramadığı için öncelikle nitrite indirgenmeli daha sonra Griess reaksiyonuna sokulmalıdır. Bu yöntem ile 1 μM gibi düşük miktarlarda nitrit içeren 10-100 μl hacimlerinde örnekler kullanılarak, nitrit tayini yapılabilmektedir.

Omurilik hasarlı bölge dokusu stok homojenatlarından, mikrosantrifüj tüplerine 50 μl alınıp 190 μl 'ye bidistile su ile tamamlandı. Üzerine 10 μl % 30'luk

(a/h) $ZnSO_4$ çözeltisi eklenerek manyetik karıştırıcıda karıştırılıp oda sıcaklığında 15 dk. inkübe edildikten sonra 1500xg'de 5 dk. santrifüj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe aktarıldı. Böylece örneklerin protein içeriği ortamdaki uzaklaştırıldı. Aynı bir mikrosantrifüj tüpüne her örnek için 0.5 g Cd granülleri kondu ve bu granüller 2'şer kez sırayla 1 ml H_2O , 1 ml 0.1 M HCl, 1 ml 0.1 M NH_4OH ile yıkandı. Yıkamış Cd granülleri üzerine süpernatantlar, otomatik pipet aracılığıyla aktarıldı. Tüpler sıcaklık ayarlı karıştırıcıya yerleştirilip 25°C'de 700xg'de 17.5 saat boyunca inkübasyona bırakıldıktan sonra 1500xg'de 5 dk. santrifüj edildi ve çözelti kısmı alındı. Bu çözeltiden 80 µl alınıp mikrolaka kuyucuklarına uygulandı ve 100 µl'ye bidistile su ile tamamlandı. Her örnek iki kez çalışıldı. Örneklerin bulunduğu kuyucuklara sırasıyla 50'şer µl Greiss ayracı 1 ve 2 ilave edilip mikrolaka okuyucuda 540 nm dalga boyundaki absorbans köre karşı ölçüldü. Kör olarak hiçbir işleme tabi tutulmamış 200 µl bidistile su kullanıldı. Aynı örneği içeren kuyucuk çiftlerindeki absorbansın ortalaması alınıp standart eğride karşılık geldiği NO konsantrasyonu belirlendi. Sonuçlar, seyreltme faktörü ile çarpıldıktan sonra µM/mg protein olarak verildi.

2.6.4. Non-enzimatik NO Miktar Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Kit içinde hazır halde bulunan 500 µM nitrit standardından hareketle gerekli seyreltmeler bidistile su ile yapılarak 0.25, 0.5, 2.5, 5, 12.5, 25, 50 µM'lık standart çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltilerin her biri, yıkamış Cd granülleri içeren mikrosantrifüj tüplerine alındı ve sıcaklık ayarlı karıştırıcıya yerleştirilip 25°C'de 700xg'de 17.5 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben 1500xg'de 5 dk. santrifüj edildi ve çözelti kısmından 100'er µl alınıp iki ayrı mikrolaka kuyucuğuna uygulandı. Daha sonra kuyucuklara sırasıyla 50'şer µl Greiss ayracı 1

ve 2 ilave edilip mikroplaka okuyucuda 540 nm dalga boyundaki absorbans kör kuyucuğuna karşı okundu. Kör olarak hiçbir işleme tabi tutulmamış 200 µl bidistile su kullanıldı. Aynı konsantrasyondaki kuyucuk çiftlerinde okunan absorbansın ortalaması alınıp NO standart eğrisi çizildi. Her deney günü, iki ya da üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbansı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

2.6.5. NOS Aktivitesi Tayini

Bu deneyin prensibi, biyolojik örneklerde zamana ve sıcaklığa bağlı bir reaksiyon ile NOS'un katalizörlüğünde oluşan NO'nun sulu çözeltilerdeki son ürünü olan total nitritin, Greiss reaksiyonu aracılığıyla kolorimetrik olarak ölçülmesidir (55). NOS, kompleks bir enzim olup nöronlarda, trombositlerde, nötrofillerde ve daha birçok hücrede moleküler arjinin ve oksijene etki ederek NO oluşumuna neden olur. NO'nun *in vivo* son ürünleri ise nitrit ve nitrattır.

Deneyde kullanılan nitrat redüktaz (NR), nitratın enzimatik redüksiyonla nitrite indirgenmesini katalizler. NADPH ise, NOS'un kofaktörüdür ancak NADPH Greiss ayracının etkinliğini azalttığından deneydeki NADPH fazlalığı laktat dehidrogenaz (LDH) kullanılarak ortadan kaldırılır. Yöntemde NOS reaksiyonu ısı inaktivasyonu ile durdurulur, asit kullanımı NR'ı inhibe ettiği için tercih edilmez.

Greiss ayracı kullanılarak spektrofotometrik olarak nitrit tayini kolay ve hassas bir yöntemdir. Asidik çözeltilerde nitrit, nitroz aside dönüşür. Nitroz asit ile sülfanilamid arasında diazonyum tepkimesi gerçekleşir. Sülfanilamid diazonyum tuzunun, N-(1-Naftil)-etilendiaminle etkileşerek 540 nm'de ölçülebilen kırmızı bir bileşik oluşturmasının ardından absorbans mikroplaka okuyucuda ölçülür.

Omurilik hasarlı bölge dokusu stok homojenatları, deney tamponu ile 5 kat dilüe edildikten sonra mikroplaka kuyucuklarına 40 µl uygulandı. Üzerlerine 20 µl

deney tamponu ilave edildi. Her örnek için iki deneme yapıldı. Deney günü taze hazırlanmış 10'ar µl 1 mM NADPH ve nitrat redüktaz çözeltisi kuyucuklara eklendi. Mikroplaka içeriği 60 dk. oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 10'ar µl kofaktör hazırlama ve LDH çözeltileri her kuyucuğa eklendi. Mikroplaka oda sıcaklığında 20 dk. inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklara 50'şer µl Greiss Ayracı 1 ve 2 ilave edilip, oda sıcaklığında 10 dk. daha bekletildi ve örneklerin absorbansı 540 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucuda köre karşı okundu. Kör olarak herhangi bir işleme tabi tutulmayan 200 µl HPLC saflığında su kullanıldı. Örnek absorbanslarının ortalaması alınıp standart eğri yardımıyla konsantrasyon değeri bulundu. NOS aktivitesi ise aşağıdaki formülden hareketle hesaplandı ve sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpıldıktan sonra "nmol/mg protein" olarak verildi.

$$\text{NOS aktivitesi} = (C540 \times 200 / VS) / t$$

$$= \text{nmol/ml/dk}$$

C540: Örneğin absorbansının karşılık geldiği konsantrasyon (nmol/ml)

200: Reaksiyonun son hacmi (200 µl)

VS: Kuyucuklara uygulanan örneğin hacmi (40 µl)

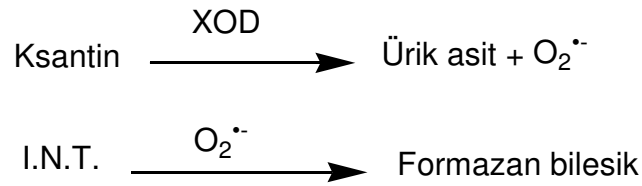
t: NOS reaksiyonunun inkübasyon süresi (60 dk.)

2.6.6. NOS Aktivitesi Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Kit içerisinde bulunan 600 nM nitrat standardı çözeltisi deney tamponu ile 10 kat seyreltildi ve dilüe nitrat standardından hareketle deney tamponu kullanılarak 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 nmol/ml konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlandı. Her standart üç kez çalışıldı ve 2.6.5'deki işlemler sırasıyla uygulandı. Aynı konsantrasyondaki standardı içeren kuyucuk çiftlerinde okunan absorbansın ortalaması alınıp nitrat standart eğrisi çizildi. Her deney günü, iki ya da üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbansı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

2.6.7. SOD Aktivitesi Tayini

Omurilik hasarlı bölge dokusunda SOD aktivitesi tayini, deney ortamında oluşturulan süperoksit radikalinin verdiği renk reaksiyonunun SOD tarafından inhibisyonunun kolorimetrik olarak tayin edilmesi esasına dayanır (96). Bu yöntemde ksantin, ksantin oksidaz (XOD) enzimi katalizörlüğünde süperoksit radikali ve ürik asite dönüşür. Açığa çıkan süperoksit radikali, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-fenil tetrazolyum kloriti (INT) kırmızı renkteki bir bileşiğe (formazan) dönüştürür. Ancak süperoksit radikalinin bir kısmı ortamda bulunan SOD enzimi ile etkileşerek bu reaksiyonu inhibe eder. Bu inhibisyonun oranına bağlı olarak SOD enzim aktivitesi tayin edilir. SOD aktivite tayininin temel reaksiyon denklemi Şekil 21'de verilmiştir.



Şekil 21. SOD aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi (96)

Omurilik hasarlı bölge dokusu stok homojenatı, dilüe edici ajan ile 100 kat seyreltildi. Seyreltilmiş örnekler ve hazırlanan karıştırılmış substrat çözeltisi ölçümden en az 5 dk. önce 37 °C'lik su banyosunda inkübe edildi. Temiz bir tüpe 850 µl karıştırılmış substrat çözeltisi ve 25 µl dilüe örnek konulduktan sonra 125 µl ksantin oksidaz ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırıldı.

Kör küveti boş bırakılıp, örnek küvetine tüp içeriği aktarıldı. 30. sn., 1., 2., 3. dk.'larda ve 3.5'inci dakikada spektrofotometrede 505 nm'deki absorbans havaya karşı okundu. Her örnek için üçer ölçüm yapıldı. Tablo II'de SOD ölçüm küvetlerindeki çözelti ve miktarları gösterilmiştir.

Tablo II. SOD ölçüm küvetlerindeki çözeltiler ve miktarları

<u>Çözeltiler</u>	<u>Örnek küveti (µl)</u>	<u>Kör küveti</u>
Dilüe örnek	25	---
Karıştırılmış Substrat	850	---
Ksantin oksidaz(XOD)	125	---

2.6.8. SOD Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması ve Örneklerin SOD Aktivitesinin Hesaplanması

Kit içinde bulunan standart SOD şişesinin içeriği 10 ml bidistile su ile karıştırılıp, 4.9 Ü/ml konsantrasyonunda SOD içeren S6 standardı hazırlandı. Bu standarttan hareketle uygun seyreltmeler dilüe edici ajan ile yapılarak sırasıyla 2.45, 1.225, 0.612 ve 0.204 Ü/ml konsantrasyonlarında SOD taşıyan S5, S4, S3, S2 standartları hazırlandı. S1 standardı ise yalnız dilüe edici ajan içermektedir yani S1 reaksiyonu sırasında herhangi bir inhibisyon meydana gelmez.

$$\Delta AS1/dk = \text{İnhibe olmamış reaksiyon oranı} = \% 100$$

Standart çözeltilerine örneklere uygulanan işlemler aynen uygulanıp absorbanslar okundu. Aşağıdaki formülden hareketle örneklerin ve standartların $\Delta A/dk$ değeri hesaplandı.

$$\Delta A/dk \text{ (örnek veya standart)} = (A_2 - A_1)/\Delta dk$$

A₂: 3.5'inci dk.'daki absorbans

A₁: 0.5'inci dk.'daki absorbans

Δdk : 3 dakika

Tüm standart ve örneklerin $\Delta A/dk$ değeri ile $\Delta AS1/dk$ değeri arasında orantı kurularak örnek ve standart verileri % olarak ifade edildi. Sonuçlar 100'den çıkarılarak inhibe olmuş reaksiyon oranı hesaplandı.

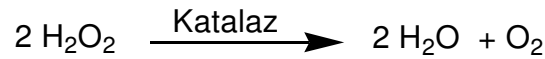
$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - (\Delta A_{\text{std}}/\text{dk} \times 100) / \Delta A_{\text{S1}}/\text{dk}$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 100 - (\Delta A_{\text{örnek}}/\text{dk} \times 100) / \Delta A_{\text{S1}}/\text{dk}$$

Örneklerden elde edilen yüzde inhibisyon verileriyle standart inhibisyonları arasında doğru orantı kurularak örneklerdeki SOD aktivitesi Ü/ml olarak tayin edildi. Buradan elde edilen değer seyreltme faktörü ile çarpıldıktan sonra, sonuçlar “Ü/mg protein” olarak verildi ve her örnek üçer kez çalışıldığından ortalamaları alındı.

2.6.9. CAT Aktivitesi Tayini

H₂O₂'in katalaz enzimi tarafından parçalanması sonucu 240 nm dalga boyunda absorbansta meydana gelen düşüş üzerinden enzimin aktivite tayinini yapan kolorimetrik bir yöntem kullanılmıştır (1). Şekil 22'de katalaz aktivite tayininin temel reaksiyon denklemi verilmiştir.



Şekil 22. Katalaz aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi (36)

Omurilik hasarlı bölge dokusu stok homojenatı fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.0) ile 100 kat seyreltildi. Temiz bir tüpe 2 ml doku homojenatı ve 1 ml 50 mM fosfat tamponu konup manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve karışım kör küvetine alındı. Ayrı bir tüpe alınan 2 ml doku homojenatı üzerine 1 ml H₂O₂ çözeltisi ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı ve tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırılıp örnek küvetine aktarıldı. Spektrofotometrede 240 nm'de absorbansdaki azalma 15. 30. saniyelerde ve 2. 3. dakikalarda köre karşı okundu. Tüm örnekler üçer kez çalışıldı. Tablo III'te katalaz ölçüm küvetlerindeki çözeltiler ve miktarları verilmiştir.

Tablo III. Katalaz ölçüm küvetlerindeki çözeltiler ve miktarları

<u>Cözeltiler</u>	<u>Örnek Küveti (ml)</u>	<u>Kör Küveti (ml)</u>
Doku Homojenatı	2	2
50 mM Fosfat Tamponu	--	1
H ₂ O ₂ çözeltisi	1	--

Absorbans değişiminden hareketle 'k' değeri hesaplandı ve sonuçlar seyreltme faktörü ile çarpıldıktan sonra "Aebi Ünitesi (AÜ)/mg protein" cinsinden verildi.

$$k = 2.3 / \Delta t \times \log A_1/A_2$$

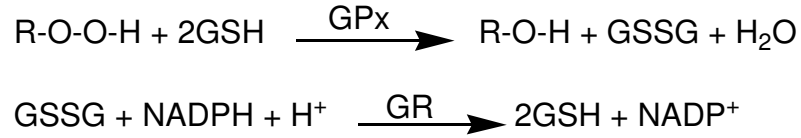
A₁: ilk okunan absorbans

A₂: son okunan absorbans

Δt: t₂ - t₁ (180 sn – 15 sn)

2.6.10. GPx Aktivitesi Tayini

Bu yöntemde, GPx aktivitesi indirekt olarak ölçülmektedir. GPx'in organik peroksitleri indirgemesi sonucu oluşan okside haldeki glutatyon, glutatyon redüktazın (GR) katalizlediği bir tepkime ile indirgenmiş haline dönüşür. Bu dönüşüm sırasında ortamda bulunan NADPH, NADP⁺'ya yükseltgenir ve açığa çıkan serbest hidrojen molekülleri okside glutatyona aktarılarak indirgenmiş glutatyon sentezlenir. Bu tepkimeler gerçekleşirken 340 nm dalga boyundaki absorbansta zamana bağlı olarak bir azalma gözlenir. Bu düşüşten yola çıkılarak GPx enzim aktivitesi tayin edilir. Absorbanstaki azalma ile örnekteki GPx aktivitesi arasında doğru orantı vardır (80). Şekil 23'te GPx aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi verilmiştir.



Şekil 23. GPx aktivite tayininde temel reaksiyon denklemi (80)

Omurilik hasarlı bölge dokusu stok homojenatı dilüe edici ajan kullanılarak 100 kat seyreltildi ve hazırlanan belirteç çözeltisi ile birlikte ölçümden önce en az 5 dk. 37 °C'lik su banyosunda inkübe edildi. Temiz bir tüpte 1 ml belirteç 20 µl örnek ile karıştırıldıktan sonra üzerlerine, deney günü taze hazırlanmış H₂O₂ çözeltisinden 40 µl konduğu anda kronometre çalıştırıldı. Tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Kör küveti boş bırakılıp, örnek küvetine hazırlanan çözelti aktarıldı. 1., 2., 3. dakikalarda 340 nm dalga boyuna ayarlanmış spektrofotometrede havaya karşı ölçüm alındı. Her örnek üç kez çalışıldı. Tablo IV'te GPx ölçüm küvetlerindeki çözeltiler ve miktarları özetlenmiştir.

