



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE

VORTİOKSETİN'İN TEDAVİ EDİCİ VE

MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ

ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Berkay BOZKURT

BOLU

2020

TÜRKİYE CUMHURİYETİ

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE
VORTİOKSETİN'İN TEDAVİ EDİCİ VE
MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ
ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Berkay BOZKURT

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ali Rıza GEZİCİ

BOLU

2020

ETİK KURUL KARARI:

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu'nun 08.01.2020 tarihli 2020/01 karar no'lu onayı ile gerçekleştirilmiştir (Bkz. EK-1, EK-2).



ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN:

Bu tez çalışmasında yapılan deneyin ve tüm işlemlerin finansmanı çalışmacı tarafından karşılanmıştır. Çıkar çatışması bulunmamaktadır. Çalışmanın tasarımı, hazırlanması, deneyin yürütülmesi, sonuçların analizi ve neticesindeki tez yazımında bilimsel etiğe ve akademik kurallara uyulmuştur. Bu tezde başkalarının eserinden yararlanılması halinde atıfta bulunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını ve bu tezin bir kısmı veya tamamının başka bir yerde tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Dr. Berkay BOZKURT

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TEZ ONAY BELGESİ

Adayın Adı Soyadı : Berkay BOZKURT

Anabilim Dalı/Bilim Dalı : Beyin ve Sinir Cerrahisi

Tezin Başlığı : Deneysel Rat Omuriliği Yaralanma Modelinde
Vortioksetin'in Tedavi Edici ve Motor Fonksiyonlar Üzerine
İyileştirici Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tezin Danışmanı : Prof. Dr. Ali Rıza GEZİCİ

Tezin Savunma Tarihi :

Jüri Başkanı Prof. Dr.

Üye Prof. Dr.

Üye Prof. Dr.

DEKANLIK ONAYI

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Muhammet Güzel KURTOĞLU
DEKAN V.

Teşekkür ederim;

Vatanın dört köşesinde, yüreklerde damar damar yaşamaya devam eden; saygı ve minnetle andığım Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e...

Koronavirüs hastalığı(Covid-19) pandemisinde insan hayatına saygı ile yaklaşan ve bu bağlamda kendi hayatı pahasına mücadele veren ;mücadele esnasında hayatını kaybetmiş olanlar başta olmak üzere, dünyadaki tüm hekimlere ve diğer sağlık çalışanlarına...

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca etik duruşundan taviz vermeyen, yeri geldiğinde disiplinli bir subay yeri geldiğinde ise şefkatli bir baba edasıyla yaklaşarak eğiten, değerli hocam Prof. Dr. Ali Rıza GEZİCİ'ye...

Uzmanlık eğitimim boyunca cerrahide özgüven kazanmamı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Yaşar DAĞISTAN'a...

Usta-çırak ilişkisi ile öğrenilen emeğin mesleğinde; nöroşirurjiyen olmak için öncelikle bir zanaatkar olabilme yolunda , bilgi ve beceri birikimini paylaşarak bana nasıl cerrah olunacağını öğreten, sonsuz bir eğitim ve öğrenim yolu olarak gördüğüm mesleğimin geri kalanında, şimdinin üzerine kuracağım hekimlik yapısının temelinde yer alan demir gibi payı olan kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Özgür ŞENOL'a...

Kliniğimizin yetiştirdiği ilk beyin cerrahı, temiz kalpli bir ağabey ve başarılı bir akademisyen olan Dr. Öğretim Üyesi Güven KILIÇ'a...

Hayata gözlerimi açtığım andan itibaren gördüğüm en güzel yüz, duyduğum en güzel ses, kokladığım en güzel koku olmanın yanında ilk öğretmenim olarak beni hayatın geri kalanına hazırlayan yüreği sevgi ile dolu annem Ayşe BOZKURT'a...

Desteğini her zaman hissettiğim, yaşama bakışını örnek aldığım, büyürken rol model olarak gördüğüm daha sonra ise meslektaş haline geldiğim yüce insan babam Emir BOZKURT'a...

Artık büyüdüğün hiçbir zaman farkına varamayacağım; her zaman küçük ve tatlı kardeşim olarak gördüğüm, bunun yanında varlığıyla gücüme güç katan canım kardeşim Simay BOZKURT'a...

Asistanlık eğitimi boyunca bir aile haline gelmiş olduğumuz sevgili dostlarım Op. Dr. Kutlu SARI'ya, Op. Dr. Seçkin Emre CANCAN'a , Arş. Gör. Dr. Caner ÇİÇEK'e , Arş. Gör. Dr. Gülistan SAYAN'a , Arş. Gör. Dr. Şit KARATAŞ'a , Arş. Gör. Dr. Sena ERDOĞAN'a ve Arş. Gör. Dr. Yağız AKYÜZ'e, aynı bölümde ve hastanede çalışarak asistanlığın cefasını beraber çektiğim eşim Arş. Gör. Dr. Burcu Ece BOZKURT'a...

O annesinin karnında dünyaya gelmeyi beklerken babasının da büyük bir heyecanla kendisini beklediği ve sonunda kavuştuğumuz, hayatın her yeri ve her zamanında yanında olacağım hatta hayatın ötesinde de ruhumun parçası olarak var olacak, kalbimin beraber attığı kızım Bensu BOZKURT'a...

Dr. Berkay BOZKURT

İÇİNDEKİLER:

ETİK KURUL KARARI.....	I
ETİK İLKELERE UYULDUĞUNA İLİŞKİN BEYAN.....	II
TEZ ONAY BELGESİ.....	III
TEŞEKKÜR EDERİM.....	IV
TABLOLAR.....	VII
GRAFİKLER.....	VIII
RESİMLER.....	IX
KISALTMALAR VE TERİMLER.....	XI
ÖZET.....	XIV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
2.1-Çalışma Grupları.....	29
2.1.1-Çalışmada Kullanılan Ratlar ve Özellikleri.....	29
2.1.2-Çalışma Grupları.....	30
2.2-Anestezi Altında Uygulanacak İşlemler.....	35
2.3-Cerrahi ve Spinal Kord Basısı.....	35
2.4-Motor muayene, Eğik Düzlem ve Ayak İzi ile Değerlendirme.....	40
2.4.1-Motor Muayenede Faydalanılan Drummond ve Moore Kriterleri.....	40
2.4.2-Eğik Düzlem ile Değerlendirme.....	42
2.4.3-Ayak İzi Analizi.....	43
2.5- Ağırlık Takibi ile Doz Ayarlaması Yapılan Vortioxetine’in ve Serum Fizyolojik’in İntraperitoenal Yoldan Uygulanması.....	45
2.6- Sakrifikasyon Yöntemi ve Örneklerin Toplanması.....	46
2.7- ELISA Çalışmaları için Test Prosedürleri.....	50
2.7.1- Rat Serotonin Ölçümü İçin ELISA Protokolü.....	52
2.8- Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü.....	53
2.9- Serotonin İmmün Boyama Çalışmasının Protokolü (5HT).....	54
2.10- Luxol Fast Blue Boyama Prosedürü.....	55
2.11- İstatistiksel Analiz.....	56