Tablo IV. GPx ölçüm küvetlerindeki çözeltiler ve miktarları

<u>Cözeltiler</u>	<u>Örnek küveti (µl)</u>	<u>Kör küveti</u>
Dilüe örnek	20	---
Belirteç	1000	---
H ₂ O ₂	40	---

Bir defaya mahsus olarak belirteç körü hazırlandı. Temiz bir tüpte 1 ml belirteç çözeltisine 20 µl distile su ilave edilip, üzerine 40 µl H₂O₂ çözeltisi konduğu anda kronometre çalıştırıldı. Tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve örnek küvetine aktarıldı. 1., 2., 3. dakikalarda 340 nm'de ölçüm alındı. 3. ve 1. dakikada ölçülen absorpsanlar arasındaki fark ($\Delta A_{340\text{nm/dk}}$) 8412 sabiti ile çarpılarak belirteç körünün Ü/L değeri bulundu.

$$\text{Ü/L Belirteç körü} = 8412 \times \Delta A_{340\text{nm/dk}}$$

Örneklerin Ü/L değeri ise aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\text{Ü/L Örnek} = 8412 \times \Delta A_{340\text{nm/dk}}$$

$$\Delta A_{340\text{ nm/dk}} = A_{1. \text{ dk}} - A_{3. \text{ dk}}$$

A: Örneğin absorbansı

Çıkan sonuç, belirteç körünün Ü/L değerinden çıkarılıp, seyreltme katsayısı ile çarpılarak GPx aktivitesi hesaplandı.

$$(\text{Ü/L Örnek} - \text{Ü/L Belirteç körü}) \times \text{Seyreltme katsayısı} = \text{GPx aktivitesi (Ü/L)}$$

Her örnek için yapılan üç denemenin ortalaması alındı. Ortalama GPx aktivitesi, her homojenatın protein miktarlarına bölünerek, GPx aktivitesi “Ü/mg protein” olarak verildi.

2.6.11. Plazma Örneklerinde TAK Tayini

TAK tayini, trolox eşdeğerliğini ortaya koyan bir yöntemle saptanır (92). Bu yöntemde, ortamda bulunan ABTS^{•+} radikalinin 734 nm dalga boyunda absorbansı sabitlendikten sonra ortama ilave edilen plazma örneğindeki antioksidanların etkisiyle, absorbansta meydana gelen düşüş kolorimetrik olarak tayin edilir. Stok ABTS çözeltisindeki ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu 734 nm'de maksimum absorbans gösteren mavi/yeşil kromofor ABTS^{•+} radikali meydana gelir. Radikalin absorbansı 30°C'de 12-16 saat içinde sabitlenir ve iki gün süreyle stabil kalır. Ancak ortamda hidrojen verici antioksidanların bulunması ile radikal indirgenmeye başlar ve radikal katyonun absorpsiyonunda zamana bağlı olarak düşüş olur. Bu düşme, yüzde inhibisyon olarak ifade edilip aynı koşullar altında yapılan bir çalışma ile çizilen trolox standart eğrisinden hareketle TAK tayini yapılır.

Örneklerden elde edilen kan plazmaları, 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile 100 kat seyreltildi. Kör küvetine 1 ml 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) konuldu.

Deney gününden bir gün önce hazırlanıp 30°C'de muhafaza edilen 7 mM stok ABTS^{•+} radikal çözeltisinin 734 nm'de 0.700 ± 0.02 absorban gösterdiği konsantrasyondaki, yüzde inhibisyonu "0"dır. Bu nedenle ABTS çözeltisinin absorbanı 0.700 ± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu (pH: 7.4) ile dilüe edildi. Bu çözeltiden temiz bir tüpe 1 ml alınıp üzerine 10 µl seyreltik plazma çözeltisi ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve örnek küvetine aktarıldı. 734 nm dalga boyunda 6. dakikada köre karşı okunan absorbanstan hareketle yüzde inhibisyon hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = (A_{\text{ABTS}^{\bullet+}} - A_{6. \text{dk}}) \times 100 / A_{\text{ABTS}^{\bullet+}}$$

A_{ABTS^{•+}}: ABTS^{•+}'nin 734 nm'deki absorbanı (0.700 ± 0.02)

A_{6. dk}: ABTS^{•+}'nin örnek ilavesinden sonraki 6. dakikada okunan absorbanı

Her örnek üçer kez ölçüldü. Trolox standart eğrisinde % inhibisyon değerlerinin karşılık geldiği trolox eşdeğer konsantrasyonu belirlendi. Sonuçlar, seyreltme faktörü hesaba katılarak "mmol trolox eşdeğerliği/L" olarak verildi. Her üç ölçümün ortalaması alındı.

2.6.12. TAK Tayininde Kullanılan Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Trolox, TAK tayinleri için en çok kullanılan standarttır. Trolox'un belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlandı. Bunun için 1.251 g trolox tartıldı ve 5 mM fosfat tamponu kullanılarak 100 ml'ye tamamlandı. 50 mM konsantrasyondaki stok çözeltiden alınan belirli hacimler, 5 mM fosfat tamponu ile seyreltilerek 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15 mM'lık standart çözeltileri hazırlandı. Spektrofotometrenin kör küvetine 1 ml 5 mM fosfat tamponu kondu. Deney gününden bir gün önce hazırlanıp 30°C'de muhafaza edilen 7 mM stok ABTS^{•+} radikal çözeltisinin 734 nm'deki absorbanı 0.700 ± 0.02 olacak şekilde 5 mM fosfat tamponu ile dilüe edildi. Bu çözeltiden temiz bir tüpe 1 ml alınıp üzerine 10 µl trolox standart çözeltisi

ilave edildiği anda kronometre çalıştırıldı. Tüp içeriği manyetik karıştırıcıda karıştırıldı ve ölçüm küvetine aktarıldı. 734 nm'de spektrofotometrede 6. dakikada köre karşı okunan absorbanstan hareketle yüzde inhibisyon hesaplandı. Farklı konsantrasyonlardaki standart çözeltiler için üçer deneme yapıp hesaplanan yüzde inhibisyonların ortalaması alınarak standart eğri çizildi. Her deney günü, iki ya da üç ayrı konsantrasyonda taze hazırlanan standart çözeltilerinin absorbansı, örnekler ile birlikte okunarak standart eğriden sapmalar düzeltildi.

2.6.13. Comet Yöntemi ile Oksidatif DNA Hasarı Tayini

Tam kanda oksidatif DNA hasarı tayini, comet (alkali tek hücre-jel elektroforezi) yöntemi ile yapılmıştır (101, 108). Bu yöntem ile DNA tek zincir kırıklarını, alkali ile işaretlenmiş DNA kısımlarını saptamak mümkün olmaktadır. Uygun koşullarda saklanmış tam kan örneği agaroz jel ile muamele edilip, lam (buzlu camdan yapılmış-fully frosted) üzerine aktarılır ve alkali ortamda lizis yapılarak istenmeyen kısımlar ortamdaki uzaklaşırken, DNA denatüre edilir. Böylece DNA'nın tek zincir kırıkları açığa çıkar. Lizis basamağından alınan lamlar alkali bir tamponun kullanıldığı elektroforeze tabi tutulur.

Elektroforez tekniği, moleküllerin sahip oldukları net elektrik yüklerinin, bir elektriksel alan içindeki hareketlerini etkilemesi prensibine dayanır. Negatif yüklü DNA molekülü de kırık uçları nedeniyle bu elektriksel alanda anoda doğru göç etmeye başlar. Bu göçün derecesi DNA'daki kırık uçların sayısına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Elektroforez basamağından alınan lamlar nötralize edildikten sonra gümüş boyama tekniği ile boyanıp, mikroskop altında bakıldığında oksidatif hasarlı DNA molekülleri kuyruklu yıldız şeklinde gözlenir. Mikroskoba bağlı kamera ile resimleri çekilen comet'lerin, comet yöntemine ait software (CASP: Comet Analysis Software Programme; 1.2.2 version) kullanılarak DNA hasarı tayin

parametreleri ölçülür. Kuyruk kısmındaki DNA kırıklarının yoğunluğu ile DNA hasarı arasında doğru orantı vardır.

Deneyde, Chuang tarafından 2004 yılında geliştirilen tam kan Comet yöntemi kullanıldı (20). Bu yöntemde göre kan örnekleri derin dondurucudan çıkarılıp, hızlı bir şekilde 37°C de 1-2 dakika içinde eritildi. NMP agaroz çözeltisi bir behere alınıp, ağzı alüminyum folyo ile kapalı bir şekilde ısıtıcıda eriyinceye kadar ısıtıldı. Lamlar düz bir tepsi üzerine yerleştirilip, cam kalemi ile numaralandırıldı. Her örnek için iki ayrı jel hazırlandı. 25 ml'lik cam behere 15 ml NMP agaroz jel konulduktan sonra lamlar behere daldırılıp, 30 sn boyunca çözelti içinde bekletildi böylece lamların uç kısımlarının jelle kaplanması sağlandı. Lamlar tepsi üzerinde kurutuldu. Aynı işlem lamın diğer ucuna da uygulandı. Lamların kaygan yüzeyindeki jel ortamdan uzaklaştırılırken buzlu görünümlü taraftaki jel tabakası ile çalışmaya devam edildi. LMP agaroz çözeltisi cam behere alınarak, ısıtıcıda çözününceye kadar ısıtıldıktan sonra 37°C' ye soğutuldu. Temiz bir tüpe 150 µl LMP agaroz çözeltisi alındı ve üzerine kryovialde saklanan tam kan örneğinden 40 µl ilave edilip manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Tüpteki karışımdan 75 µl alınarak lamın bir kenarındaki katılmış haldeki NMP agaroz jelin üzerine uygulanıp, 20x20 mm boyutlarındaki lamel ile kapatıldı. Lamlar desikatöre alınarak buzdolabında 10 dk. bekletilip, jellerin sertleşmesi sağlandı. Daha sonra, lameller yavaşça sıyrılarak üzerlerinden alındı.

Üçüncü jel tabakası olarak 75 µl LMP agaroz çözeltisi uygulanıp, lamel ile üzeri kapatıldı ve 10 dk. desikatörde ve buzdolabında kuruttuktan sonra lameller kaldırıldı. Lamlar şalelere yatay konumda yerleştirilip lizis tamponu eklendi. Şalelerin kapağı kapatılıp buzdolabında 24 saat bekletildi.

Elektroforez tankı 4°C'deki elektroforez tamponu ile dolduruldu. Lizis tamponundan çıkarılan lamlar tankın kenarlarına ve birbirlerine temas edecek şekilde yerleştirilip, güç kaynağı ve tank arasındaki elektriksel bağlantılar

sağlandıktan sonra elektroforez tamponunda 15 dk. bekletilip 300 mA akım altında, 20 dk. boyunca oda sıcaklığında elektroforez gerçekleştirildi.

Elektroforezden alınan lamlar temiz bir şaleye alınıp 3 kez 5'er dk.'lık sürelerle nötralizasyon tamponu içinde buzdolabında bekletildi ve şaleden çıkarılıp tepsiye yerleştirildi. Fazla sıvı kağıt havlu yardımı ile jelle zarar vermeden alındı.

2.6.14. Jellerin Boyanması ve Görüntülenmesi

Agaroz jelin taşıdığı DNA yapısını mikroskopta görüntülemek amacıyla gümüş boyama tekniği kullanılmıştır. Bu teknik, fluoresans mikroskobuna gerek kalmadan ışık mikroskobu kullanılarak sağlıklı koşullar altında hassas bir şekilde, basit bir yöntemle görüntü alınmasını sağlamıştır (83).

Nötralizasyondan alınan lamlar temiz bir şaleye aktarılıp. 10 dk. fiksasyon çözeltisinde bekletildikten sonra 1 dk. deiyonize suda durulandı. Lamlar kurutma kağıdına yerleştirildi ve jellerin kuruması için 1 saat boyunca 37°C' lik etüvde tutuldu. Kuruyan lamlar, şaleye yerleştirilip boyama çözeltisi içinde jellerde gri-kahve renk gelişene kadar (yaklaşık 30 dk.) bekletildi. 1 dk. deiyonize suda durulandıktan sonra durdurma çözeltisi içinde 5 dk. tutularak preparatın rengi sabitlendi.

Lamlar deiyonize suda yıkanıp preparatın üzerine lamel kapatılarak mikroskop görüntüsü alınana dek oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Aynı gün veya en geç ertesi gün mikroskopta görüntü alındı. Lamlar ışık mikroskobu (Olympus trinoküler) altında incelendi.

Mikroskopta 40 kat büyütme ile saptanan görüntü 1.3 megapiksel çözünürlüğe sahip webcam aracılığıyla bilgisayara aktarılıp kaydedildi. Bu görüntü comet assay software programında (CASP) açılıp; DNA hasar tayini parametreleri

hesaplandı. Her örnek için 20'şer ölçüm alındı ve bu değerlerin ortalaması kullanıldı.

Sonuçlar, Comet'in kuyruk ve baş kısmındaki DNA yüzdeleri ile kuyruk momenti şeklinde ifade edilmiş ve bu parametreler aşağıdaki formüllerden hareketle hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Baş DNA oranı} = \text{DNA baş uzunluğu} \times 100 / \text{DNA toplam uzunluğu}$$

$$\% \text{ Kuyruk DNA oranı} = \text{DNA kuyruk uzunluğu} \times 100 / \text{DNA toplam uzunluğu}$$

$$\text{Kuyruk Momenti} = \% \text{ Kuyruk DNA oranı} \times \text{Kuyruk uzunluğu} / 100$$

Kuyruk momentinin 2.5 ve üzerinde olması literatürlerde ciddi DNA hasarı şeklinde yorumlanmaktadır (115).

2.7. İstatistiksel Değerlendirme Yöntemi

Gruplar arasındaki parametreleri karşılaştırmak için farklı istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Bu yöntemler; tek faktörlü varyans analizi (One-Way, Multivariate ANOVA), Post Hoc. Benferroni analizleri ile ikili grup karşılaştırmalarında students' t testidir. Veriler için % 95 ve % 99'luk güven aralığı seçilmiştir. Tüm istatistiksel yöntemler "SPSS 13.0" paket programı kullanılarak yapılmıştır.

2.8. Etik Kurul Onayı

Çalışma başlangıcında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2005/5-2 sayılı ve 08.09.2005 tarihli bir yazıyla söz konusu çalışma için onay alınmıştır.

BÖLÜM III

BULGULAR

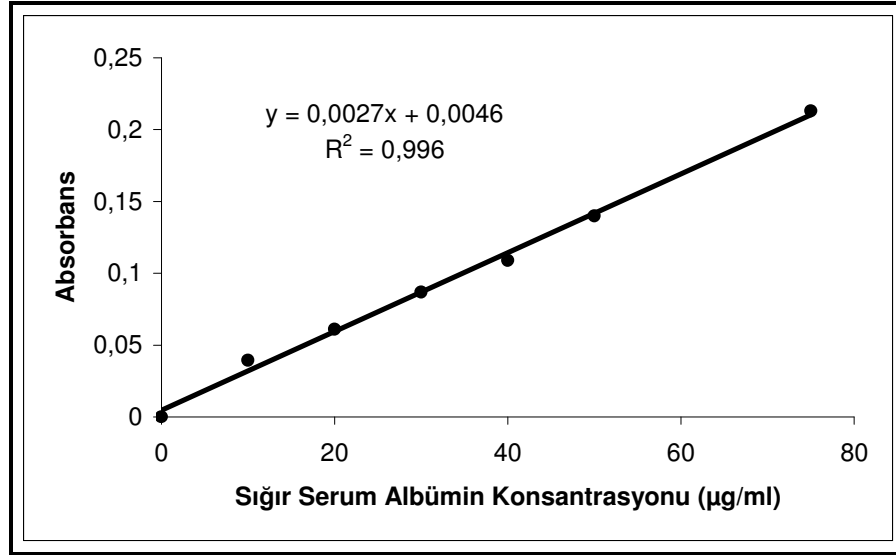
3.1. Standart Eğri Çizimleri

3.1.1. Protein Miktar Tayini Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda sığır serum albümini (BSA) taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo V'de sunulmuş ve Şekil 24'te bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo V. BSA ile standart eğri çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri. \pm S.H.: \pm Standart hata. (n): Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı.

Sığır Serum Albümini (BSA) ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbans Ortalama \pm S.H. (n)
10	0.039 \pm 0.0002 (3)
20	0.061 \pm 0.0003 (3)
30	0.087 \pm 0.0002 (3)
40	0.109 \pm 0.0002 (3)
50	0.140 \pm 0.0003 (3)
75	0.214 \pm 0.0003 (3)



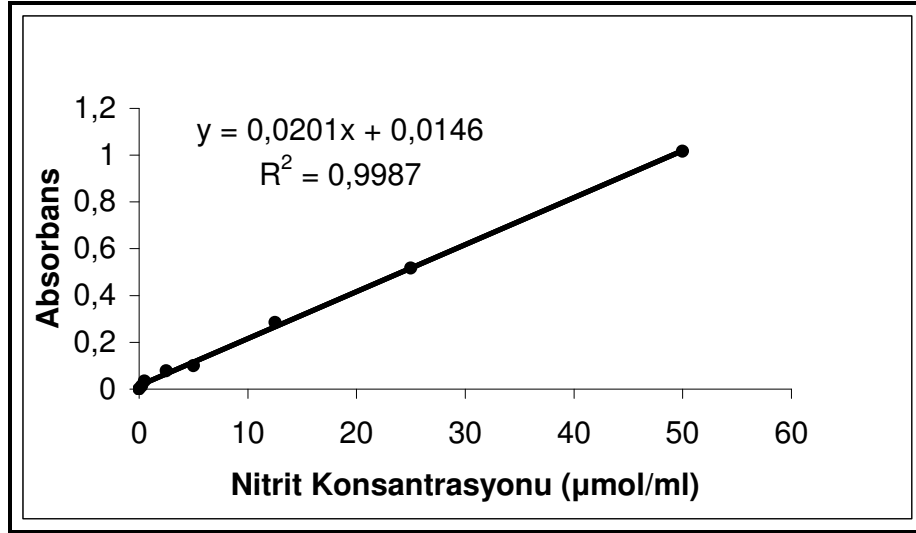
Şekil 24. Sığır serum albümininin absorbands, konsantrasyon eğrisi

3.1.2. NO Tayini Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda nitrit taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbands değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo VI'da sunulmuş ve Şekil 25'de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo VI. Nitrit ile standart eğri çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbands değerleri. \pm S.H.: \pm Standart Hata. (n): Her konsantrasyondaki ölçüm sayısı.

Nitrit (µmol/ml)	Absorbans Ortalama \pm S.H. (n)
0.25	0.012 \pm 0.0007 (3)
0.5	0.034 \pm 0.0001 (3)
2.5	0.078 \pm 0.0007 (3)
5.0	0.100 \pm 0.0002 (3)
12.5	0.285 \pm 0.0001 (3)
25.0	0.517 \pm 0.0002 (3)
50.0	1.016 \pm 0.0006 (3)



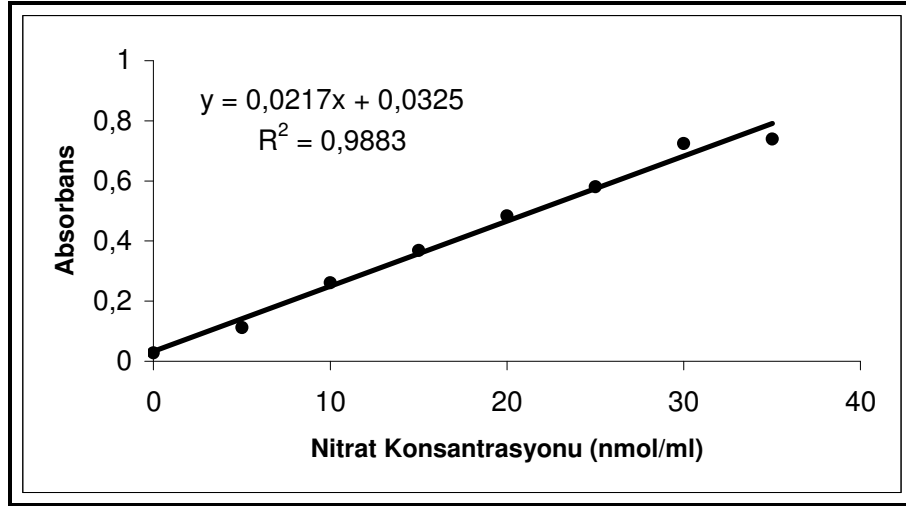
Şekil 25. Nitrit absorbans, konsantrasyon eğrisi

3.1.3. NOS Tayini Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda nitrat taşıyan çözeltilerin spektrofotometrede okunan absorbansları ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo VII'de sunulmuş ve Şekil 26'da bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo VII. Nitrat standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri. \pm S.H.: \pm Standart Hata. (n): Her konsantrasyondaki ölçüm sayısı.

Nitrat (nmol/ml)	Absorbans Ortalama \pm S.H. (n)
0	0.028 \pm 0.0009 (3)
5	0.112 \pm 0.0013 (3)
10	0.261 \pm 0.0021 (3)
15	0.369 \pm 0.0009 (3)
20	0.483 \pm 0.0046 (3)
25	0.580 \pm 0.0008 (3)
30	0.724 \pm 0.0051 (3)
35	0.739 \pm 0.0012 (3)



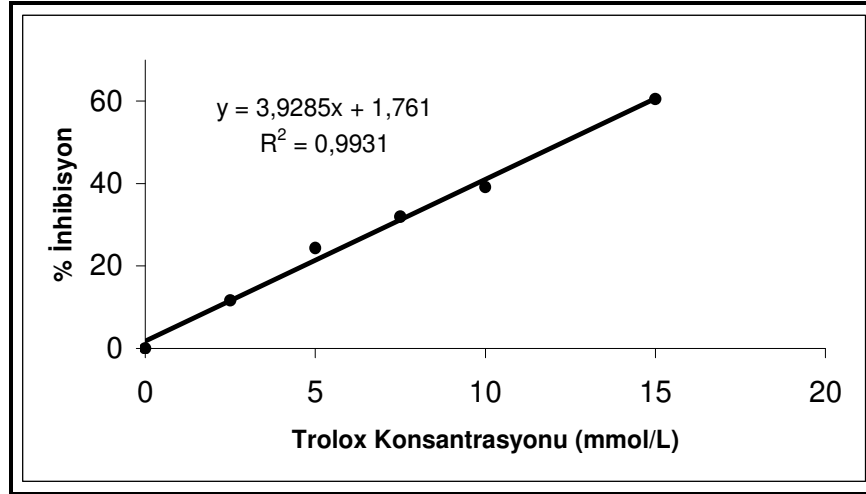
Şekil 26. Nitrat absorbans, konsantrasyon eğrisi

3.1.4. TAK Tayini Standart Eğrisi

Çeşitli konsantrasyonlarda trolox taşıyan çözeltilerin spektrofotometredeki absorbans değerleri ve bunlara ilişkin standart hatalar Tablo VIII'de verilmiş ve Şekil 27'de bu değerlere göre çizilen standart eğri gösterilmiştir.

Tablo VIII. Trolox standart eğrisi çizimi için maddenin bilinen konsantrasyonlarına karşı okunan absorbans değerleri. \pm S.H.: \pm Standart Hata. (n): Her konsantrasyondaki ölçüm sayısı.

Trolox (mmol/L)	% İnhibisyon Ortalama \pm S.H. (n)
2.5	11.662 \pm 1.568 (3)
5	24.332 \pm 1.281 (3)
7.5	31.955 \pm 0.765 (3)
10	39.177 \pm 0.747 (3)
15	60.579 \pm 0.777 (3)



Şekil 27. Trolox % inhibisyon, konsantrasyon eğrisi

3.2. Omurilik Hasarlı Bölgesi NO Düzeyleri

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre nakli yapılmış akut hasarlı grup ve bu grupların kontrol gruplarına ait sonuçlar Tablo IX ve Şekil 28'da, kronik omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarında elde edilen NO düzeyleri ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein) Tablo X ve Şekil 28'de gösterilmiştir.

Tablo IX. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein cinsinden NO düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

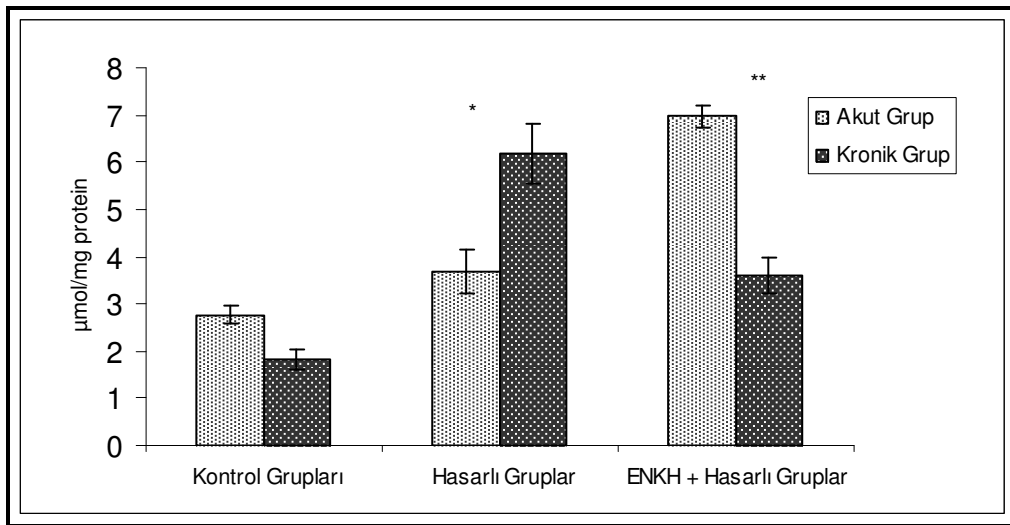
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	2.095	5.063	7.117
2	2.857	3.823	6.866
3	3.071	4.157	7.713
4	3.214	2.464	6.201
5	2.610	2.894	6.958
Ort. \pm S.H.	2.769 \pm 0.196	3.680 \pm 0.461	6.971 \pm 0.242

- Akut kontrole göre akut hasarlı grupta anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).
- Akut kontrol ile ENKH + akut hasarlı grup arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.01$).
- ENKH + akut hasarlı grupta akut hasarlı gruba göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).

Tablo X. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve kök hücre (ENKH) nakledilmiş gruplara ait omurilik lezyon bölgesinde $\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein cinsinden NO düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	1.706	7.510	5.084
2	2.316	7.682	2.929
3	2.289	5.180	3.030
4	1.256	6.175	3.459
5	1.461	4.371	3.454
Ort. \pm S.H.	1.805 \pm 0.216	6.183 \pm 0.643	3.591 \pm 0.388

- Kronik kontrole göre kronik hasarlı grup değerleri anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.01$).
- ENKH+kronik hasarlı grup değerleri kronik kontrole göre artmıştır ($p < 0.05$).
- ENKH + kronik hasarlı grupta kronik hasara göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).



Şekil 28. Akut-kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik dokusundaki NO düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı
 * Kronik hasarlı grupta akut hasarlı gruba göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).
 ** Akut tedavi grubunda kronik gruba göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).

3.3. Omurilik Hasarlı Bölgesi NOS Aktivitesi Sonuçları

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre nakli yapılmış akut hasarlı grup ve bu grupların kontrol gruplarına ait NOS aktiviteleri Tablo XI ve Şekil 29'da, kronik

omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının sonuçları ise (nmol/mg protein) Tablo XII ve Şekil 29'da gösterilmiştir.

Tablo XI. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde nmol/mg protein cinsinden NOS aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

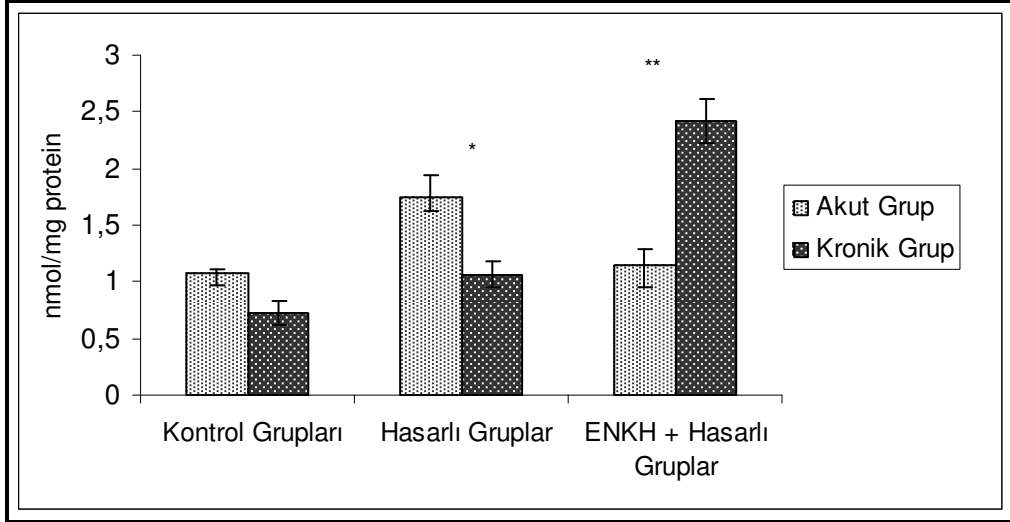
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	0.988	2.286	1.293
2	1.053	2.134	0.569
3	1.011	1.382	1.399
4	1.122	1.567	1.353
5	1.201	1.356	1.096
Ort. \pm S.H.	1.075 \pm 0.038	1.745 \pm 0.194	1.142 \pm 0.152

- Akut kontrol ile akut hasarlı grup arasında anlamlı bir artış vardır ($p < 0.05$).
- Akut hasarlı grup düzeyleri tedavi grubuna göre anlamlı bir şekilde yüksektir ($p < 0.05$).

Tablo XII. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve kök hücre (ENKH) nakledilmiş kronik grupların omurilik bölgesindeki nmol/mg protein cinsinden NOS aktivitesi sonuçları ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	0.968	0.889	2.571
2	0.850	1.116	1.933
3	0.826	0.900	2.456
4	0.527	1.521	3.058
5	0.416	0.909	2.081
Ort. \pm S.H.	0.717 \pm 0.104	1.067 \pm 0.120	2.419 \pm 0.197

- ENKH+kronik hasarlı grupta kronik kontrole göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.05$).
- Kronik hasar ile ENKH+kronik hasarlı grup arasında anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).



Şekil 29. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik dokusundaki NOS aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

* Akut hasarlı grupta kronik hasara göre anlamlı bir artış vardır ($p < 0.05$).

** Kronik ENKH + hasarlı grup değerleri akut gruba göre yüksektir ($p < 0.01$).

3.4. Hasarlı Omurilik Dokusu SOD Aktivitesi Sonuçları

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre uygulanmış akut hasarlı grup ve bu grupların kontrol gruplarına ait SOD aktiviteleri Tablo XIII ve Şekil 30'de, kronik omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının aktiviteleri ise (Ü/mg protein) Tablo XIV ve Şekil 30'de gösterilmiştir.

Tablo XIII. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesindeki Ü/mg protein cinsinden SOD aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

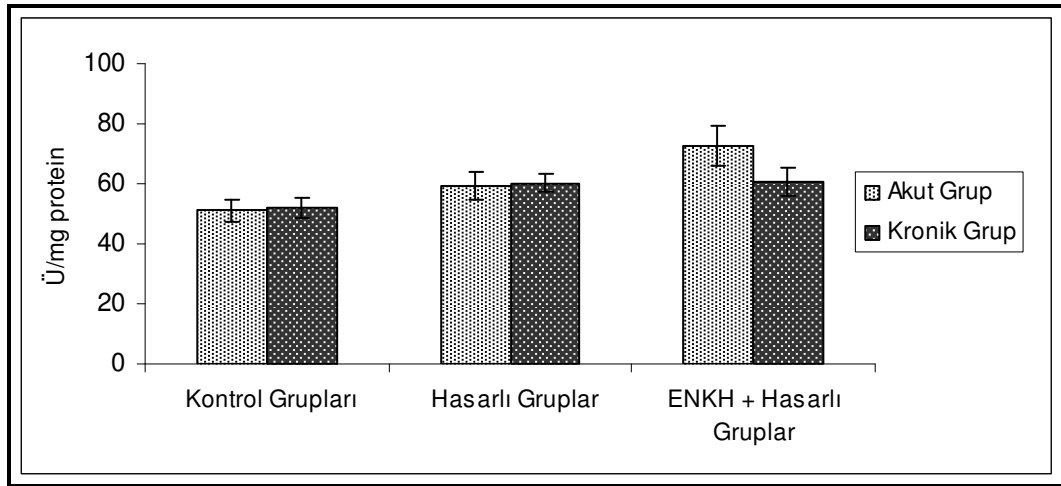
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	39.674	65.573	48.027
2	54.974	72.650	70.283
3	60.806	58.874	86.309
4	54.915	45.960	75.896
5	45.349	52.759	81.885
Ort. \pm S.H.	51.144 \pm 3.790	59.163 \pm 4.681	72.480 \pm 6.686

- ENKH+akut hasarlı grup değerleri akut kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$).

Tablo XIV. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik hasar bölgesindeki Ü/mg protein cinsinden SOD aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	43.880	67.010	75.526
2	55.140	65.435	51.687
3	56.674	62.292	50.225
4	45.444	52.427	67.005
5	59.055	54.254	58.205
Ort. \pm S.H.	52.039 \pm 3.085	60.284 \pm 2.948	60.530 \pm 4.778

- Çalışma grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur.



Şekil 30. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik bölgesindeki SOD aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

3.5. Hasarlı Omurilik Dokusu CAT Aktivitesi Sonuçları

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre uygulanmış akut hasarlı grup ve bu grupların kontrollerine ait CAT aktiviteleri Tablo XV ve Şekil 31'de, kronik omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının aktiviteleri ise (Aebi Ünitesi/mg protein) Tablo XVI ve Şekil 31'de gösterilmiştir.