3. BULGULAR.....	58
3.1- Drummond Moore Kriterleri ile Motor Muayene.....	58
3.2- Eğik Düzlem ile Değerlendirme.....	63
3.3- Ayak izi analizi.....	66
3.4- Ağırlık(gr).....	69
3.5- Serotonin Düzeyi.....	70
3.6- Histolojik Veriler.....	72
3.6.1- Kullanılan Işık Mikroskobu.....	72
3.6.2- H&E Boyama.....	72
3.6.3- LFB Boyama.....	74
3.6.4- Serotonin İmmün İşaretleme.....	78
4. TARTIŞMA.....	80
4.1- Deneysel Rat Omuriliği Yaralanma Modeli.....	82
4.2-Cerrahi.....	82
4.3-Sakrifikasyon.....	83
4.4- Vortiksetin ve Serotonin(5-HT).....	84
4.5- Kilo Alımının Vortiksetin ile İlişkisi.....	98
4.6- Histolojik Verilerin Analizi.....	99
4.7- Vortiksetin ve Motor Fonksiyonlar Üzerine İyileştirici Etkisi.....	101
5. SONUÇ.....	103
KAYNAKLAR.....	104
EKLER.....	114
ÖZGEÇMİŞ.....	116

TABLolar:

Tablo 1: Drummond ve Moore Kriterleri.....	41
Tablo 2: Drummond Moore Kriterleri ile yapılan motor muayene sonuçları.....	58
Tablo 3: Eğik düzlem ile değerlendirilen ratların aç ı dereceleri.....	63
Tablo 4: Ağırlık takibi.....	69
Tablo 5: ELISA ile serotonin düzeyi.....	70
Tablo 6: ELISA sonuçları.....	71
Tablo 7: Hasar yüzdesi.....	73
Tablo 8: Normal Miyelinizasyon-Az ve Şiddetli Demiyelinizasyon.....	76
Tablo 9: Demiyelinizasyon.....	77
Tablo 10: Serotonin Boyama.....	79

GRAFİKLER:

Grafik 1: Grupların motor muayene durumlarının karşılaştırması boxplot grafiği.....	62
Grafik 2: Grupların motor muayene ortalamalarının karşılaştırması grafiği.....	62
Grafik 3: Grupların eğik düzlem açılarının karşılaştırması boxplot grafiği.....	65
Grafik 4: Grupların eğik düzlem açı ortalamalarının karşılaştırması grafiği.....	65
Grafik 5: Ağırlık takibi boxplot grafiği.....	69
Grafik 6: Grupların serotonin düzeylerinin karşılaştırılması boxplot grafiği.....	70

RESİMLER:

Resim 1: Omurga, Columna Vertebralis.....	7
Resim 2: Omurilik, Medulla spinalis ve Spinal sinirler, Nervi spinales.....	8
Resim 3: Omuriliğin arterleri.....	9
Resim 4: Omuriliğin arterleri,Adamkiewicz arteri.....	10
Resim 5: Omurilik, Medulla Spinalis, Afferent ve efferent yollar.....	11
Resim 6: Yaralanma modelleri.....	23
Resim 7: Ratlar ya da sıçanlar tekli kafeslerde uygun koşullarda tutulmuştur.....	34
Resim 8: İnsizyon.....	37
Resim 9: Cerrahi katların açılması.....	37
Resim 10: Ekartörlerin yerleştirilmesi, laminektomiye takiben klip bası uygulanması.....	38
Resim 11: Klip kompresyon modeli.....	39
Resim 12: Cerrahi katları kapatılması.....	39
Resim 13: Eğik düzlem ile değerlendirme.....	42
Resim 14: Ayak izi analizi.....	44
Resim 15: Sakrifikasyon.....	48
Resim 16: Sakrifikasyon, rattan alınan blok halinde omurga.....	49
Resim 17: Klip basıya uğramış omurilik dokusu.....	49
Resim 18: Kulak küpesi ve ağırlık takibi.....	51

Resim 19: Sakrifikasyon ile alınan spinal kord doku örneklerinin ratların küpe numaralarına göre eppendorf tüplerine yerleştirilmesi.....	51
Resim 20: Deney grubu 224 numaralı ratın sırası ile preoperatif, postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri.....	66
Resim 21: Deney grubu 349 numaralı ratın sırası ile preoperatif, postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri.....	67
Resim 22: Sham grubu 415 numaralı ratın sırası ile preoperatif, postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri.....	68
Resim 23: Deneyden 10 gün sonra H&E ile boyanmış spinal cord enine kesit.....	72
Resim 24: Deneyden 10 gün sonra LFB ile boyanmış spinal cord enine kesit.....	74
Resim 25: Deneyden 10 gün sonra Serotonin immün işaretleme.....	78

KISALTMALAR VE TERİMLER:

A

ABD.....Amerika Birleşik Devletleri

C

Ca.....Kalsiyum

cm.....Santimetre

CPG Central pattern generator; Merkezi patern jeneratörü

D

DAB.....Diaminobenzidin

E

ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

G

g.....Akselerometre ile ölçülebilen ivmelenme değeri,

Gravitational; Kütleçekimsel

G protein.....Guanin nükleotid bağlayıcı protein

gr.....Gram

H

H&E.....Hemotoksilen&Eozin

HRP..... Avidin-Horseradish Peroxidase; Avidin-Siyahturp Peroksidaz

K

K.....Potasyum

kg.....Kilogram

L

L.....Lomber

LFB.....Luxol Fast Blue

M

MAP.....Mean arterial pressure; Ortalama arteryel basınç

MDDMajor Depressive Disorder; Majör Depresif Bozukluk

mg.....Miligram

mRNA..... Messenger ribonucleic acid; Mesajcı ribonükleik asit

mm.....Milimetre

ml.....Mililitre

µl.....Mikrolitre

N

NaCl.....Sodyum Klorür

O

OD.....Optik density; Optik yoğunluk

P

PBS.....Phosphate-buffered saline; Fosfat tamponlu serum fizyolojik

PPAR-γ.....Peroxisome proliferator activated receptor gamma; Peroksizom proliferatör aktive reseptör gama

PVD iyot.....Povidon iyot

R

Rat.....Sıçan

Righting Refleks..... Dört ayak üzerine kalkma refleksi

S

SERT.....Serotonin Transporter/5-HTT; Serotonin Taşıyıcısı

SCI.....Spinal Cord Injury; Spinal Kord Yaralanması/Hasarı

SF.....Serum Fizyolojik, Salın

SPSS.....Statistical Package for the Social Sciences; Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı

SS.....Standart sapma

SSS.....Santral Sinir Sistemi

ST..... Serotonin

5-HT..... Serotonin

°C.....Santigrat derece

T

T.....Torakal

TNF αTumor necrosis factor alpha; Tümör nekrozis faktör alfa

Toe-pinch.....Ayak ucunun sıkılması

V

VortexTüp karıştırıcı

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE VORTİOKSETİN'İN TEDAVİ EDİCİ VE MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET:

Spinal kord yaralanması ciddi motor, duyuşal ve otonomik bozukluklara sebep olabılen, motor yeteneklerinin kaybıyla seyreden bir durum olup konjenik olmayan sakatlığın ilk nedenlerindendir. Motorlu taşıt kazalarının yanında birçok travma mekanizması spinal kord yaralanmasına sebep olabilir.