Tablo XV. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinin Ü/mg protein cinsinden CAT aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

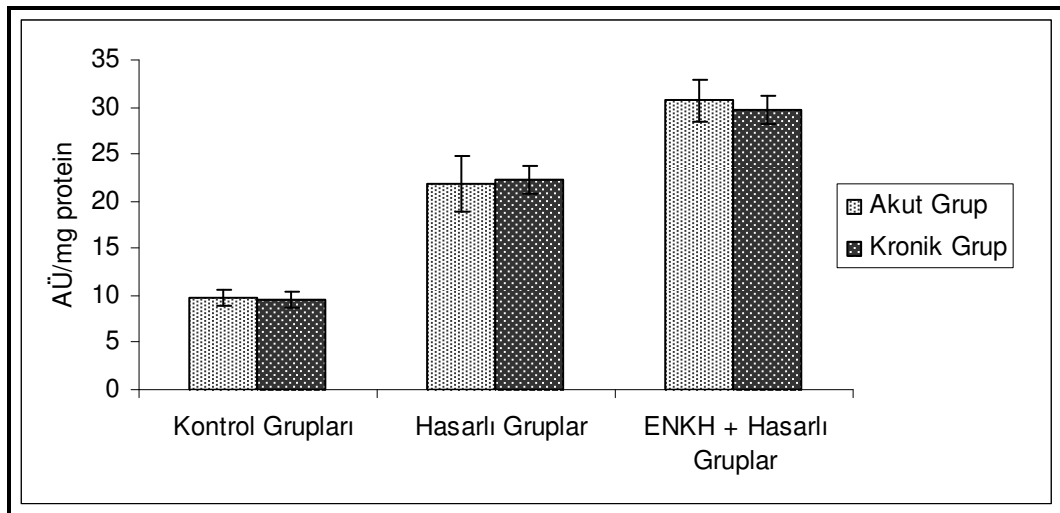
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	7.739	24.487	35.307
2	9.356	31.318	31.090
3	8.330	21.887	34.703
4	12.661	15.352	23.328
5	10.669	15.979	28.945
Ort. \pm S.H.	9.751 \pm 0.881	21.876 \pm 2.960	30.674 \pm 2.177

- Akut kontrol ile akut hasarlı grup arasında anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).
- ENKH+akut hasarlı grupta akut kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.01$).
- Akut hasarlı ile ENKH+akut hasarlı grup arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0.01$).

Tablo XVI. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik bölgesinin Ü/mg protein cinsinden katalaz aktiviteleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	6.610	24.673	30.466
2	11.257	25.045	27.887
3	8.891	19.236	35.527
4	10.400	18.048	26.821
5	11.024	24.161	27.821
Ort. \pm S.H.	9.636 \pm 0.861	22.232 \pm 1.484	29.704 \pm 1.575

- Kronik kontrole göre kronik hasarlı grup değerleri anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$).
- ENKH+kronik hasarlı grup değerleri kronik kontrole göre artmıştır ($p < 0.01$).



Şekil 31. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik hasarlı bölgesindeki CAT aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

3.6. Hasarlı Omurilik Dokusu GPx Aktivitesi Sonuçları

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre uygulanmış akut hasarlı grup ve bu grupların kontrol gruplarına ait GPx aktiviteleri Tablo XVII ve Şekil 32'de, kronik

omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının aktiviteyi ise (Ü/mg protein) Tablo XVIII ve Şekil 32'de gösterilmiştir.

Tablo XVII. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakledilmiş akut hasarlı gruplara ait omurilik bölgesinde Ü/mg protein cinsinden GPx aktiviteyi ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

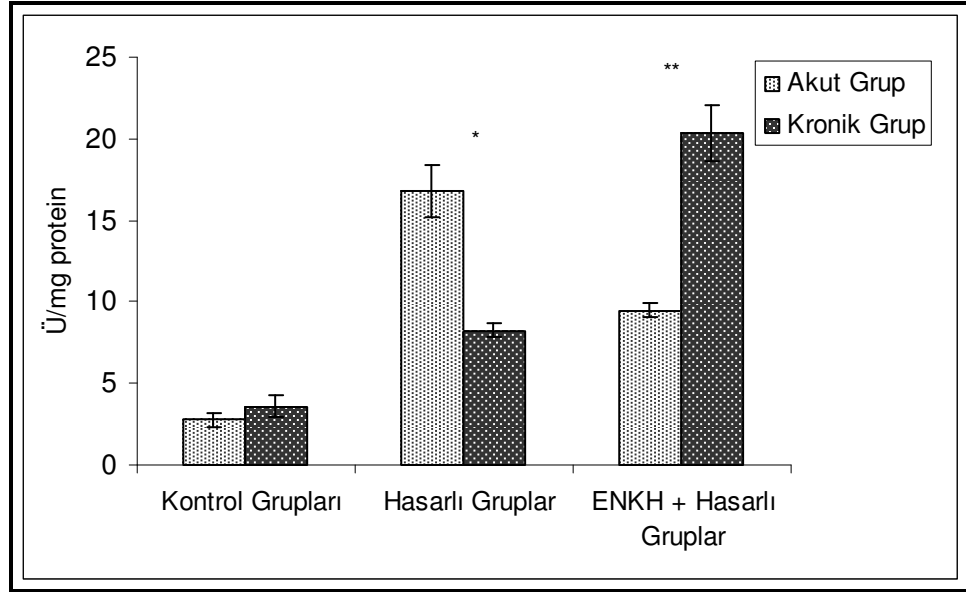
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	2.216	18.935	9.109
2	3.585	19.659	8.032
3	3.722	19.668	10.568
4	2.575	12.565	10.495
5	1.733	13.357	9.235
Ort. \pm S.H.	2.766 \pm 0.386	16.837 \pm 1.592	9.487 \pm 0.474

- Akut kontrol ile akut hasarlı grup arasında anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).
- ENKH+akut hasarlı grup değeri akut kontrole göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.01$).
- Kök hücre tedavisinden sonra GPx aktiviteyi düşmüştür ($p < 0.01$).

Tablo XVIII. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların omurilik hasar bölgesindeki Ü/mg protein cinsinden GPx aktiviteyi ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	2.798	8.783	22.093
2	3.835	8.371	14.338
3	5.102	10.590	23.632
4	3.029	6.802	23.128
5	3.226	6.736	18.571
Ort. \pm S.H.	3.598 \pm 0.533	8.256 \pm 0.919	20.352 \pm 2.251

- Kronik hasarlı grupta kronik kontrole göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$).
- Kronik kontrol ile ENKH+kronik hasar arasında anlamlı bir artış vardır ($p < 0.01$).
- ENKH+kronik hasar değeri kronik hasara göre yüksektir ($p < 0.01$).



Şekil 32. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait omurilik hasarlı bölge dokusundaki GPx aktivitelerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

* Kronik hasarlı grup değerleri akut hasarlı gruba göre azalmıştır ($p < 0.01$).

** Kronik ENKH+hasarlı grupta akut tedavi grubuna göre artmıştır ($p < 0.01$).

3.7. Plazma TAK Düzeyleri

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre uygulanmış akut hasarlı grup ve ilgili kontrol gruplarının TAK düzeyleri Tablo XIX ve Şekil 33'te, kronik omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının düzeyleri ise (mmol trolox eşdeğeri/L) Tablo XX ve Şekil 33'te gösterilmiştir.

Tablo XIX. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH nakli yapılmış akut hasarlı grupların mmol trolox eşdeğeri/L cinsinden TAK düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

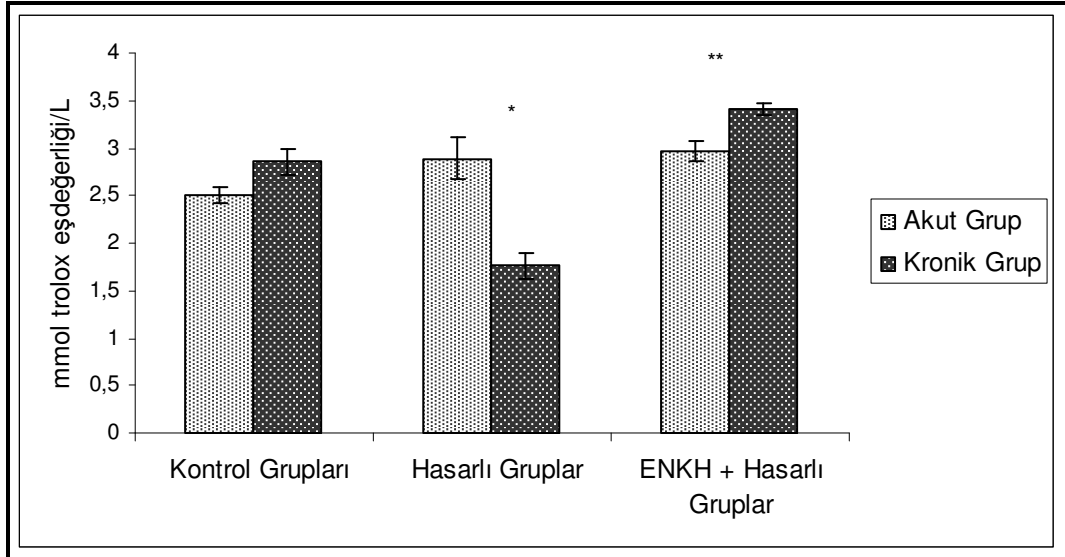
Örnek No	Akut Kontrol Grubu	Akut Hasarlı Grup	ENKH + Akut Hasarlı Grup
1	2.768	3.054	3.146
2	2.245	2.423	3.376
3	2.603	3.103	3.204
4	2.301	2.356	2.567
5	2.597	3.498	2.587
Ort. \pm S.H.	2.502 \pm 0.087	2.892 \pm 0.220	2.96 \pm 0.108

- Çalışma grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık yoktur.

Tablo XX. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların mmol trolox eşdeğeri/L cinsinden TAK düzeyleri ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu	Kronik Hasarlı Grup	ENKH + Kronik Hasarlı Grup
1	2.859	2.157	3.267
2	2.756	1.645	3.501
3	2.405	1.299	3.602
4	3.165	1.979	3.223
5	3.101	1.734	3.440
Ort. \pm S.H.	2.857 \pm 0.135	1.762 \pm 0.139	3.406 \pm 0.062

- Kronik hasarlı grup değerleri kontrole kıyasla düşmüştür ($p < 0.05$).
- Kök hücre tedavisi hasarlı gruba göre anlamlı bir artışa neden olmaktadır ($p < 0.05$).



Şekil 33. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait plazma TAK düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

* Kronik hasarlı grup değerleri akut hasara kıyasla düşmüştür ($p < 0.05$).

** Akut ENKH+hasarlı grupta kronik tedavi grubuna göre anlamlı bir düşüş vardır ($p < 0.05$).

3.8. Comet Yöntemi Sonuçları

Akut omurilik hasarlı grup, kök hücre uygulanmış akut hasarlı grup ve ilgili kontrol gruplarının comet parametreleri (baş ve kuyruk DNA'sı yüzdesi, kuyruk momenti) sonuçları Tablo XXI ve Şekil 34'te, kronik omurilik hasarlı, kök hücre nakli yapılmış kronik hasarlı ve kontrol gruplarının düzeyleri ise Tablo XXII ve Şekil 34'te gösterilmiştir. Comet skorları piksel birimi üzerinden hesaplanmaktadır.

Not: Piksel, kare şeklinde olan görüntünün en küçük birimidir ve dijital görüntüler yan yana gelen pikseller topluluğundan oluşmaktadır. Noktasal görüntü dosyaları için içerdiği piksel sayısı önemlidir.

Tablo XXI. Akut kontrol, akut hasarlı ve ENKH uygulanmış akut hasarlı grupların comet parametrelerine ait sonuçlar ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

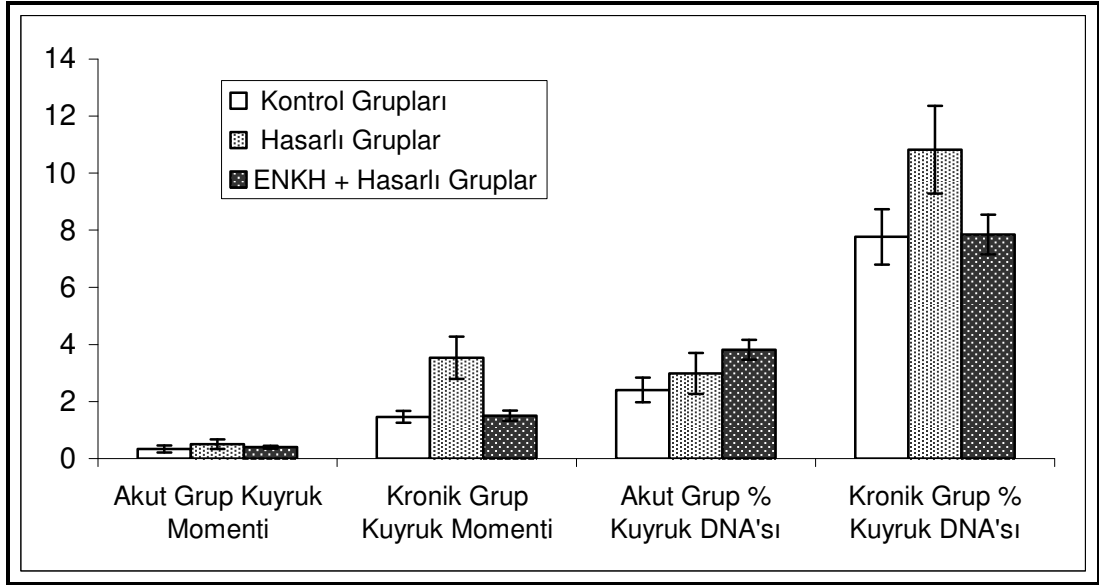
Örnek No	Akut Kontrol Grubu			Akut Hasarlı Grup			ENKH + Akut Hasarlı Grup		
	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti
1	98.937	1.064	0.117	97.393	2.607	0.499	94.857	5.143	0.444
2	98.073	1.927	0.206	96.936	3.064	1.081	96.886	3.114	0.307
3	96.355	3.645	0.821	98.351	1.649	0.230	96.156	3.845	0.336
4	97.242	2.758	0.207	98.094	1.906	0.132	96.473	3.527	0.579
5	97.375	2.625	0.321	94.302	5.698	0.595	96.556	3.444	0.335
Ort. \pm S.H.	97.596\pm0.432	2.404\pm0.432	0.334\pm0.125	97.015\pm0.722	2.985\pm0.722	0.507\pm0.166	96.186\pm0.351	3.815\pm0.351	0.400\pm0.050

- Çalışma grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanamamıştır.
- Her kan örneğinde ölçülen hücre DNA sayısı 10'dur. 10 ölçümün ortalaması bir kan örneğinin comet sonucunu verir.

Tablo XXII. Kronik kontrol, kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış kronik hasarlı grupların comet parametreleri sonuçları ve ortalama \pm S.H.'ları. \pm S.H.: \pm Standart Hata.

Örnek No	Kronik Kontrol Grubu			Kronik Hasarlı Grup			ENKH + Kronik Hasarlı Grup		
	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti	% Baş DNA'sı	% Kuyruk DNA'sı	Kuyruk Momenti
1	91.379	8.621	1.156	93.925	6.075	1.862	91.945	8.055	1.862
2	89.686	10.314	1.977	91.233	8.767	1.633	92.476	7.525	1.633
3	94.556	5.445	1.251	86.459	13.541	4.394	90.603	9.397	4.394
4	94.447	5.553	0.977	85.618	14.383	5.199	94.638	5.363	5.199
5	91.103	8.897	1.955	88.652	11.348	4.584	91.103	8.897	4.584
Ort.\pmS.H.	92.234\pm0.969	7.776\pm0.969	1.463\pm0.209	89.177\pm1.534	10.823\pm1.534	3.534\pm0.742	92.153\pm0.700	7.847\pm0.700	1.506\pm0.182

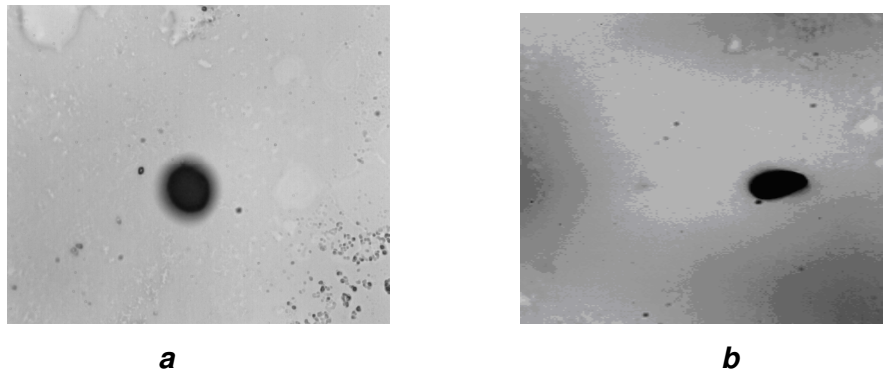
- Kronik hasarlı gruptaki **kuyruk moment**i değerleri kronik kontrole kıyasla artmıştır ($p<0.01$).
- Tedavi grubundaki kuyruk moment i değerleri hasarlı gruba göre anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.01$).
- Her kan örneğinde ölçülen hücre DNA sayısı 10'dur. 10 ölçümün ortalaması bir kan örneğinin comet sonucunu verir.



Şekil 34. Akut - kronik hasarlı ve ENKH uygulanmış hasarlı gruplar ile bu grupların kontrollerine ait kuyruk momenti ve % kuyruk DNA'sı düzeylerinin (ortalama \pm S.H.) dağılımı

- Kronik hasarlı grupların % kuyruk DNA'sı ve kuyruk momenti değerleri akut gruba göre anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.01$).
- Akut ile kronik ENKH+hasarlı grupların % kuyruk DNA'sı ve kuyruk momenti değerleri arasında anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0.05$).

Şekil 35'te oksidatif DNA hasarının comet yöntemi ile agaroz jel üzerinde kalitatif olarak belirlenmesinde kullanılan örnek mikroskop görüntüleri verilmiştir.



Şekil 35. Oksidatif DNA hasarının comet yöntemi ile agaroz jel üzerinde kalitatif olarak belirlenmesinde kullanılan örnek mikroskop görüntüleri. **a)** Kontrol grubu comet görüntüsü **b)** Kronik hasarlı grup comet görüntüsü

BÖLÜM IV

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

4.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Sayısı ile İlgili Tartışma

İncelenen literatürler ışığında, deney hayvanlarını seçerken iki önemli unsur üzerinde durulmuştur. Bunlardan birincisi, cinsiyettir ve bu çalışmada, dişi sıçanlar kullanılmıştır. Dişi sıçanların anatomik yapısı nedeniyle idrar yolları erkeklere göre daha kısadır ve mesanenin boşaltılması daha kolaydır. Bu nedenle, omurilik hasarından sonra mesane disfonksiyonuna bağlı olarak sıklıkla görülen idrar yolları enfeksiyonununa dişi sıçanların yakalanma riski daha azdır ve omurilik hasarı çalışmalarında erkek sıçanlara göre daha çok tercih edilmektedirler. İkinci önemli unsur ise sıçanların bulunduğu menstruasyon aşamasıdır. Sıçanlardaki menstruasyon döngüsü, dört gün sürmekte ve proestrus, estrus, metestrus (diestrus I) ve diestrus (diestrus II) olmak üzere dört farklı aşamadan oluşmaktadır. Östrojenin etkisi, estrus evresinde görülür ve daha önceki çalışmalarda bu dönemde artan östrojen düzeylerinin sıçanlarda biyokimyasal farklılıklara neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, omurilik hasarı uygulanmadan önce “smear testi” yapıp sıçanların hangi menstrüel aşamada olduğu saptanmıştır ve estrus dönemi haricindeki günlerde travmatik omurilik hasarı gerçekleştirilmiştir (44).

Omurilik hasarı ve kök hücre çalışmalarının deney aşamasında çeşitli nedenlerden dolayı hayvan kayıpları (enfeksiyon veya operasyon esnasındaki kayıplar gibi) olduğu için çalışmaya daha fazla deney hayvanı ile başlanmaktadır. Bu tip araştırmalar incelendiğinde, alt sınır olarak 5 sıçan kullanılmaktadır (50, 52).

Çalışmamızda grup sayısı çok olduğu için (altı grup) minimum hayvan sayısı seçilmiş ve her grupta 5 hayvan olacak şekilde toplam 30 adet Sprague-Dawley erişkin dişi sıçan kullanılmıştır.

4.2. Omurilik Hasarı Oluşturulmasına İlişkin Tartışma

Hayvan modellerine, omurilik hasarı üç farklı şekilde uygulanabilmektedir. Bunlardan birincisi, omurilik kompresyonu (klip kompresyon) ikincisi, omurilik kontüzyonu (ağırlık düşürme) sonuncusu ise omuriliğin tek taraflı kısmi kesilip çıkarılması (unilateral partial hemisection) ya da kısmi transseksiyon yöntemidir. Ancak hasarlı omuriliğe kök hücrelerin uygulandığı çalışmalarda, ENKH'lerin organizmanın kendi hücreleri ile iletişim kurması ve ortama adaptasyon sağlaması için kısmi transseksiyon yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca transseksiyon uygulanarak deney hayvanlarının omuriliğinin bir bölgesinin kısmi olarak çıkarılması ile insan omurilik yaralanmaları bulgularına yakın sonuçlar elde edilmektedir. (62, 106).

Ramon-Cueto tarafından yapılan bir çalışmada, T9 bölgesine transseksiyon uygulanıp nöral kök hücre nakli yapıldıktan sonraki 6. haftada aksonlarda rejenerasyonun gerçekleştiği gösterilmiştir (91). Lee ve çalışma grubu ise T9-T13 bölgelerini tek taraflı kısmi çıkardıktan sonraki 7. günde kök hücre transplantasyonu yapmış ve 4. haftadan sonra hasarlı bölgede nöron geliştiğini bildirmiştir (62). Çoğu araştırmada omuriliğin torakal bölgesi çalışma materyali olarak belirlenmiştir. Bu nedenle çalışmamızda, T8-9 bölgesinin tek taraflı kısmi kesilip çıkarılması suretiyle omurilik hasarı oluşturulmuştur (41, 90).

4.3. Deney Gruplarına İlişkin Tartışma

Birçok çalışmada, omurilik yaralanmalarından sonra örnek toplama işlemine 1. saatten itibaren başlanmakta ve 24. saatte son verilmektedir. Ancak, Vaziri ve

çalışma grubunun yaptığı çalışmada omurilik hasarından sonraki 16. saatte ve 2. haftada, Xu'nun çalışmasında 1, 3, 7, 14, 21, 28. günlerde, Lee ise, yaralanmadan 4 ay sonra topladığı örneklerde omurilik hasarının antioksidan enzimler ve NOS aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemiştir (62, 116).

Önceki omurilik yaralanması çalışmalarında daha çok akut omurilik hasarı üzerinde durulmuştur. Az sayıda kronik hasar çalışmasına rastlanmıştır. Omurilik hasarından sonra, antioksidan enzim tayinlerinin yapıldığı çalışmalar vardır ancak elde edilen sonuçlar birbirinden oldukça farklıdır (68, 85). Bu nedenle omurilik dokusunda oksidan/antioksidan enzimlerin yeniden ölçülmesinde yarar vardır.

Omurilik hasarından sonra kök hücre tedavisinin enzim aktivitelerini nasıl etkilediği yönünde bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmamızda kök hücre transplantasyonunun akut ile kronik hasarlı sıçanlardaki doku antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, GPx, CAT), NOS aktivitesi ve NO düzeyleri ile, kanda oksidatif DNA hasarı ve plazma TAK üzerindeki etkilerini incelemeyi uygun bulduk. DNA hasarı ve TAK düzeylerini ölçme amacımız, hasar sonrası sıçanlardaki genel antioksidan durumu değerlendirmektir. Anlatılan bu amaçlar doğrultusunda deney hayvanları altı gruba bölünmüştür. Kronik süreç 28 gün ve akut süreç ise 7 gün olarak tasarlanmıştır. Kök hücre tedavisi yapılan gruplara omurilik hasarı uygulandıktan sonraki 9. günde ENKH tansplante edilmiştir. Kök hücre uygulamasının omurilik hasarının 7-10. günlerinde yapılması nöral yenilenmeyi arttırmakta ve ENKH'lerin ortama uyumu daha kolay olmaktadır (93). Omurilik hasarından 9 gün sonra hasar bölgesindeki inhibitör etmenlerin ortadan kalktığı ve sıçan ENKH'lerinin naklinden sonra bu hücrelerin astrosit, oligodentrosit ve nöronlara farklılaştığı gösterilmiştir (76, 84).

Omurilik hasarının tedavisi için embriyonik kök hücrelerin yanı sıra erişkin kök hücreler de kullanılmaktadır. Örneğin, Gorio ve çalışma grubu sıçanlardan izole ettikleri deri hücrelerini omurilik hasarlı sıçanlara naklettikten sonra iyileşmenin olduğunu gözlemişlerdir (35). Deng ve arkadaşları Rhesus maymunlarının kemik

iliğinden elde ettikleri mezenkimal kök hücreleri omurilik hasarı oluşturulmuş maymunların tedavisinde başarı ile kullanmışlardır (25). Ayrıca, post-mortem dokulardan, schwann hücrelerinden, olfaktor glial hücrelerden ve yetişkin nöral prekürsörlerden elde edilen kök hücreler de omurilik hasarında kullanılmaktadır (81). Ancak, omurilik hasarları için son yıllarda üzerinde en çok durulan ve umut verici olarak görülen kök hücre türü ENKH olarak kabul edilmiştir. ENKH'lerin transplantasyonu sonucu, sinir hücrelerinin aksonlarındaki miyelin kılıfın daha sağlıklı geliştiği ve nöron kayıplarının daha az olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, çalışmamızda embriyonik nöral kök hücre kullanımı tercih edilmiştir (82).

4.4. Çalışma Materyalinin Seçimi ve Saklama Koşullarına Yönelik Tartışma

Çalışmamızda, deney hayvanlarından total kan ve omurilik hasarlı bölge dokuları alınmıştır. Total kanın, 100 µl'si kryovialdeki 100 µl flash-freezing çözeltisi ile karıştırılıp sıvı azot tankında hızla donması sağlanmıştır. Bu işlem hücre ve DNA'nın bütünlüğünün optimum düzeyde kalması için gereklidir (42). Daha sonra kan örnekleri comet yönteminin uygulanacağı güne kadar -80°C'de saklanmıştır.

Hininger ve araştırma grubunun yaptığı bir çalışmada, comet yöntemi için toplanan ve flash freezing çözeltisi ile dondurulup -80°C'de saklanan tam kan örnekleri ile aynı deney materyalinden elde edilen taze tam kan örneklerine comet yöntemi uygulanmış ve her iki grupta birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir. Dondurulmuş kan örneklerinde hücrelerin canlılığını saptamak amacıyla trypan blue ile test edilmiş ve % 85'ten daha yüksek oranda hücrelerin canlılıklarını korudukları gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada kan örneklerinin -80°C'de 4 ay saklanabileceği bildirilmiştir (40).

Comet analizinde biyolojik materyal olarak genellikle lenfosit izole edilmekte ve DNA hasarı ölçülmektedir. Lenfosit izolasyonu için, birçok ayırım protokolüne ve kimyasal maddeye ihtiyaç vardır. Bu nedenle çalışmamızda, kandan lenfosit

izolasyonuna gerek kalmadan lenfosit verilerine yakın sonuçların elde edildiği tam kan comet yöntemi uygulanmıştır. Böylece, her örneğin ölçümü için maliyet ve zaman azalmıştır. Ayrıca çok küçük miktarlardaki kan örneği comet için yeterli olmaktadır (20).

Çalışmamızda, hasarlı omurilik dokusu kuru ve boş ependorflara alınıp, enzim tayinleri için -80°C 'de saklanmıştır. Enzimler protein yapısında olduğu için düşük sıcaklıklarda bozunmadan saklanabilmektedir. Ancak aktivite tayinleri yapılmadan önce örnekler, enzimin aktif olduğu sıcaklığa kadar hızlı bir şekilde ısıtılmalı daha sonra ölçüm alınmalıdır.

4.5. Yöntemlere İlişkin Tartışma

4.5.1. NO, NOS Tayin Yöntemlerine İlişkin Tartışma

NO tayini, damar endoteli ve SSS başta olmak üzere birçok dokuda spektrofotometrik yöntemler kullanılarak yapılmaktadır. Serbest radikal olan NO, oksijenli ortamlarda stabil değildir ve spontan olarak moleküler oksijen ile reaksiyona girerek çeşitli nitrojen oksit ürünlerine dönüşmektedir. Oluşan ürünlerden en stabil olanlarının nitrat ve nitrit olduğu gösterilmiştir (38).

Nitrat ve nitrit üzerinden Griess ayracı kullanılarak spektrofotometrik olarak NO tayini yapmak ucuz, hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda da bu yöntem tercih edilmiştir. Fluorimetrik teknikler de NO tayini için kullanılmaktadır. Örneğin, diaminonaftalen yönteminde aromatik diamino bileşiği olan 2,3-diaminonaftalen (DAN) NO sentezinin indikatörü olarak kullanılmaktadır. Non-fluoresan DAN bileşiği ortamdaki NO'nin okside ürünlerine dönüşmesi sonucunda fluoresan özellikteki 2,3-naftotriazol (NAT)'e çevrilerek bu bileşik üzerinden NO miktarı tayin edilir. Ancak fluorometrik yöntemler pahalı olduğu için fazla tercih edilmemektedir. Ayrıca laboratuvarımızda bulunan mikropilaka

okuyucusu kullanılarak hızlı ve güvenilir bir tayin yapılabileceği için NO düzeyleri çalışmamızda, kit kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (104).

NOS aktivitesi tayini, tepkime ürünü olan NO'nin sulu çözeltilerdeki türevleri (nitrat, nitrit) üzerinden Greiss ayracı kullanılarak yapılabilmektedir. Çalışmamızda bu yöntemi esas alan kit kullanılarak total NOS aktivitesi tayin edilmiştir. Böylece aynı prensibe dayanan tekniklerle mikropilaka okuyucusu kullanılarak NO ve NOS tayini yapılmıştır. NOS ekspresyonu üzerinden de NOS aktivitesi hakkında bilgi sahibi olmak mümkündür. Yaptığımız araştırmalarda daha çok NOS ekspresyonunun çalışıldığı görülmüştür (103).

NOS tayini için kullanılan bir yöntem daha kullanılmaktadır. Bu yöntemde incelendiğinde öncelikle kolon kromatografisi ile (diaminoetil kolonu) enzim kısmi saflaştırma basamaklarından geçirilip, Dowex AG50WX-8 gibi jeller ile doldurulmuş kolonlara tatbik edilmiştir. İşaretleme yapıldıktan sonra da "Liquid Scintillation Spectroscopy"de [H^3]-sitrülin veya [H^3]-arjinin ölçümü üzerinden aktivite tayini yapılmaktadır (38). Görüldüğü üzere bu yöntem oldukça kompleks olup, ayrıca spesifik aletler gerektirmektedir.

4.5.2. Antioksidan Enzimlerin Tayin Yöntemine İlişkin Tartışma

Antioksidan enzimler SOD, CAT, GPx'tir ve aktiviteleri genellikle absorbansta meydana gelen artış veya düşüşten hareketle spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilir. Ayrıca enzim ekspresyonlarına bakılarak da aktiviteleri hakkında fikir sahibi olmak mümkündür.

Son yıllarda SOD aktivitesi tayini için birçok teknik geliştirilmiştir. Kostyuk ve çalışma grubunun SOD aktivite tayini için geliştirdikleri ilk yöntemde ksantin ksantin oksidaz ile tepkimesinden oluşan süperoksit radikalinin SOD varlığında ortamdaki uzaklaştırılması sonucunda adrenalinin oto-oksidasyonunun inhibisyonu üzerinden SOD aktivitesi tespit edilir. Başka bir teknikte adrenalini yerine nitroblue

tetrazolyum (NBT) kullanılmıştır. Diğer bir yöntem ise SOD aktivitesinin TMEDA (N, N, N', N',-tetrametiletilediamin) ve EDTA'nın bulunduğu pH'ı 10 olan bir ortamda kuersetinin oto-oksidasyonunun 406 nm dalga boyundaki inhibisyonu üzerinden tayini prensibine dayanır (59). Çalışmamızda ise INT'nin oksidasyonunun 505 nm dalga boyundaki inhibisyonu üzerinden SOD aktivitesi tayin edilmiştir.

CAT tayini, birçok çalışmada Aebi'nin geliştirdiği teknik üzerinden yapılmaktadır. Bu, H₂O₂'in katalaz enzimi tarafından parçalanması sonucu 240 nm dalga boyunda absorbansta meydana gelen düşüş üzerinden enzimin aktivite tayinini yapan kolorimetrik bir yöntemdir. Çalışmamızda da bu yöntem kullanılmıştır. 1 ünite CAT, dakikada 1 µl H₂O₂'yi parçalayan enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır (1).

GPx aktivitesi çalışmamızda, glutatyon ve NADPH'ın katıldığı reaksiyonlar sırasında 340 nm dalga boyundaki absorbansta zamana bağlı olarak görülen düşüşten hareketle indirekt olarak tayin edilmiştir. Bir başka kolorimetrik yöntem, glutatyon geri dönüşümü prensibine dayanır. Örneklerin sitozolik fraksiyonu izole edildikten sonra NADPH ve 2-dinitrobenzoik asit içeren fosfat tamponunda 37°C'de 25 dk. inkübasyon yapılır. Ortama glutatyon eklenmesi ile 412 nm'de absorbanstaki artış üzerinden GPx aktivitesi belirlenir. Yönteme bağlı olarak spektrofotometredeki dalga boyu farklılık göstermektedir (100).

4.5.3. Plazma TAK Tayin Yöntemine İlişkin Tartışma

TAK tayini kolorimetrik, fluoresans, kemilüminesans yöntemler kullanılarak yapılabilmektedir. Ancak fluoresans ve kemilüminesans teknikleri pahalı olduğu ve rutin çalışmalara elverişli olmadıkları için çoğunlukla spektrofotometrik yöntemler tercih edilir.

TAK tayini için en çok kullanılan radikallerden biri ABTS^{•+} olup, bu radikalın kolorimetrik ölçümü iki farklı şekilde uygulanmaktadır. Birinci yöntemde, iki ayrı

belirteç kullanılmaktadır. İlk belirteç ABTS ve metmiyoglobulinden ikincisi ise H_2O_2 'den oluşur. Örnek birinci belirtece eklendikten sonra ikinci belirtecin ortama ilave edilmesiyle ferrimiyoglobulin radikali sentezlenir, bu radikal de ABTS'yi oksitleyerek mavi-yeşil renkteki $ABTS^{•+}$ radikaline dönüştürür. Analiz edilecek örnekteki antioksidanlar renk oluşumunu engelleyerek absorbansta azalmaya neden olur. İkinci yöntemde, ABTS'nin potasyum persülfat, mangan dioksit ve 2,2'-azo-bis (2-aminopropan)dan birisi ile oksidasyonu sonucu $ABTS^{•+}$ radikali sentezlendikten sonra ortama analizi yapılacak örnek ilave edilir. Bu yöntem daha güvenilir olduğu için çalışmamızda tercih edilmiştir. TAK tayini için kullanılan bir diğer yöntem FRAP (ferric reducing/antioxidant power: ferrik redükte edici antioksidan güç)'dir ve plazmanın demiri indirgeme kapasitesi üzerinden TAK değerlendirilir. FRAP ile, proteinlerin antioksidan kapasitesi sağlıklı değerlendirilemediği için protein yapısında olmayan plazma antioksidanlarının analizi için kullanılmaktadır (30).