Spinal kord yaralanması patofizyolojik olarak primer ve sekonder mekanizmalarla oluşan iki aşamalı bir süreçtir. Bu çalışmada 21 adet Wistar Albino cinsi erkek yetişkin rat deney-sham-kontrol olarak üç gruba ayrıldıktan sonra; kontrol grubundaki ratlara sadece laminektomi yapılarak cerrahi yük bindirilmiş olup, deney ve sham gruplarındaki ratlara klip kompresyon yöntemi kullanılarak omurilik yaralanması gerçekleştirilmiştir. Tüm ratlar üzerinde sakrifikasyon sonrası histolojik değerlendirme (Luksol Fast Blue boyama, Hematoksilen&Eozin boyama, serotonin immün

boyama, ELISA ile spinal kord serotonin düzeyi ölçümü) yapılarak ve çalışma süresince nöromotor muayene yöntemleri(eğik düzlem, motor skorlama, ayak izi analizi) kullanılarak, Vortioksetin'in sekonder yaralanma üzerine tedavi edici etkisi ile serotonin yolları üzerinden etki varlığı araştırılmıştır. Çalışma süresince deney grubundaki ratlara Vortioksetin verilirken, sham grubundaki ratlara salin verilmiştir.

Motor muayene ve eğik düzlem derecelerine göre grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında 3.($p=0,004$ - $p=0,007$), 5.($p=0,008$ - $p=0,001$), 7.($p=0,011$ - $p=0,001$), 10.($p=0,004$ - $p=0,001$) günlerde deney grubunun sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark yarattığı; sakrifikasyon sonrası alınan spinal kord doku örneklerinin H&E boyamalarında deney grubunun hasar yüzdesinin sham grubuna göre daha az olduğu ($p=0,022$) ve aynı örneklerin Luxol Fast Blue boyamalarında deney grubundaki ratların %71,4'ünde normal miyelinizasyon, sham grubundaki ratların %42,9'unda şiddetli demiyelinizasyon gözüktüğü tespit edilmiştir. Serotonin ile ilgili analizlerde ise istatistiksel anlamlılık çıkmamıştır.

Deneyel rat omuriliği yaralanma modelinde Vortioksetin'in tedavi edici ve motor fonksiyonlar üzerine iyileştirici etki yarattığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: laminektomi, serotonin, spinal kord yaralanması, travma, vortioksetin

**EVALUATING THE EFFECT OF VORTIOXETIN
ON TREATMENT AND IMPROVEMENT
OF MOTOR FUNCTIONS
IN EXPERIMENTAL RAT SPINAL INJURY MODEL:**

ABSTRACT:

Spinal cord injury is a condition characterized by the loss of motor abilities that can cause severe motor sensory and autonomic impairments and is one of the first causes of noncongenic disability. In addition to motor vehicle accidents, many trauma mechanisms can cause spinal cord injury.

Spinal cord injury is a two-stage process that occurs pathophysiologically by primary and secondary mechanisms. In this study, 21 Wistar Albino male adult rats were divided into three groups as experiment-sham-control; the rats in the control group were subjected to surgical burden only by laminectomy, and the rats in the experimental and sham groups were injured using the clip compression method. During the research, the therapeutic effect of Vortioxetine on secondary injury and its effects on serotonin pathways have been investigated on all rats by performing histological evaluation (Luxol Fast Blue staining, Hematoxylin & Eosin staining, Serotonin immunostaining, spinal

cord serotonin level measurement by ELISA) after sacrifice and using neuromotor examination methods (inclined plane, motor scoring, footprint analysis) . Vortioxetine was given to the rats in the experimental group, while saline was given to the rats in the sham group during the research.

Considering the dual comparisons of the groups according to motor examination and inclined plane degrees, it was found that the experimental group made a statistically significant difference compared to the sham group on the 3rd ($p = 0.004$ - $p = 0.007$), 5th ($p = 0.008$ - $p = 0.001$), 7th ($p = 0.011$ - $p = 0.001$), and 10th ($p = 0.004$ - $p = 0.001$) days; in the H&E staining of spinal cord tissue samples that was taken after sacrifice, the damage percentage of the experimental group was less than that of the sham group ($p = 0.022$) and in Luxol Fast Blue staining of the same samples, it was found that 71.4% of the rats in the experimental group had normal myelination and 42.9% of the rats in the sham group showed severe demyelination. No statistical significance was found in the analyzes related to serotonin.

In the experimental rat spinal cord injury model, it has been observed that Vortioxetine has a healing effect on therapeutic and motor functions.

Keywords: laminectomy, serotonin, spinal cord injury, trauma, vortioxetine

DENEYSEL RAT OMURİLİĞİ YARALANMA MODELİNDE VORTİOKSETİN'İN TEDAVİ EDİCİ VE MOTOR FONKSİYONLAR ÜZERİNE İYİLEŞTİRİCİ ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

1.GİRİŞ:

Spinal kord yaralanması ciddi motor, duyuşal ve otonomik bozukluklara sebep olabilir.(Assinck et al., 2017) Travmatik spinal kord yaralanmalı kişilerin yaşam süreleri genel nüfusa oranla kısa olsa da; İkinci Dünya Savaşı'ndan bu yana çarpıcı biçimde iyiye gitmektedir.(Savic et al., 2017)

Son zamanlarda temel laboratuvar ve klinik araştırmalar tedavi hususunda önemli ilerlemelere yol açmıştır. Spinal kord yaralanması; hastayı kişisel olarak etkilemekle birlikte iş gücü kaybı, tedavi maliyetleri gibi sosyal yükleri de beraberinde getirmektedir.(Sekhon and Fehlings, 2001)

On yıllarca süren araştırmalara rağmen, omuriliklerinde travmatik bir yaralanma geçirenlere işlevi geri kazandırabilecek etkili bir müdahale yoktur. Sonuç olarak, bu bireylerin büyük çoğunluğu ömür boyu felç ve nöropatik ağrı ile ve bireyin genel yaşam kalitesini olumsuz etkileyen bir dizi başka olumsuz olayla karşı karşıyadır.(Ruppert et al., 2019)

Spinal kord yaralanması neticesinde gelişen omurilik felcinin tedavisi hususunda günümüzde araştırmalar devam etmektedir. Geliştirilmekte olan spinal stimülasyon tekniklerinde epidural elektriksel uyarının omuriliğin arka köklerindeki proprioseptif devreler tarafından algılanarak motor nöronları aktive ettiği bulunmuştur. Elon Musk ve Neurolink'in yeni nöro arabirimi hem araştırma hem de klinik uygulamalar için yeni nesil beyin-makine arabirimlerine doğru gerçek bir adım olma şansına sahiptir. Yüksek bant genişliğine sahip bir cihazın klinik uygulama için uygun hale gelmesinden önce önemli teknolojik zorlukların ele alınması gerekmesine rağmen bu tür bir cihazla omurilik yaralanması olan bir hastanın, bir dijital fare ve klavyeyi ustaca kontrol edebileceği hayal edilebilir. Hızla gelişen spinal stimülasyon teknikleriyle birleştirildiğinde, bu yaklaşımın gelecekte motor fonksiyonu makul bir şekilde geri döndürebileceği öne sürülmektedir.(Musk, 2019, Pisarchik et al., 2019, Wagner et al., 2018, Song et al., 2011)

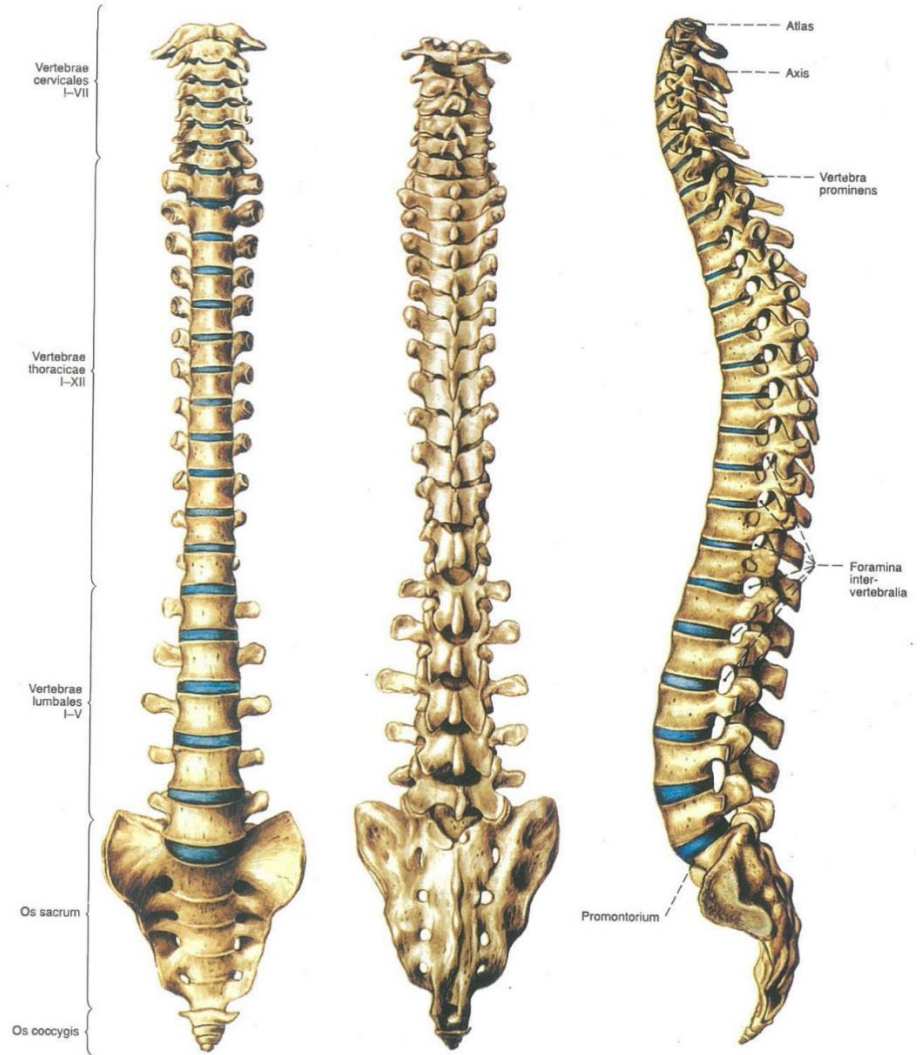
Spinal kord yaralanması neticesinde oluşan felci tedavi edebilme isteği ; dünyada daha önce yapılan ve devam etmekte olan çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmanın ve deneyin yapılmasının temel fikir taşlarını oluşturmaktadır. Temel fikir taşlarını üzerine inşa edeceğimiz anatomiden kısaca bahsedecek olursak; beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi alım, detaylandırma ve bilgi aktarımından sorumlu merkezdir. Omurilik bir nöron demeti içerir ve onu koruyan omurga kanalında yerini alır. İnsanlarda, 8 -10 mm orta çaplı, kafatasının tabanında başlayan silindirik bir forma sahiptir, ancak uzunluğu ilk lomber vertebralarla sonlandığından tüm uzunluğu boyunca vertebral kanalı işgal etmez. Omurga beş bölgeye ayrılır: servikal, torasik, lomber, sakral ve koksiks . Omurga 33 omurdan oluşur. Her omur bir omur gövdesi, nöral ark, pedikül ve laminadan oluşur. İki lamina, spinöz proçesi oluşturmak için arkaya birleşir. Vertebral sütunu dıştan iç mekana stabilize eden bağlar supraspinöz, interspinöz, ligamentum flavum, posterior longitudinal ve anterior longitudinal ligamanlardır . Bağlar, korda zarar verebilecek aşırı harekete izin vermeden esneklik sağlar. İnsan omurgası da yaşlanmadan etkilenir. Omurlar arası diskler daha kuru, daha fibröz ve daha az esnek hale gelir. Omurilik, vertebral kanalda bulunan zarlarla kaplı uzun silindirik bir yapıdır. Omurilik medullanın devamıdır. Foramen magnumdan ilk lomber vertebranın alt sınırına

uzanır. Üst ve alt ekstremitelerin innervasyonuna karşılık gelen servikal ve lumbosakral olmak üzere iki genişleme vardır. Konus medullarisinde sona erer. Omuriliğin anterior kısmı motor yollarını içerirken, posterior kord duyu yollarını içerir. Omurilikten, tüm vücudun motor ve duyuusal yeteneklerinden sorumlu periferik sinirler başlar. Örneğin cilt tarafından algılanan harici bir uyarı, aksonlar boyunca omuriliğin sırt tarafına ve son olarak beyne taşınan kimyasal sinyale dönüştürülür. Beyinde, detaylandırılır ve duyarlı motor sinyali omuriliğin ventral tarafına ve uyarıyı algılayan bölgeye geri döner. Meninks adı verilen üç zar, omuriliğin tamamını kaplar. Dıştaki mukavemetli zar dura mater olarak adlandırılmıştır. Ortadaki ince ve ağ benzeri filamanlarla oluşan zar hassas araknoid'tir ve iç zara pia mater denir. Araknoid ve pia mater arasında, beyin omurilik sıvısı ile dolu bir boşluk vardır ve bu boşluk omurga dokusuna kan sağlayan arterler içerir ki travma durumunda burada kanama olacaktır. Omurilik iki farklı doku tipinden oluşur. İç kısım grimsi görünür ve gri madde olarak adlandırılır, dış kısım beyazdır ve buna beyaz madde denir. Beyaz madde her biri belirli işlevlerle ilişkili nöronlar içeren sütunlara bölünür. Yanal sütunlar serebral korteksten temaslı omurga motor nöronlarına giden aksonları içerir. Dorsal bölgede duyarlılık bilgisi beyne doğru taşınır. Ventral kolonlar hem ağrı ve sıcaklık hakkında çıkan iletileri hem de inen motor iletileri taşır. Gri madde dorsal ve