4.5.4. Comet Yöntemine İlişkin Tartışma

Comet yöntemi oksidatif DNA hasarı ve DNA tamir mekanizmalarındaki bozukluklar sonucu oluşan zincir kırıkları gibi DNA hasarlarının derecesinin değerlendirilmesinde kullanılan güncel bir tarama yöntemidir. DNA hasarını saptamadaki yüksek hassasiyeti, çok çeşitli hücrelerle çalışılabilir olması, az sayıda hücrenin yeterli olması comet yönteminin avantajlarından. DNA hasarına yol açan ajanların erken biyolojik etkilerini belirlemek için de kullanılmaktadır (21).

Comet yönteminde; zaman, sıcaklık, ışık gibi faktörler DNA'da hasara neden olabileceğinden çalışma materyali ile kısa sürede, soğukta ve ışıktan korunarak çalışılmalıdır. Bu nedenle, çalışmamızda lamları bekletme işlemleri buzdolabında karanlıkta yapılmış, elektroforez basamağı ise tankın üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak gerçekleştirilmiştir ve preparatlar mümkün olduğunca ışıktan uzak tutulmuştur. Comet yöntemi tam kanda yapılacağı gibi omurilik dokusunda da

gerçekleştirilebilir. Ancak çalışmamızdaki amaç, omurilik hasarının DNA yapısı üzerindeki bölgesel etkilerini değil de sistemik etkilerini araştırmak olduğu için deney materyali olarak tam kan kullanılmıştır. Hücrelerin parçalanarak organellerinden arındırılması ve çekirdeğin izole edilmesi için lamların lizis çözeltisine maruz kaldıkları süre çok önemlidir (5).

Comet yönteminde, elektroforezden sonra lamlar nötralize edilip boyama basamağına geçilir. Bunun için propidyum iyodür, etidyum bromür gibi fluoressans boyalar kullanılabileceği gibi gümüş boyama tekniği de tercih edilmektedir. Hem Nadin hem de Silvina'nın bağımsız yaptıkları çalışmalarda gümüş boyama ile fluoressan boyama tekniği karşılaştırılmış ve comet parametrelerinin birbirlerine yakın olduğunu gösterilmiştir. Fluoressan boyama daha hızlı bir teknik olmasına karşın kullanılan boyaların kanserojen olması ayrıca fluoressan mikroskobu gerektirmesi dezavantajlarıdır. Gümüş boyaması ise fazla sayıda işlem basamağı içermesine rağmen, ışık mikroskobu ile görüntü alındığı için ucuz, hassas ve güvenilir bir tekniktir. Ayrıca gümüş boyamasından sonra imajlar uzun süre saklanabilmektedir (83). Bu yüzden çalışmamızda gümüş boyaması yapılmıştır.

Bazı çalışmalarda mikroskop görüntüleri software kullanılmadan çıplak göz ile ölçülerek sayılmaktadır. Bunun için geliştirilmiş comet görüntü kategorileri vardır ve 1'den 4'e kadar "arbitrary ünitesi" şeklinde numara verilir. Deneyi yapan kişi subjektif olarak belli sayıda hücre sayımı yaparak karara varır. Daha objektif ve sayısal değerlerin elde edilmesini sağlayan ve daha net veriler ortaya koyan software programları da vardır. Çalışmamızda da CASP (Comet Assay Software Programme) programı kullanılmış, her örnek için 10 hücre ölçümü yapılmış ve her örnek iki kere çalışılmıştır. Comet parametrelerinden sıklıkla kullanılanları kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruk DNA yüzdesidir. Çalışmalarda, en çok kuyruk momenti üzerinden değerlendirme yapılır ve bu değer 2.5'in üzerinde olması DNA hasarının çok yüksek olduğunun göstergesidir (115).

DNA hasarını belirleyen birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan biri de mikro-FADU (Fluorometric DNA Unwinding Analysis)'dur ve comet yöntemine benzerlik göstermektedir. Her iki teknik de DNA hasarı ve tamir yeteneğinin hızlı tayini için geliştirilen yöntemlerdir. Bu iki yöntem de uygun denatüre edici şartlar altında DNA'da oluşan zincir kırıklarının saptanması temeline dayanmaktadır. Ancak comet fluorometrik ya da spektrofotometrik, FADU ise spektrofluorometrik bir yöntemdir. Comet yönteminde kuyruk momenti ve uzunluğu değerlendirilirken, FADU da ise floresans miktarındaki değişim belirlenmektedir. Son yıllarda DNA baz analizlerinin yapıldığı HPLC (yüksek basınçlı sıvı kromatografisi) yöntemi DNA çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu kromatografik yöntemde idrar örnekleri çalışılmakta, plazma ve doku örneklerinin ise kromatografiye uygulanmasından önce, kapsamlı bir ön hazırlık gerekmektedir. HPLC'nin en büyük avantajı, DNA hasarının baz düzeyinde tayinine olanak sağlaması, hızlı ve güvenilir bir yöntem olmasıdır. HPLC ve mikro-FADU gibi teknikler pahalı olması ve uzun zaman gerektirmesi nedeniyle çalışmamızda comet yöntemi üzerinden DNA hasarı tayin edilmiştir (108).

4.6. Bulgulara Yönelik Tartışma

4.6.1. NO ve NOS Düzeylerine Yönelik Tartışma

Akut hasarlı grupta NO düzeyleri kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Akut hasarın kök hücre tedavisinden sonra, NO düzeyi artmaya devam etmiştir ($p<0.01$). Kronik hasarlı dokunun kontrollere kıyasla NO düzeyi yükselmiştir ($p<0.01$), kök hücre uygulamasından sonra ise NO düzeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.05$). Yine de kronik kontrol grubuna kıyasla yüksektir ($p<0.01$). Akut ve kronik hasarlı gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kronik hasardaki NO düzeyi daha yüksektir ($p<0.01$). Kronik hasarın kök hücre ile

tedavisinden sonraki NO değerleri akut tedavi grubuna göre anlamlı derecede düşüktür ($p<0.01$). Çalışmamızda, akut ile kronik hasarlı grup NO düzeyleri için Pearson korelasyon katsayısı $r= 0.505$ olarak bulunmuştur.

Hamada ve arkadaşları, hasarlı sıçan omuriliğinde hasarın hemen ardından NO düzeylerini ölçmüş ve kontrol grubuna göre arttığını göstermişlerdir (39). Liu ise sıçanlarda ağırlık düşürme yöntemi ile oluşturduğu omurilik hasarından hemen sonra dokudaki NO düzeylerinin arttığını bildirmiştir. Çalışmamız, nceki araştırmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir (68).

Akut hasarda, kontrol grubuna kıyasla NOS aktivitesi anlamlı bir şekilde artmişken ($p<0.05$), kök hücre implantasyonundan sonra azalmıştır ($p<0.05$). Akut kontrol grubu ile tedavi olmuş akut hasarlı grup arasında ise istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Kronik kontrole kıyasla, kronik hasar grubunda NOS aktivitesi anlamlı bir şekilde yükselmiştir ($p<0.05$) ve kök hücre naklinden sonra NOS aktivitesi artmaya devam etmiştir ($p<0.01$).

Akut hasarlı grupta NOS aktivitesi kronik gruba göre istatistiksel açıdan yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak akut hasarlı gruba kök hücre tranplantasyonundan sonra kronik tedavi grubuna kıyasla aktivitede azalma görülmüştür ($p<0.01$).

Diaz-Ruiz ve arkadaşları, sıçanlarda oluşturulan travmatik omurilik hasarının 4. ve 8. saatinde NOS aktivitesinin kontrole göre arttığını bildirmiştir (26). NOS aktivitesi, omuriliğin hasar gören bölgesine göre de farklılık göstermektedir. Bir çalışmada, sıçanların T8-10 bölgesine yapılan kronik (6 haftalık) omurilik hasarından sonra NOS aktivitesinde artış, L5-S1 bölgesinin kronik hasarından sonra ise azalma gözlenmiştir (17).

Çalışmamızda, NO ve NOS seviyeleri arasındaki korelasyon katsayısı akut hasarlı grupta $r= 0.691$, kronik hasarlı grupta ise $r= 0.745$ olarak hesaplanmıştır.

Düşük konsantrasyonlardaki NO sinir sisteminde, nöroprotektif ve nörotransmisyonu düzenleyici etkilerde bulunur ancak omurilik hasarı, Parkinson ve

Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda NOS aktivitesi artmıştır ve NO yüksek miktarda sentezlenir. Böylece, azot kaynaklı pek çok serbest radikal de nörodejenerasyonun artmasına katkıda bulunmaktadır. Artan NO ve NOS düzeylerinin ise dokularda nörodejeneratif etkileri vardır (62). Bu etkilerini serbest radikallerle birlikte hareket ederek hücrelerde DNA hasarına, sitotoksositeye, nekroza ve apoptosise neden olarak gösterirler. Bu durum, NO ve NOS'un omurilik hasarının patogenezinde rolü olduğunu kanıtlamaktadır.

4.6.2. Antioksidan Enzim Aktivitelerine Yönelik Tartışma

SOD aktivitesi, akut hasardan sonra tedavi edilen grupta kontrol grubuna kıyasla yükselmiştir ($p < 0.05$). Kronik kontrol, kronik hasar ve tedavi gruplarının SOD aktiviteleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$).

Sıçanlardaki omurilik hasarından sonraki ilk iki gün içinde lezyonda SOD aktivitesinin değişmediği Taşkıran ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (105). Lee ve çalışma grubu omurilik hasarından sonraki 1. günden 4. aya kadarki takip çalışmalarında sıçanların omurilik lezyon bölgesinde SOD aktivitesinin değişmediğini gözlemlemişlerdir (62). Kaynar'ın yaptığı bir çalışmada sıçanların omuriliğinin C7-T1 bölgesinde oluşturulan hasardan sonraki 1., 4. ve 24. saatlerde omuriliğin lezyon, caudal ve rostral bölgelerindeki SOD aktivitesi karşılaştırılmış ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (52).

NO ve SOD seviyeleri arasındaki Pearson korelasyon katsayısı akut hasarlı grupta $r = -0.981$, kronik hasarlı grupta $r = -0.956$ 'dır yani SOD aktivitesi ile NO düzeyleri arasında ters orantı bulunmaktadır. Çalışmamızda, SOD enzim aktivitesi yeterli şekilde yükselmediği için, ortamdaki süperoksit anyonu ortamdaki güçlü bir şekilde uzaklaştırılmamış ve NO'nun büyük bir kısmı peroksinitrite dönüşerek lezyon bölgesinde nörotoksik etkiyi arttırmıştır.

Akut ve kronik hasarlı gruplar kendilerine ait kontrol gruplarına göre anlamlı bir şekilde yüksek katalaz aktivitesine sahiptir ($p<0.01$). Hem akut hem de kronik gruba uygulanan kök hücre tedavisi katalaz aktivitesini daha da yükseltmiştir ($p<0.01$). CAT aktivitesi için akut hasarlı grup ile kronik hasarlı grup arasında korelasyon katsayısı $r= 0.565$, akut kök hücre tedavisi görmüş grup ile kronik tedavi grubu arasında $r= 0.738$ hesaplanmıştır.

Sıçanların T10 omuriliğinde travmatik hasar yapılan bir çalışmada, hasarın 1., 4., 24. saatlerinde CAT aktiviteleri incelenmiştir. Buna göre CAT aktivitesinin 1. saatte kontrolden farksız olduğu ancak zamanla arttığı görülmüştür (8). Bizim çalışmamızda ise hem akut hem de kronik hasarda CAT aktivitesi yüksek bulunmakla birlikte, iki grup arasında CAT aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Lee'nin çalışmasında, sıçanlar kontrol grubu, omurilik hasarlı grup ve nöron nakli yapılmış hasarlı grup olarak üçe ayrılmış, CAT aktivitesinin 4. ayın sonunda hasarlı ve tedavi edilmiş gruplarda sırasıyla arttığı gözlenmiştir (62).

Akut kontrole göre, akut hasarda GPx aktivitesi artmıştır ($p<0.01$). Kök hücre tedavisi yapılması bu grupta GPx aktivitesini azaltsa da akut kontrollere göre anlamlı derecede yüksek GPx aktivitesi bulunmaktadır ($p<0.01$). Kronik hasar grubu ve tedavi edilmiş kronik hasarlı grubun GPx aktivitesi kontrollerine kıyasla sırasıyla anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$ ve $p<0.01$). Kök hücre tedavisi de kronik hasarlı gruptaki aktiviteyi arttırmaktadır ($p<0.01$).

Kronik omurilik hasarından sonra GPx aktivitesi akut hasara kıyasla anlamlı bir şekilde azalmaktadır. Kök hücre nakli ise tam tersi etki yaparak kronik grupta akut tedavi grubuna göre aktiviteyi arttırmaktadır.

Lee'nin çalışmasında da kronik dönemde GPx aktivitesi hasarlı grupta kontrole göre artmakta ve bu artış nöron nakledilmiş grupta da devam etmektedir. (62). Vaziri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanlarda omuriliğin T8 bölgesinin kısmi transeksiyonundan sonraki ilk günde GPx ekspresyonunun değişmediği 14. günde ise kontrole göre anlamlı bir şekilde arttığı bildirilmiştir (111).

Yaptığımız araştırmalar sonucunda ve çalışmamızda omurilik hasarından sonra antioksidan enzim aktivitelerinde farklılıkların oluştuğu gözlenmiştir. SOD aktivitesi fazla etkilenmezken hasar ve kök hücre nakli CAT ve GPx aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Genel tablo itibariyle hem akut hem de kronik omurilik hasarına bağlı olarak salınan reaktif oksijen ürünlerinin artışını kompanse etmek amacıyla antioksidan enzim aktivitesi hasar bölgesinde artmaktadır.

4.6.3. Plazma TAK Tayini Bulgularına Yönelik Tartışma

Akut kontrol grubu, akut hasar grubu ve ENKH uygulanmış akut hasarlı grubun TAK düzeyleri karşılaştırılmış ve aralarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0.05$). Kronik hasarlı grubun TAK düzeyleri akut hasara kıyasla düşüktür ($p<0.05$). Kronik hasarın kök hücre ile tedavisinden sonra ise akut tedavi grubuna göre anlamlı bir artış bulunmuştur ($p<0.05$). Kronik hasarlı sıçanlarda kontrole kıyasla antioksidan kapasite anlamlı bir şekilde düşmüştür ($p<0.05$). Kök hücre tedavisinden sonra ise bu düşme normal düzeylerine geri dönmüştür ($p<0.05$). Kronik dönemde omurilik hasarının TAK'ı azalttığı ancak hasardan sonraki kök hücre tedavisinin TAK'ı kontrol düzeylerine döndürdüğü söylenebilir.

Kocak ve arkadaşlarının kronik omurilik hasarlı insanlarda yaptığı çalışmada ortamdaki reaktif oksijen moleküllerinin artmasına bağlı olarak plazma TAK düzeylerinin kontrole göre azaldığı görülmüştür (56). Başka bir çalışmada, omurilik hasarlı insanlarda mesane disfonksiyonuna bağlı olarak TAK'ın nasıl etkilendiğine bakılmış, mesane disfonksiyonunun TAK'ı azalttığı bildirilmiştir (47).

Çalışmamızda ise, omurilik hasarından sonraki kök hücre tedavisinin plazma TAK düzeylerini nasıl etkilediğine bakılmış, akut dönemde bir farklılık görülmemiştir. Kronik dönemde ise kök hücre tedavisi alan grupta hasarlı gruba göre artış bulunmaktadır. Bu nedenle, kök hücre tedavisinin kronik dönemde antioksidan kapasite üzerinde olumlu etkiler yarattığı düşünülebilir. Ancak kök hücrelerin kronik

hasarda hangi mekanizma üzerinden bu etkiyi yaptığına dair daha kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

4.6.4. Comet Yöntemi Sonuçlarına İlişkin Tartışma

Akut kontrol, hasarlı ve tedavi görmüş grup kuyruk momenti değerleri bakımından karşılaştırılmış aralarında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Kronik hasarlı sıçanların comet kuyruk momentleri kontrollerine göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). ENKH tansplante edilmiş grubun kuyruk momenti hasarlılara göre 2.35 kat daha azalmıştır. Bu nedenle kronik omurilik hasarının sistemik DNA hasarı yaptığı ve kök hücre tedavisinin ise hücreleri DNA hasarından koruyucu rolünün olduğu söylenebilir. Ancak bu etkiler, yalnızca kronik grupta gözlenmiştir. Akut grupta ise anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

Akut ve kronik hasarlı gruplar, % kuyruk DNA'sı ve kuyruk momenti bakımından karşılaştırılmış ve her iki parametre de kronik hasarlı grupta yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Kronik hasara kök hücre naklinden sonra da kuyruk momenti ve % kuyruk DNA'sı değerleri akut gruba kıyasla artmakta ancak hasarlı grup değerlerine ulaşmamaktadır. ($p<0.05$). Kronik hasarlı grubun plazma TAK düzeyleri ile comet kuyruk momenti değerleri arasındaki korelasyon katsayısı $r = -0.880$ bulunmuştur. Plazma TAK ile DNA hasar düzeyleri arasındaki ilişkinin negatif olması, antioksidan kapasite yüksek iken DNA hasarının daha düşük olacağını göstermektedir.