ventral boynuzlara ayrılır. Dorsal olanlar cilt uyaran alımı içindir; ventral olanlar propriyoseptif lifler alırlar ve orta kısım kaslardan, visseralardan duyusal girdiler alırlar. Kasın motor aktivitesi, seri olarak yerleştirilen farklı nöron grupları arasında gerçekleşen iş birliğinin sonucudur. Bunlardan biri hasar görürse, bilgi devresi bozulur ve sonucunda hareket engellenir. Servikal ve lomber segmentlerdeki ortalama omurilik kan akışı torasik segmentten % 40 daha yüksektir. Omurilik kan akışının havza alanı orta torasik bölgedir. Omurilik kan dolaşımını esas olarak üç longitudinal damardan alır. Kordun ön % 75'ini besleyen tek anterior spinal arter, iki vertebral arter tarafından oluşturulur . İki posterior spinal arter posterior inferior serebellar arter tarafından oluşturulurak kordun arka %25'ini besler . Anterior ve posterior arterler sadece omuriliğin üst servikal segmentlerini korumak için yeterli kan sağlayabilir. Omuriliğin daha düşük seviyelerine kan temini, ön ve arka spinal arterlerle anastomozlanan radiküler arterler tarafından sağlanır. Alt torasik veya üst lomber bölgede bulunan büyük bir radiküler arter olan Adamkiewicz arteri, alt korda kan akışının çoğunu sağlar. Otomatik regülasyon, ortalama arteriyel kan basıncındaki (MAP) değişikliklere yanıt olarak vasküler direnci değiştirerek omurilik kan akışını korur.

Çıkan spinal yollar omuriliğin arka sütununda bulunur ve medullada sonlanır, duyusaldırlar. Medulladaki çaprazlamadan sonra, ikinci dereceden nöronlar artan bir demet oluşturur ve sonrasında üçüncü dereceden nöronlar yoluyla postsantral giruslara ulaşacakları talamusa varır . Kortikospinal sistem olarak adlandırılan inen yollar motordur. Kortikospinal kanal lifleri, presentral girustaki serebral korteksten kaynaklanır ve % 90'ı medulla seviyesinde çaprazlar. Medüller çaprazlamanın üstündeki lezyonlar kontralateral felce neden olurken medüller çaprazlamanın altındaki lezyonlar ipsilateral felce neden olur.(Papa et al., 2020, Brambrink and Kirsch, 2019)

Resim 1: Omurga, Columna Vertebralis



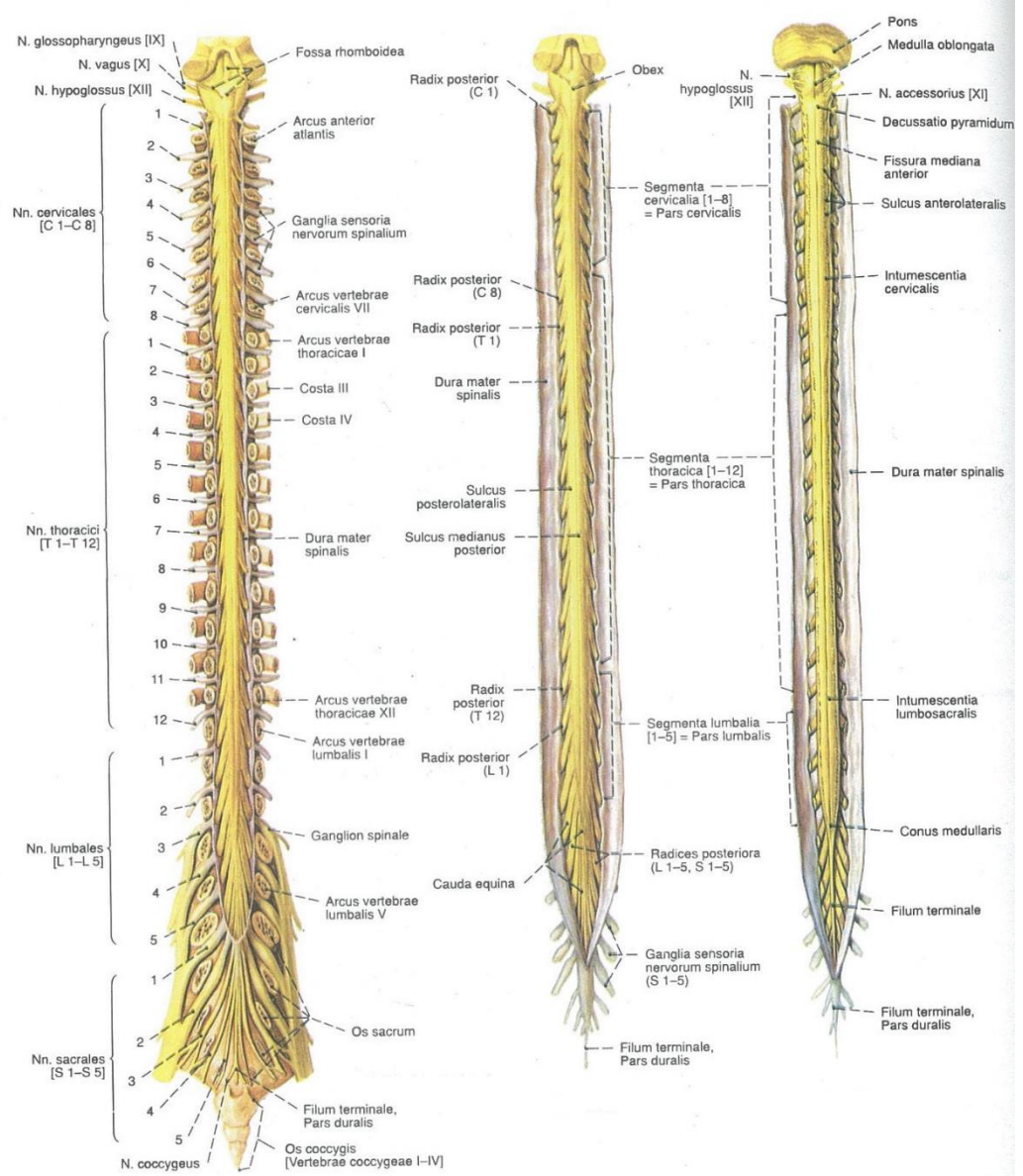
Omurga, Columna vertebralis;
Discus intervertebralis'ler mavi renkte gösterilmiştir;
önden görünüş (%30).

Omurga, Columna vertebralis;
arkadan görünüş (%30).

Omurga, Columna vertebralis;
Discus intervertebralis'ler mavi renkte gösterilmiştir;
lateraldeh görünüş (sol, %30).