Literatür taramalarında, omurilik hasarından sonra uygulanan kök hücre tedavisinin tam kandaki DNA yapısını hangi yönde etkilediğini comet yöntemi ile ölçen bir yayına ulaşılamamıştır. Ancak, Leski ve çalışma grubu, erkek sıçanlarda T13 bölgesindeki omurilik hasarının hemen ardından, hasarlı dokuda oksidatif DNA belirteci olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozinin (8-OHdG) HPLC ile analizini yapmışlar ve 8-OHdG/dG oranında artış gözlemişlerdir (65). Başka bir çalışmada sıçanlardaki

omurilik hasarından sonra comet yöntemi ile hasarlı dokuda DNA analizi yapılmış ve artan DNA hasarının hücrelerde apoptotik yolları indüklediği rapor edilmiştir (71).

Çalışmamızda DNA hasarı kanda araştırılmış ve akut hasara kıyasla kronik hasarda anlamlı DNA lezyonları görülmüştür. Bu nedenle, lokal omurilik travmasından sonra, zamana bağlı olarak kandaki oksidatif stresin de arttığı sonucuna varılabilir. Ancak bu mekanizmayı açıklayacak çalışmalara gereksinim vardır.

4.7. Omurilik Hasarı ve ENKH Uygulaması ile İlgili Tartışma

Omuriliğe transplante edilen hücrelerin birçoğu nöron, astrosit ya da oligodentrosit gibi omurilik hücrelerine dönüşmesi amaçlanan kök hücrelerdir. Bunun dışında yaralanma bölgesinde rejenerasyona destek verebilecek, nörotrofik faktörleri salgılayabilecek schwann hücresi ya da glial hücre transplantasyonu yapılabilir. Hasarlı bölgenin sağlıklı bir doku ile değiştirilmesi ise omurilik bütünlüğünün devamını sağlamak amacıyla canlı hücre miktarını arttırmaya yönelik yöntemlerdir.

McDonalds ve arkadaşları travmatik yaralanmadan 9 gün sonra, fare ENKH'lerini sıçan omuriliğine transplante etmiş ve bu hücrelerin hayatta kaldığını, astrosit, oligodentrosit ve nöronlara farklılaştığını göstermişlerdir (77). Nistar ise, insan ENKH'lerinin omuriliğe naklinden sonra oligodendrosite dönüşerek miyelinizasyon yaptıklarını göstermiştir (85). Lepore ve ark., nöral prekürsör hücrelerin SSS yaralanmasında ümit verici olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla servikal omurilik yaralanmasında nöral prekürsör hücreler uygulanmış, sonuçlar bu hücrelerin servikal kesi bölgesine ulaştığını ve nöron, astrosit ve oligodentrosite dönüştüğünü kanıtlamıştır (63). Koshizuka ve ark., hematopoetik kök hücrelerin nöral hücre serisine dönüştüğünü ve fare omurilik yaralanmasında klinik iyileşmeyi düzelttiğini göstermişlerdir (58). Kulbatski ve ark., omurilik yaralanmasında insana

transplante edilecek ideal hücrenin bölge spesifik nöral progenitör kök hücrelerin olması gerektiğini göstermişlerdir (61).

Omurilik yaralanmalarında rejenerasyon çalışmalarının yapıldığı hayvan deneylerinin sayısında son yıllarda hızlı bir artış vardır. Bazı kliniklerde, Faz 1 kontrolsüz insan çalışmaları da başlamıştır. Bu çalışmalarda bildirilen yöntemler ile bildirilen süre içinde hastalarda herhangi bir yan etki görülmediği ve yöntemlerin güvenli olabileceği bildirilmekte ancak tedavi gücü bakımından yeterli verinin olmadığı rapor edilmektedir (86).

Çalışmamızda, omurilik yaralanmalarında sekonder mekanizmalardan biri olan ve travmanın yayılması ve şiddetlenmesi aşamasında görev aldığı birçok bilimsel yayın tarafından kabul edilen oksidatif stres biyomarkırları araştırılmıştır. Bulgularımıza göre hasar sonrası oksidatif stres artmakta, ve kök hücre tedavisi de bu stresi azaltıcı yönde hareket etmektedir ancak bu etkilerinin hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirildiği aydınlatılmalıdır. Omurilik hasar bölgesine nakledilen ENKH'lerin lezyon bölgesindeki serbest radikal üretimini inhibe etme olasılığının araştırıldığı çalışmalar faydalı olacaktır. Ayrıca çalışmamız sayesinde, kök hücre uygulamaları ile birlikte antioksidan tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin, kök hücre tedavisinin başarısını arttırabileceğini söylemek mümkündür. ENKH tedavisinin, spesifik NOS inhibitörleri üzerindeki etkilerinin araştırılması da yararlı olacaktır

Birkaç yıl öncesinde omuriliğin gerçek tamiri (rejenerasyon) imkansız olarak görülürken; günümüzde hücre, hayvan, insan deney ve araştırmalarının sonuçları ümit vericidir. Ancak; bir yöntemin omurilik yaralanmasında standart tedavi olarak uygulanabilmesi için uzun süreli, kontrollü, çok merkezli çalışmalara gereksinim vardır. Bu araştırmalar, hasta ve yakınları ile paylaşılmadan önce kanıta dayalı, ispatlanabilir ve tekrarlanabilir özellikleri ile bilimsel ortamlarda tartışılmalıdır.

ÖZET

OMURİLİK HASARLI SIÇANLARDA EMBRİYONİK NÖRAL KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ENZİM AKTİVİTELERİ, TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE VE DNA HASAR DÜZEYLERİNE ETKİSİ

Kök hücreler, canlı vücudunda çok uzun süre bölünerek kendini yenileyen, aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklılaşarak bütün doku ve organları oluşturan hücrelerdir. Son yıllarda, nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok kronik hastalığın tedavisinde kök hücre kullanımına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda, omurilik yaralanmasında insana transplante edilecek ideal hücrenin embriyonik nöral kök hücre (ENKH) olduğu gösterilmiştir. Ancak, ENKH naklinin organizmanın biyokimyasal parametrelerinden olan oksidan/antioksidan enzim sistemleri ve DNA yapısı üzerinde ne gibi etkiler göstereceği bilinmemektedir.

Çalışmamızda, omurilik hasarının ve hasardan sonra yapılan ENKH naklinin kanda total antioksidan kapasite (TAK) ve DNA yapısı, hasarlı bölgedeki enzim aktiviteleri ve nitrik oksit (NO) düzeyleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, 30 tane dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan ile çalışılmış ve sıçanlar her grupta 5 hayvan olmak üzere altı gruba ayrılmıştır. İlk grup, kronik omurilik hasarı uygulanmış gruptur, hasardan sonra sıçanlar oda koşullarında 28 gün yaşatılmıştır. İkincisi, kronik omurilik yaralanmasından sonra ENKH ile tedavi edilmiş gruptur. Üçüncü gruptaki deney hayvanları omurilik yaralanmasından sonra 7 gün yaşatılmıştır yani akut hasar oluşturulan gruptur. Dördüncüsü, akut omurilik hasarının ardından ENKH nakli yapılan gruptur. Beşinci ve altıncı gruplar ise akut ve kronik kontrol gruplarıdır.

Bu gruptaki sıçanların omurilik bölgesi operasyonla açılıp hiçbir müdahale yapılmadan tekrar kapatılmıştır. Omurilik hasarı, torakal 8. ve 9. omurlar arasındaki bölgenin tek taraflı kısmi kesip çıkarılması sonucu (kısmi transseksiyon yöntemi) oluşturulmuştur.

Elde edilen omurilik hasarlı bölgesinde nitrozatif stres belirteci olan nitrik oksit (NO) ve nitrik oksit sentaz (NOS) aktiviteleri, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri ve sıçanların plazmalarında total antioksidan kapasite (TAK) ölçülmüş, tam kan örneklerinde ise comet yöntemi ile oksidatif DNA hasarı tayin edilmiştir.

Çalışmamızdaki bulgular ışığında, omurilik hasarının ve ENKH uygulamasının, NO ve NOS düzeylerini akut ve kronik dönemde arttırdığı söylenebilir. Omurilik yaralanmasının ve kök hücre tedavisinin SOD aktivitesi üzerinde bir etkisi olmadığı çalışmamızda gösterilmiştir. Katalaz aktivitesi ise akut ile kronik hasardan sonra kontrole göre artmakta ve bu artış ENKH uygulamasından sonra da devam etmektedir. Akut dönemde, kök hücre uygulaması GPx aktivitesini kontrole göre arttırmaktadır ancak hasarlı gruptaki aktivite daha yüksek bulunmuştur. Kronik grupta ise en yüksek GPx aktivitesine kök hücre tedavisinden sonra ulaşılmıştır. Comet yönteminde oksidatif DNA hasarının belirteci olan kuyruk momenti değerleri akut dönemde etkilenmemekte yani DNA hasarı görülmemektedir. Kronik dönemde ise hasar grubunun kuyruk momenti kontrole göre yüksek bulunmuş, bu gruba ENKH nakledildikten sonra düşme görülmüştür. ENKH uygulanmış kronik omurilik hasarlı gruptaki kuyruk momenti değerinin kontrol grubuna yakın olması, kök hücre tedavisinin oksidatif DNA hasarını önemli ölçüde engellediğinin bir göstergesidir. Ayrıca bu sonuçlar, plazma TAK düzeyleri ile uygunluk göstermektedir. Kronik hasarlı grubun TAK düzeyleri kontrollere göre düşüktür ve kök hücre tedavisinden sonra kontrol düzeyine ulaşmıştır. Akut grupta ise TAK düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

Sonuç olarak omurilik hasarının ENKH ile tedavisinin NOS, CAT, GPx aktivitelerini ve NO düzeylerini değiştirdiği fakat SOD aktivitesini etkilemediği söylenebilir. TAK düzeylerini ise kronik dönemde koruyarak oksidatif DNA hasarını engellediği anlaşılmıştır.

Omurilik bölgesindeki oksidatif/nitrozatif stres, omurilik hasarının patojenezinde önemli bir role sahiptir. ENKH transplantasyonu ise lokal antioksidan sistemleri aktive ederek hasarlı bölgedeki stresin belirli sınırlar içerisinde tutulmasına olanak sağlamaktadır. ENKH'lerin bu etkilerinin zamana bağlı olarak gerçekleştiğinin unutulmaması gerekmektedir. Ayrıca, ENKH tedavisinin, NOS inhibitrlerinin ve antioksidan enzimlerin omurilik yaralanmalarındaki etkilerinin incelendiği daha fazla alışmaya ihtiyaç vardır.

ABSTRACT

EFFECT OF EMBRYONIC NEURAL STEM CELL THERAPY ON ENZYME ACTIVITIES, TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY AND DNA DAMAGE LEVELS OF SPINAL CORD INJURY RATS

Stem cells are the cells that, renews themselves by dividing for a long time on living organisms, on the other side by differentiating as the necessity of organism they make new tissues and organs. In recent years, studies about the usage of stem cells for neurodegenerative diseases and the other chronic diseases are increasing. These studies shows that, the ideal cell for transplantation to the human injured spinal cord region is embryonic neural stem cell (ENSC). But, the effects of ENSC transplantation on biochemical parameters and on DNA structure of organism has not known yet.

In our study, we examined the effect of spinal cord injury and ENSC therapy on total antioxidant capacity (TAC) and DNA structure of blood, enzyme activities and nitric oxide (NO) levels of injured spinal cord region. For this reason, we studied with 30 Sprague-Dawley rats and the rats were divided into six groups, each contains five rats. Rats in the first group were applied chronic spinal cord injury, after the injury they lived 28 days in standart room contidions. The second group of the chronic spinal cord injury were therapied with ENSC. The rats in the third group were applied acute spinal cord injury and lived for 7 days in standart room contidions. The fourth group of the acute spinal cord injury were therapied with ENSC. The fifth, sixth group were acute and chronic sham operated groups. Spinal cord region of each rat in fifth and sixth group were opened with operation and

closed without injuring spinal cord. All of the rats in injured groups were applied spinal cord injury between thoracal 8 and 9 vertebrae by partial hemisection technique.

NO, the nitrosative marker and nitric oxide synthase (NOS) activities, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), the antioxidant enzyme activities were measured in spinal cord tissue. TAC levels studied in rat plasma, oxidative DNA damage measured by comet assay in rat total blood.

According to the results of our study, spinal cord injury and ENSC therapy increases NO and NOS levels in acute and chronic spinal cord injury groups. There is not any effect of spinal cord injury and ENSC therapy on SOD activities. CAT activity increased after acute and chronic injury and this elevation continues after ENSC therapy. In acute period, stem cell transplantation increases GPx activity compared to control group but GPx activities of spinal cord injury group were found higher than ENSC therapy group. In chronic period, the highest GPx activity was found in stem cell therapy group. Tail moment, the oxidative DNA damage marker of comet assay did not differ in acute period so acute injury does not effect DNA structure. In chronic injury group, tail moment levels were found higher than chronic sham operated group. After the ENSC transplantation to the chronic spinal cord injury rat, tail moment levels were significantly decreased. Tail moment levels of chronic ENSC therapy group were same as chronic control group so we can say that, ENSC therapy prevents DNA structure from oxidative damage. Also these results appropriate with TAC levels of plasma. In chronic injury group, TAC levels were lower than control and after ENSC therapy levels increased and became same as control levels. But there is no significantly differences between TAC levels of acute injury, ENSC therapied acute injury and acute control groups.

As a result we can say that, ENSC therapy of spinal cord injury effects NOS, CAT, GPx activities and NO levels but does not change SOD activities. This therapy

also prevents chronic injury group from oxidative DNA damage by elevating TAC levels.

Our data indicate that the presence of local oxidative/nitrosative stress which can contribute to the extension of the spinal cord injury. These results suggest that ENSC therapy enhances the local antioxidant defense system, which may help to limit oxidative stress-mediated damage in the acute and the chronic spinal cord injury. But we should not miss that ENSC therapy effects these parameters according to the time period. Finally, further studies are needed to explore the possible effects of ENSC transplantation with inhibitors of NOS or scavengers of their byproducts on progression of spinal cord injury.

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aebi, H. (1984). Catalase *in vitro*, Methods in Enzymol., 105: 121-126.
2. Agraval, S.K., Fehlings, M.G. (1996). Mechanism of secondary injury to spinal cord axons *in vitro*; role of Na, Na-K ATPaz, the Na-H and Na-Ca exchanger, J. Neurosci., 16: 545-552.
3. Agraval, S.K., Fehlings, M.G. (1997). The role of NMDA and non-NMDA ionotropic glutamate receptors in traumatic spinal cord axonal injury, J. Neurosci., 17: 1055-1063.
4. Agraval, S.K., Nashmi, R., Fehlings, M.G. (2000). Role of L and N type calcium channels in the pathophysiology of traumatic spinal cord white matter injury, Neuroscience, 99: 179-188.
5. Angelis, K.J., Dusinska, M., Collins, A.R. (1999). Single cell gel electrophoresis: detection of DNA damage at different levels of sensitivity, Electrophoresis, 20: 1923-1933.
6. Appelbaum, F.R. (2001). Haematopoietic cell transplantation as immunotherapy, Nature, 411: 385-389.
7. Attar, E. (2003). Hastalık modeli olarak transgenik fareler ve kök hücreler, Kalıtsal Hastalıklara Moleküler Tıp Açısından Bakış Sempozyumu, İstanbul, 167-178.
8. Azbill, R.D., Mu, X., Bruce-Keller, A.J., Mattson, M.P., Springer, J.E. (1997). Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury, Brain Res., 765: 283-290.
9. Barinaga, M. (2000). Fetal neuron grafts pave the way for stem cell therapies, Science, 287: 11-12.
10. Beckman, J.S., Koppenol, W.H. (1996). Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly, Am. J. Physiol., 271: 1424-1437.
11. Benzie, I.F., Szeto, Y.T., Strain, J.J., Tolinson, B. (1999). Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans, Nutr. Cancer, 34: 83-87.
12. Black, P., Markowitz, R.S., Cooper, V., Mechanic, A., Kushner, H., Damjanov, I., Finkelstein, S.D., Wachs, K.C. (1996). Models of spinal cord injury, Neurosurgery, 19: 752-762.

13. Bolanos, J.P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J.M., Clark, J.B., Heales, S.J. (1997). Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain mechanisms and implications for neurodegenerative diseases, *J. Neurochem.*, 68: 2227-2240.
14. Borgens, R.B., Blight, A.R., Murphy, D.J. (1999). Axonal regeneration in spinal cord injury: A prespective and new techique, *J. Comp. Neurol.*, 250: 157-167.
15. Bunge, R.P., Puckett, W.R., Beccera, J.L. (1993). Observations on the pathology of human spinal cord injury: A review and classification of 22 new cases with details from a case of chronic cord compression with extensive focal demyelination, *Adv. Neurol.* 59: 75-89.
16. Burns, A.S., Ditunno, J.F. (2001). Establishing prognosis and maximizing functional outcomes after spinal cord injury, *Spine*, 26: 137-145.
17. Callsen-Cencic, P., Mense, S. (1998). Changes in neuronal NOS-immunoreactivity in the rat lumbosacral spinal cord following spinal cord transection, *Ann. Anat.*, 180: 89.
18. Carroll, E. (1987). Oxygen radicals and human disease, *Ann. Inter. Med.*, 107: 526-545.
19. Cheung, L.P., Leung, H.Y., Bongso, A. (2003). Effect of supplementation of leukemia inhibitory factor and epidermal growth factor on murine embryonic development *in vitro*, implantation and outcome of offspring, *Fertil. Steril.*, , 80: 727-735.
20. Chuang, C.H., Hu, L.M. (2004). Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay, *Mutat. Res.*, 564: 75–82.
21. Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair, *Mol. Biotech.*, 26: 249-261.
22. Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R. (1997). The comet assay: What can it really tell us?, *Mutat. Res.*, 375: 183-193.
23. Cook, P.R., Brazell, I.A., Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA, *J. Cell Sci.*, 22: 303-324.
24. Daley, G.Q., Goodell, M.A., Synder, E.Y. (2003). Realistic prospects for stem cell therapeutics, *Am. Soc. Hematol.*, 34: 398-418.
25. Deng, Y.B., Yuan, Q.T., Liu, X.G., Liu, X.L., Liu, Y., Liu, Z.G., Zhang, C. (2005). Functional recovery after rhesus monkey spinal cord injury by transplantation of bone marrow mesenchymal-stem cell-derived neurons, *Med. J.* 118(18):1533-1541.

26. Diaz-Ruiz, A., Ibarra, A., Severiano, F.P., Sahagun, G.G., Grijalva, I., Rios, C. (2002). Constitutive and inducible nitric oxide synthase activities after spinal cord contusion in rats, *Neuro. Letters*, 319: 129-132.
27. Draper, J.S., Fox, V. (2003). Human embryonic stem cells: Multilineage differentiation and mechanisms of self-renewal, *Arch. Med. Res.*, 34: 558-564.
28. Dzierzak, E., Medvinsky, A., De Bruijin, M. (1998). Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo, *Immunol. Today*, 19: 228-235.
29. Elstner, E.F. (1991). Oxygen radicals-biochemical basis for their efficacy, *Klin. Wochenschr.*, 69: 949-956.
30. Erel, O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin. Biochem.* 37: 277–285.
31. Faulkner, J., Keirstead, H.S. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors for the treatment of spinal cord injury, *Transplant Immunology*, 15: 131-142.
32. Feron, F., Perry, C., Cochrane, J., Licina, P., Nowitzke, A., Geraghty, T., (2005). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human spinal cord injury, *Brain* (in press).
33. Fuchs, E., Segre, J.A. (2000). Stem cells: A new lease of life, *Cell*, 100: 143-155.
34. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Clin. Biochem.* 29 (11): 1106-1114.
35. Gorio, A., Torrente, Y., Madaschi, L., DiStefano, A.B., Pisati, F., Marchesi, C., Belicchi, M., DiGiulio, A.M., Bresolin, N. (2004). Fate of autologous dermal stem cells transplanted into the spinal cord after traumatic injury (TSCI). *Neuroscience*, 125: 179-189.
36. Goss, J.R., Taffe, K.M., Kochanek, P.M., DeKosky, S.T. (1997). The antioxidant enzymes glutathione peroxidase and catalase increase following traumatic brain injury in the rat, *Exp. Neurol.*, 146: 291-294.
37. Gottlieb, D.I., Huettner, J.E. (1999). An in vitro pathway from embryonic stem cells to neurons and glia, *Cells Tissues Organs*, 165: 165-172.
38. Grisham, M.B., Johnson, G.G., Gautreaux, M.D., Berg, R.D. (1995). Measurement of nitrate and nitrite in extracellular fluids: a window to systemic nitric oxide metabolism. *Methods in Enzymol.* 7:84.

39. Hamada, Y., Ikata, T., Katoh, S., Tsuchiya, K., Niwa, M., Fukuzawa, K. (1995). Roles of nitric oxide in compression injury of rat spinal cord, *Free Rad. Biol. Med.*, 20: 1-9.
40. Hininger, I., Namy, A.C., Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A., Roussel, A.M. (2004). Assessment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers, *Mutat. Res.*, 558: 75-80.
41. Hofstetter, C.P., Schwarz, E.J., Hess, D., Widenfalk, J., Manira, A.E., Prockop, D.J., Olson, L. (2002). Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99: 2199-2204.
42. Hu, M.L., Chuang, C.H., Sio, H.M., Yeh, S.L. (2002). Simple cryoprotection and cell dissociation techniques for application of the comet assay to fresh and frozen rat tissues, *Free Rad. Res.*, 36: 203-209.
43. Huang, E.P. (1997). Synaptic plasticity: A role for nitric oxide in LTP, *Curr. Biol.*, 7: 141-143.
44. Hubscher, C.H., Armstrong, J.E., Johnson, J.R. (2006). Effects of spinal cord injury on the rat estrous cycle, *Brain Res.*, 1100: 118-124.
45. Hulsebosch, C.E. (2002). Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury, *Adv. Physiol. Educ.*, 26: 238-255.
46. Imlay, J.A., Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity, *Science*, 240: 1302-1309.
47. Iyidogan, Y.O., Kocak H., Gurdol, F. Kocak T., Erol, B. (2004). Urine 8-isoprostane concentrations in patients with neurogenic bladder due to spinal cord injury, *Clin. Chim. Acta*, 339: 43-47.
48. Jeffery, N.D., Crang, A.J., Hodge, S.J., Blakemore, W.F. (1999). Behavioural consequences of oligodendrocyte progenitor cell transplantation into experimental demyelinating lesions in the rat spinal cord, *Eur. J. Neurosci.*, 11: 1508-1514.
49. Johanson, K.J., Ostling, O. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298.
50. Kalyaci, M., Coskun, O., Cagavi, F., Kanter, M., Armutçu, F., Gul, S., Acikgoz, B. (2005). Neuroprotective Effects of ebselen on experimental spinal cord injury in rats, *Neurochem. Res.*, 30: 403-410.
51. Karamehmetoglu, S.S., Unal S., Karacan I., Yilmaz H., Togay H.S., Ertekin M., Dosoglu M., Ziyal M.I., Kasaroglu D., Hakan T. (1995). Traumatic spinal cord

- injuries in Istanbul, Turkey: An epidemiological study, *Paraplegia*, 33(8): 469-71.
52. Kaynar, M.Y., Hanci, M., Kunday, C., Belce, A., Gumustas, K., Kokoglu, E. (1994). Changes in the activity of antioxidant enzymes (SOD, GPx, Cat) after experimental spinal cord injury, *Tokushima J. Exp. Med.*, 41: 133-136.
 53. Kilpatrick, T.J., Bartlett, P.F. (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation, *Neuron*, 10: 255-265.
 54. Klug, W.S., Cummings, M.R. (2002). *Genetik (Kavramlar)*, altıncı baskıdan çeviri. (Çev. Ed.: Öner C.), Palme Yayıncılık, Ankara 260-265.
 55. Kobzik, L., Reid M.B., Bredt D.S., Stamler J.S. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle, *Nature*, 372: 546-8.
 56. Kocak, H., Iyidogan, Y.O., Gurdol, F., Kocak, T., Esin, D. (2005). The relation between serum MDA and cystatin C levels in chronic spinal cord injury patients, *Clin. Biochem.*, 38: 1034-103.
 57. Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S., Cosic, V. (2001). Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids, *J. Clin. Pathol.*, 54: 356-361.
 58. Koshizuka, S., Okada, S., Okawa, A., Koda, M., Murasawa, M., Hashimoto, M., Kamada, T., Yoshinaga, K., Murakami, M., Moriya, H., Yamazaki, M. (2004). Transplanted haematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63:64-72.
 59. Kostyuk, V.A., Potapovich, A.I., Strigunova, E.N., Kostyuk, T.V. (2004). Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase, *Arch. Biochem. Biophys.*, 428: 204-208.
 60. Kröncke, K.D., Fehsel, K., Kolb-Bachofen, V. (1997). Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection-how, why, when and where? *Nitric oxide*, 1: 107-120.
 61. Kulbatski, I., Mothe, A.J., Nomura, H., Tator, C.H. (2005). Endogenous and exogenous CNS derived stem/progenitor cell approaches for neurotrauma, *Curr. Drug Targets*, 6:111-26.
 62. Lee, Y.S., Sindhu, R.K., Lin, C.Y., Ehdai, A., Lin, V.W., Vaziri, N.D. (2004). Effects of nerve graft on nitric oxide synthase, NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in chronic spinal cord injury, *Free Rad. Biol. Med.*, 36: 330-339.
 63. Lepore, A.C., Bakshi, A., Swanger, S.A., Rao, M.S., Fischer, I. (2005). Neural precursor cells can be delivered into the injured cervical spinal cord by intratecal injection at the lumbar cord, *Brain Res.* 1045: 206-216.

64. Lepore, A.C., Fischer, I. (2005). Lineage-restricted neural precursors survive, migrate, and differentiate following transplantation into the injured adult spinal cord, *Exp. Neurol.*, 194: 230-242.
65. Leski, M.L., Bao, F., Wu, L., Qian, H., Sun, D., Liu, D. (2001). Protein and DNA oxidation in spinal injury: Neurofilaments-an oxidation target, *Free Rad. Biol. Med.*, 30: 613-624.
66. Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99: 4391-4396.
67. Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nat. Genet.*, 11: 376-381.
68. Liu, S., Qu, Y., Stewart, T., Howard, M., Chakraborty, S., Holekamp, T., McDonald, J.W. (2000). Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 6126-6131.
69. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent, *J Biol. Chem.*, 193: 265-275.
70. Loy, D.N., Talbott, J.F., Onifer, S.M., Whittemore, S.R. (2002). Both dorsal and ventral spinal cord pathways contribute to overground locomotion in the adult rat, *Exp. Neurol.*, 177: 575-580.
71. Martin, L.J., Liu, Z. (2002). Injury-induced spinal motor neuron apoptosis is preceded by DNA single-strand breaks and is p53- and Bax-dependent, *J. Neurobiol.*, 50: 181-197.
72. Mates, J.M., Gomez, C.P., Castro, I.N. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases, *Clin. Biochem.*, 32: 595-603.
73. Mayer, M. (2000). Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease, *Clin. Chem.*, 46: 1723-1727.
74. McCord, J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant/ antioxidant balance, *Clin. Biochem.*, 26: 351-357.
75. McDonald, J.W., Becker, D., Sadowsky, C.L. (2002). Late recovery following spinal cord injury: case report and review of the literature, *J. Neurosurg.*, 97: 252-265.
76. McDonald, J.W., Howard, M.J. (2002). Repairing the damaged spinal cord: A summary of our early success with embryonic stem cell transplantation and remyelination, *Prog. Brain Res.*, 137: 299-309.

77. McDonald, J.W., Liu, X.Z., Qu, Y. (1999). Transplanted stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord, *Nat. Med.*, 5:1410-1412.
78. McDonald, J.W., Sadowsky, C. (2002). Spinal cord injury, *Lancet*, 359: 417-425.
79. McKay, R. (1997). Stem cells in the central nervous system, *Science*, 276: 66-71.
80. Mohamed, A.E., Mohamed, A.B., Farahat, E.S., Elsaid, A.A., Fattah, A.E. (2005). Glutathione peroxidase activity in patients with renal disorders, *Clin. Exp. Nephrol.*, 9: 127-131.
81. Murray, M., Fischer, I. (2001). Transplantation and gene therapy: combined approaches for repair of spinal cord injury, *The Neuroscientists*, 7: 28-41.
82. Myckatyn, T.M., Mackinnon, S.E., McDonald, J.W. (2004). Stem cell transplantation and other novel techniques for promoting recovery from spinal cord injury, *Trans. Immuno.* 12: 343-358.
83. Nadin, S.B., Laura, M.V., Ciocca, D.R. (2001). A silver staining method for single-cell gel assay, *J. Histochem. Cytochem.*, 49 (9): 1183-1186.
84. Nakamura, M., Houghtling, R.A., McArthur, L., Bayer, B.M., Bregman, B.S. (2002). Difference in cytokine gene expression profile between acutely and chronically injured adult rat spinal cord, *Exp. Neurol.*, 58: 489-498.
85. Nistor, G.I., Totoiu, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation, *Glia*, 49: 385-396.
86. Okano, H. (2002). Neural stem cells: progression of basic research and perspective for clinical application, *Keio J. Med.*, 51: 115-128.
87. Petersen, B.E., Terada, N. (2001). Stem cells: A journey into a new frontier, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 12: 1773-1780.
88. Pluchino, S., Zanotti, L., Deleidi, M., Martino, G. (2005). Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders, *Brain Res. Rev.*, 48: 211-219.
89. Pointillart, V., Petitjean, M.E., Wiart, L. (2000). Pharmacological therapy of spinal cord injury during the acute phase, *Spinal Cord*, 38: 71-76.
90. Ramon-Cueto, A., Cordero, M.I., Santos-Benito, F., Avila, J. (2000). Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia *Neuron*, 25: 425-435.
91. Ramon-Cueto, A., Plant, G.W., Avila, J., Bunge, M.B. (1998). Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants, *J. Neurosci.*, 18: 3803-3815.

92. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Evans, C.R. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, 26 (9/10): 1231-1237.
93. Reier, P.J., Stokes, B.T., Thompson, F.J., Anderson, D.K. (1992). Fetal cell grafts into resection and contusion/compression injuries of the rat and cat spinal cord, *Exp. Neurol.*, 115: 177-188.
94. Rice-Evans, C., Miller, N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods. Enzymol.*, 234: 279-293.
95. Richards, M., Fong, C.Y., Chan, W.K., Wong, P.C., Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.*, 20: 933-936.
96. Rikans, L.E., Hornbrook, K.R. (1997). Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging, *Biochim. Biophys. Acta*, 1362:116-127.
97. Sadowsky, C., Volshteyn, O., Schultz, L. (2002). Spinal cord injury, *Disabil. Rehabil.*, 24: 680-687.
98. Sandro, E. (2002). Stem cells for all seasons? Experimental and clinical issues, *J. Roy. Soc. Med.*, 95: 5-8.
99. Scott, G.S., Jakeman, L.B., Stokes, B.T., Szabo, C. (1999). Peroxynitrite production and activation of poly (adenosine diphosphateribose) synthase in spinal cord injury, *Ann. Neurol.*, 45: 120-124.
100. Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M. (1991). Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants, *J. Biol. Chem.*, 266: 398-403.
101. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
102. Smith, A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17: 435-462.
103. Stuehr, D.J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases, *Biochem. Biophys. Acta*, 1411: 217-230.
104. Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286: 431-444.
105. Taskiran, D., Tanyalcin, T., Sozmen, E.Y., Peker, G.O., Gulmen, V., Cagli, S., Kanit, L., Tekeli, G., Barcin, E., Zileli, M., Kutay, F.Z. (2000). The effects of melatonin on the antioxidant systems in experimental spinal cord injury, *Inter. J. Neurosci.*, 104: 63-73.

106. Teng, Y.D., Lavik, E.B., Qu, X., Park, K.I., Ourednik, J., Zurakowski, D., Langer, R., Snyder, E.Y. (2002). Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 99: 3024-3029.
107. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Sharipo, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282: 1145.
108. Tice R.R., Andrews, P.W., Singh, N.P. (1990). The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair, *Basic Life Sci.*, 53: 291-301.
109. Van der Kooy, D., Weiss, S. (2000). Why stem cells?, *Science*, 287: 1439-1441.
110. Vats, A., Bielby, R.C., Tolley, N.S., Nerem, R., Polak, J.M. (2005). Stem Cells, *Lancet*, 366: 592-602.
111. Vaziri, N.D., Lee, Y.S., Lin, C.Y., Lin, V.W., Sindhu, R.K. (2004). NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury, *Brain Res.*, 995: 76-83.
112. Verfallie, C.M., Pera, M.F., Lansdorp, P.M. (2002). Stem cells: hype and reality., *Hematology*, 1: 369-391.
113. Wakitani, S., Takaoka, K., Hattori, T., Miyazava, N., Iwanaga, T., Takeda, S., Watanabe, T.K., Tanigami, A. (2003). Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint, *Rheumatology*, 42: 162-165.
114. Wobus, A.M. (2001). Potential of embryonic stem cells, *Mol. Aspects Med.*, 22: 149-164.
115. Wojewodzka, M., Kruszewski, M., Iwanenko, T., Collins, A.R. (1998). Application of the comet assay for monitoring DNA damage in workers exposed to chronic low-dose irradiation I. Strand Breakage, *Mutat. Res.* 416: 21-35.
116. Xu, M., Yip, W.C., Gan, L., Ng, Y. (2005). Distinct roles of oxidative stress and antioxidant in the red nucleus following spinal cord hemisection, *Brain Res.*, 1055: 137-142.

ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında İzmir'de doğdum. İlköğrenimimi Balıkesir'in Burhaniye ilçesinde, orta öğrenimimi ise İzmir'de tamamladım. 2000 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ne girdim. 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. 2005 yılında ise aynı birime araştırma görevlisi olarak atandım.