(Arıncı K. (Türkçe Çeviri Editörü) Putz R., Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası, Cilt 2, Gövde, İç Organlar, Alt Ekstremité. 5. Baskı. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 2001, Münih, s. 2)

Resim 2: Omurilik, Medulla spinalis ve Spinal sinirler, Nervi
spinales

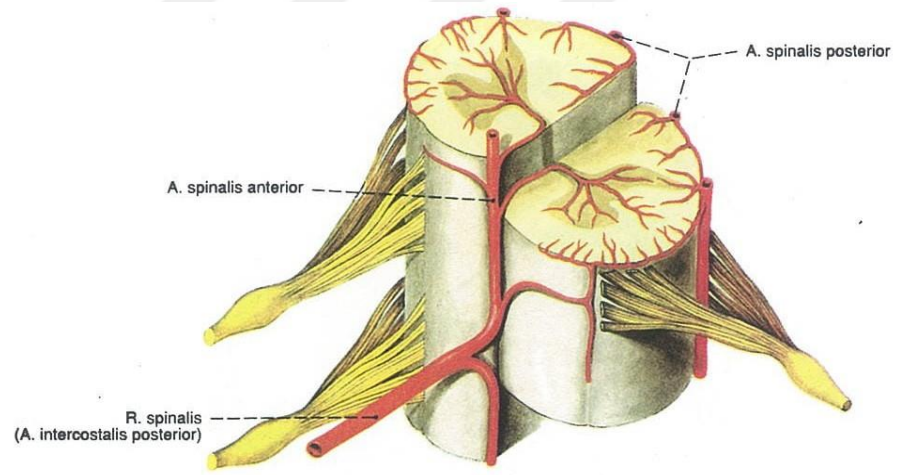


Omurilik, Medulla spinalis, ve Spinal sinirler, Nervi spinales;
Medulla spinalis'in durumu, Canalis vertebralis, Foramina intervertebralia ile Dura mater kesesinin açılmasından sonra; arkadan görünüş.
Medulla spinalis segmentasyonu spinal sinirlere göre yapılır. En üstte yer alan spinal sinir, 1. servikal sinir olarak kabul edildiğinden, sekiz tane servikal omurilik segmentinden söz edilir.

Omurilik, Medulla spinalis, ve Spinal sinirler, Nervi spinales;
Omurga kanalının ve Dura mater kesesinin açılmasından sonra; arkadan görünüş.

Omurilik, Medulla spinalis, ve Spinal sinirler, Nervi spinales;
Omurga kanalının ve Dura mater kesesinin açılmasından sonra; önden görünüş.

Resim 3: Omuriliğin arterleri

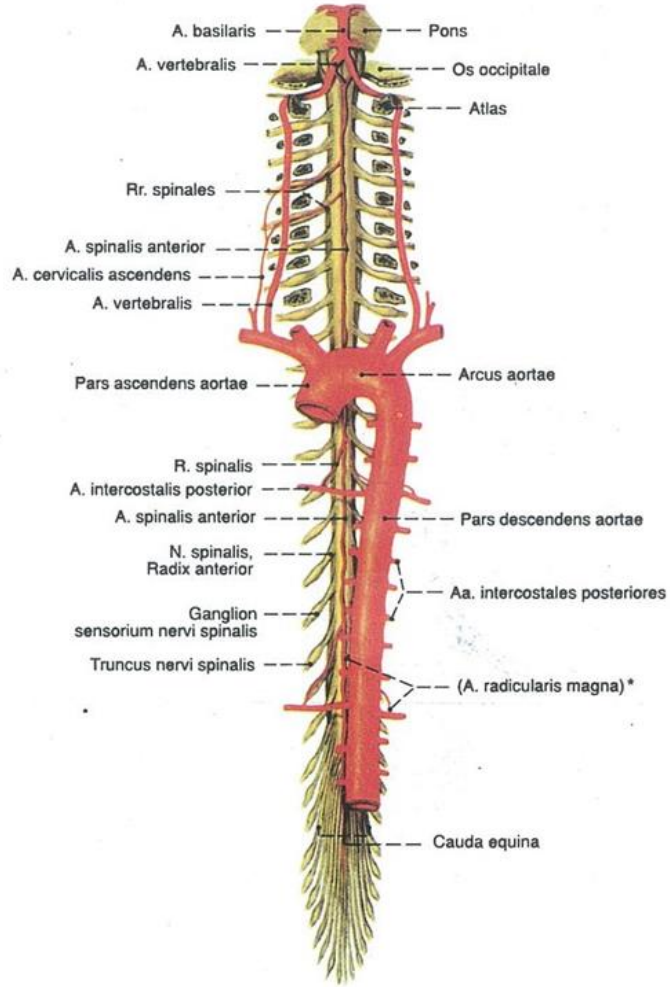


Omuriliğin arterleri, Medulla spinalis;

Şema.

(Arıncı K. (Türkçe Çeviri Editörü) Putz R., Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası, Cilt 1, Baş, Boyun, Üst ekstremité. 5. Baskı. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 2001, Münih, s 347)

Resim 4: Omuriliğin arterleri,Adamkiewicz arteri



Omuriliğin arterleri, Medulla spinalis;

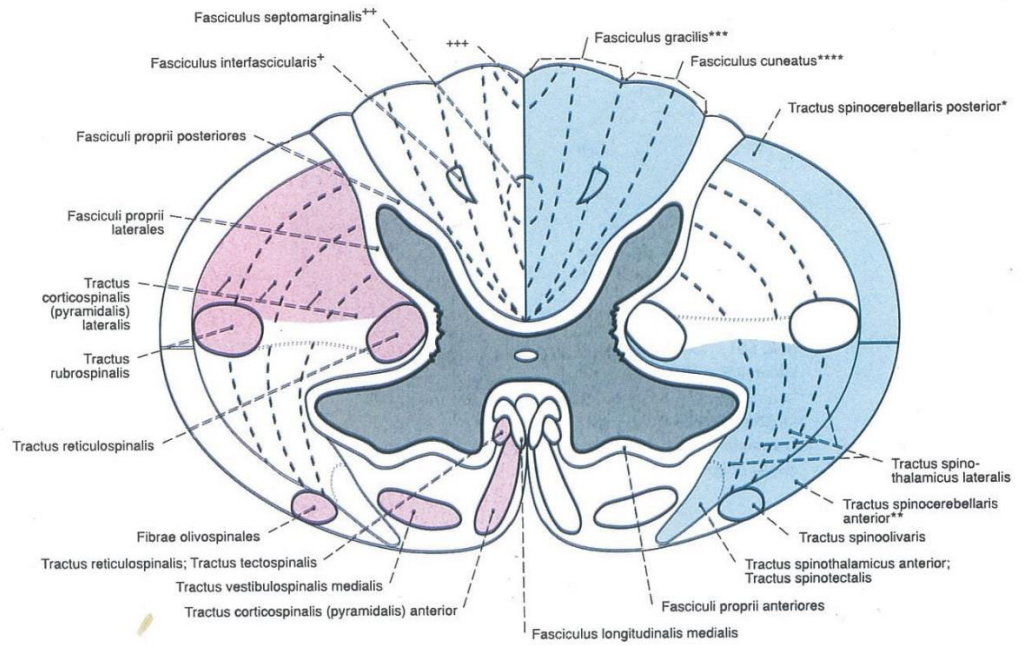
Şema.

* Klinikte: ADAMKIEWICZ arteri

(Arıncı K. (Türkçe Çeviri Editörü) Putz R., Pabst R. Sobotta İnsan Anatomisi Atlası, Cilt 1, Baş, Boyun, Üst ekstremité. 5. Baskı. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş. 2001, Münih, s 347)

Resim 5: Omurilik, Medulla Spinalis, Afferent ve efferent

yollar



Omurilik, Medulla spinalis;
Alt boyun segmenti örneğinde beyaz cevherin bağlantılarının şematik görünüşü. Afferent (= çıkan) yollar mavi, efferent (= inen) ler ise kırmızı renk ile belirtilmiştir.

- * Klinikte: FLECHSIG demeti
- ** Klinikte: GOWERS demeti
- *** Klinikte: GOLL huzmesi
- **** Klinikte: BURDACH huzmesi

+ +++ işaretleri ile belirtilen bölgelerde arka kordon yollarının inen kollateralleri bulunmaktadır.

- + SCHULTZ virgülü (Pars cervicalis)
- ++ FLECHSIG oval alanı (Pars thoracica)
- +++ PHILIPPE-GOMBAULT üçgeni (Pars lumbalis; Pars sacralis)

Spinal kord yaralanması , motor yeteneklerinin kaybıyla seyreden ve milyonda 40 ila 80 vaka arasında yıllık insidansla dünyadaki konjenik olmayan sakatlığın ilk nedenlerinden biri olan bir durumdur. Dünya çapında yaklaşık iki buçuk milyon insan spinal kord yaralanmasından etkilenmektedir . SCI geçirenlerin çoğu erkektir (ABD'de % 82, Hindistan'da %72.7) ve ortalama yaşları 33'tür. Sebepler dünyada ülkeden ülkeye farklılık gösterir ve çoğunlukla taşıt kazaları, düşmeler, şiddet veya spor faaliyetleri ile ilgilidir. Ek olarak, insidans bölgeye bağlıdır. Bu travmatik olaylar, bir veya daha fazla vertebranın kırılması, çıkması veya sıkışması ile sonuçlanır; ardından gelişen kanama, iltihaplanma ve enfeksiyon klinik durumun daha da kötüleşmesine katkıda bulunur. Bununla birlikte, Kuzey Amerika ve Avrupa Birliği bölgelerinde travmatik olmayan orijinli vakaların (osteoporoz veya tümör) artmasına ilişkin en son istatistikler, giderek artan yaşlanan nüfusla ilişkilidir. Travmatik spinal kord yaralanmasında; travmanın şiddetinden dolayı, SCI mağdurlarının yüksek bir yüzdesi (% 15 - 56) hastaneye yatmadan önce ölmektedir. Travmadan ve travma sonrasında ilk 24 saat boyunca hayatta kalanlar, ortaya çıkan duruma (parapleji, tetrapleji) ve sağlık sisteminin kapasitesine bağlı olarak SCI olmayan popülasyona göre daha düşük yaşam beklentisine sahiptir.(Papa et al., 2020)

Spinal kord yaralanmalarına en çok motorlu taşıt çarpışmaları, düşmeler ve sporla ilgili yaralanmalar neden olur. Motorlu taşıt kazaları spinal kord yaralanması için en yaygın sebep olarak kalırken; yakın zamandaki demografik veriler, ayakta durduğu yükseklikten düşmek gibi düşük enerji olaylarından sonra spinal kord yaralanması oluşan yaşlı bireylerde artan bir insidansı göstermektedir. Nijerya'daki palmiye ağacı tırmanıcıları arasında oluşan kazalar, sörfün popüler olduğu bölgelerde sörfçü miyelopatisi, Tanzanya'da yakacak odun ve meyve bulmak için ağaçlara tırmanmanın ardından meydana gelen düşmeler, Hindistan'da karanlıkta korkuluk olmadan çatılarda uyumak nedenli gece boyunca oluşan düşmeler, İran'da özel bir ev temizliği türü Khaneh Takani sırasında oluşan kazalar veya Katalonya'da "insan kuleleri" ile oluşturulan folklorik aktivite esnasında gelişen kazalar gibi bazı travma mekanizmaları travmatik omurilik hasarının bir nedeni olarak görülebilir.(Witt et al., 2018)

İsveç Stockholm bölgesinde yaşayan 320 spinal kord yaralanmalı hasta ile yapılan bir çalışmada ; spinal kord yaralanması olan bireylerde yaşam kalitesinin normotif bir popülasyona kıyasla tüm alt ölçeklerde anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir.(Westgren and Levi, 1998)

Bu bilgiler ışığında; spinal kord yaralanmasının dünyadaki yeri ve önemi anlaşılmış olup çalışmamızda Vortioksetin'in spinal kord yaralanmasında iyileştirici etkisi araştırılmıştır.

Vortioksetin'in seçilme nedenine gelmeden önce spinal kord yaralanması üzerine genel bilgileri aktarmaya devam edelim.

Akut spinal kord yaralanması patofizyolojik olarak primer ve sekonder mekanizmalarda oluşan iki aşamalı bir süreçtir. Primer mekanizma; lokal deformasyon ve enerji dönüşümüne bağlı mekanik hasarlanma iken sekonder mekanizma ise primer mekanizma ile tetiklenen hücre hasarına, devamında hücre ölümüne neden olabilen biyokimyasal ve hücresel süreçler kaskadıdır.(Sekhon and Fehlings, 2001, Witiw and Fehlings, 2015)

Sekonder hasar; primer yaralanma bölgesinden yayılır ve apoptoz, demiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon içerir. Terapötik olarak fonksiyonel yararları arttırmak için sekonder hasarı hedeflemek uzun zamandan beri nörobilimciler ve klinisyenler tarafından potansiyel bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir.(Hilton et al., 2017)

Travmatik spinal kord hasarı patofizyolojik olarak primer ve sekonder yaralanmalardan oluşur ve akut (<48 saat), subakut (48 saat ila 14 gün), orta dereceli (14gün ila 6 ay) , kronik (>6ay) fazlara ayrılmaktadır.(Ahuja et al., 2017) Sekonder mekanizma yaralanmadan birkaç dakika sonra başlar ve haftalar veya aylarca sürer.(Oyinbo, 2011)

Çalışmamızın bir ayağında ise serotonin karşımıza çıkmaktadır. Serotonin(5-HT)'in lokomotor sistem aktivasyonu, modülasyonu ve omurilik lezyonlarından sonra fonksiyonel iyileşmede potansiyel rolü büyük ilgi görmektedir ve araştırma alanı olmaya devam etmektedir.(Schmidt and Jordan, 2000) Spinal kordda santral kanalı çevreleyen bölge, dorsal ve ventral boynuzlar serotonerjik nöronlarca zengin olarak innerve edilir. Omuriliğin serotonerjik innervasyonu motor, somatosensör ve otonomik fonksiyonları modüle eden çeşitli peptiderjik maddeleri içeren kompleks bir çoklu nörotransmitter sistemdir.(Forrest et al., 1996)

Serotoninin sıçandaki travmatik omurilik yaralanması patofizyolojisinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Serotonin travma sonrası ödem oluşumunda yer almaktadır. Ayrıca vasküler geçirgenliği arttırmaktadır. Serotonin, yaralı bir omurilik segmentinde meydana gelen doku değişikliklerinin önemli bir parçası olan kan akışının azalmasına neden olur.(Sharma et al., 1990)

Spinal kord travması sonrası gelişen motor defisit, ventral beyaz cevherde akan aksonlardan kaynaklanan serotonin(5-HT) terminallerinin dağılımı ile ilişkili olması, sıçanlarda ventral fönikülün bütünlüğünün lokomotor aktivitesi için gerekli olduğu gözlemiyle tutarlıdır.(Faden et al., 1988)

Serotonin(5-HT) beyin sapı nöronlarının çeşitli popülasyonlarında sentezlenen bir monoamin nörotransmitter olup, omurgalı lokomasyonuna dahil olan ağların omurilik aktivitesini module etmekte önemli bir rol oynar. Omurilik yaralanmasının ardından spinal motor bölgelere inen serotonerjik projeksiyonların bozulması, müteakiben 5-HT’de tükenme, hem 5-HT taşıyıcılarının disregulasyonu hem de artmış ekspresyonu, özel 5-HT reseptörlerinin süper hassasiyeti ve/veya yapısal otomatik aktivasyonu ile sonuçlanır. Serotonerjik sistemdeki bu değişiklikler; lokomotor fonksiyon bozukluğundan felce kadar çeşitli derecelerde oluşabilir. Spinal kord yaralanmasının deneysel modellerinde; spesifik 5-HT reseptörü agonistlerinin verilmesi veya 5-HT reseptörlerinin tüm sınıflarının global bir aktivasyonunu üreten 5-HT öncüsü olan 5-Hidroksitriptofan’ın yükseltilmesi aracılığıyla serotonerjik reseptörlerin farmakolojik modülasyonunu hedefleyen stratejiler ile ekstremiteler koordinasyonunu, lokomotor fonksiyonu geliştirmek üzere görevli serotonerjik sistemin farklı bileşenleri hedeflenmektedir. Reseptörlerin uyarılması, özellikle diğer monoaminerjik sistemlerin aktivasyonu ile birlikte kullanıldığında veya elektriksel uyarım ile birleştğinde iyileştirmek veya yaralanma yerinin altındaki hareketlerin kalitesini ve sıklığını kolaylaştırmak için lokomotor merkezi patern jeneratörünün (CPG) aktivasyonuna yol açar.(Ghosh and Pearse, 2015)

Lokomotor hareketleri; merkezi sinir sisteminde lokalize olan ve lokomasyon için merkezi patern jeneratörü(CPG) olarak adlandırılan özel bir nöron ağında programlanır. 5-HT, CPG aktivitesinin güçlü bir nöromodülatörü olarak tanınmıştır.(Feraboli-Lohnherr et al., 1997)

Serotonin, kısmen motonöronlar üzerindeki doğrudan etkileri yoluyla hareketliliğin kontrolünde önemli bir rol oynar. Spinal kord tam transeksiyonu fonksiyonel iyileşmeyi etkileyen motor nöronlarda 5-HT reseptörlerinde değişikliklere neden olur. 5-HT_{2A} ve 5-HT₇ reseptörlerinin aktivasyonu, paraplejik sıçanların lokomotor arka bacak hareketlerini geliştirir.(Miazga et al., 2018)

Yürüme ya da yüzme gibi hareketler, omuriliğin ventromedial kısmında yer alan bir grup nöron tarafından düzenlenir. Bu bölgeden gelen çoğu internöron, tekrarlayan motor nöron inhibisyonuna aracılık eden Renshaw hücreleri de dahil olmak üzere yoğun serotonerjik sinaptik inervasyon alır. Bu gözlemler 5-HT'nin lokomotor aktivitesini modüle ettiğini göstermektedir.(Perrier and Cotel, 2015)

İntratekal 5-HT'nin, spinal 5-HT reseptörlerinin aracılık ettiği bir antinosiseptif etki ürettiği kabul edilmiştir. Otoradyografik ve bağlanma(binding) çalışmaları omurilikte 5-HT reseptörlerinin varlığını göstermiştir. 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D ve 5-HT2 reseptörleri, omurilikte mevcuttur.(Marlier et al., 1991, Thor et al., 1993, Castro et al., 1997, Jeong et al., 2004) Ayrıca, 5-HT3 reseptörünün, dorsal boynuzun yüzeysel katmanları içinde sonlanan birincil afferent fiberler üzerinde varolduğu tespit edilmiştir.(Kidd et al., 1993, Jeong et al., 2004) 5-HT2A reseptörü mRNA'sı, sadece omuriliğin lamina IX'unda daha yüksek seviyelerde eksprese edilirken, 5-HT2C reseptörü mRNA'sı, lamina II hariç çoğu omurilik laminasında güçlü bir şekilde eksprese edilmiştir. 5-HT3 reseptörü mRNA'sı, omurilikte geniş bir dağılım ile düşük seviyelerde eksprese edilmiştir.(Fonseca et al., 2001, Jeong et al., 2004) 5-HT1A reseptörü mRNA'sı, omuriliğin dorsal boynuzu boyunca geniş bir şekilde dağılmıştır .(Jeong et al., 2004, Zhang et al., 2002)

Dorsal boynuzda bulunan başlıca 5-HT reseptörü sınıfı, 5-HT₁ ailesidir.(Murphy and Zemlan, 1992, Hains et al., 2003, Zemlan and Schwab, 1991) Bu reseptör alt kümesinden 5-HT_{1A}, tüm yüksek afiniteli [³H] 5-HT bağlanma bölgelerinin % 27'sini temsil eder, en yüksek 5-HT_{1A} reseptörü yoğunluğu lamina I ve II'dedir. (Hains et al., 2003, Zemlan et al., 1988, Marlier et al., 1991) Ek olarak, seçici olmayan bir monovalent katyon kanalına açılan 5-HT₃ reseptörü, omuriliğin tüm seviyelerinde substantia gelatinosa'da bulunmuştur. (Hains et al., 2003, Hamon et al., 1989)

Çalışmamızda spinal kord hasarı sonrası sekonder yaralanma üzerinde Vortioksetin'in iyileştirici etkisi olacağı hipotezi ile yola çıkılmıştır. Spinal kord yaralanması üzerinde serotonerjik yolların katılımı ile oluşması beklenen iyileştirici etki serotonin düzeyi ve spinal korddaki serotonin reseptörleri üzerinden araştırılmak istenildiğinden Vortioksetin seçilmiştir. Vortioksetin, Lundbeck İlaç Ticaret Limited Şirketi tarafından majör depresif bozukluk ve genelleştirilmiş anksiyete bozukluğunun tedavisi için geliştirilmiş, oral yoldan uygulanan küçük bir moleküldür. Vortioksetin, Eylül 2013'te ABD'de MDD için ilk küresel onayını almıştır. Vortioksetin yeni bir multimodal antidepresan olarak geliştirilmekte olan 5-HT₃, 5-HT₇ ve 5-HT_{1D} reseptör antagonisti, 5-HT_{1B} reseptör kısmi agonisti, 5-HT_{1A} reseptörü agonisti ve in vitro 5HT taşıyıcı inhibitörüdür.(Mørk et al., 2013, Sanchez et al., 2015)

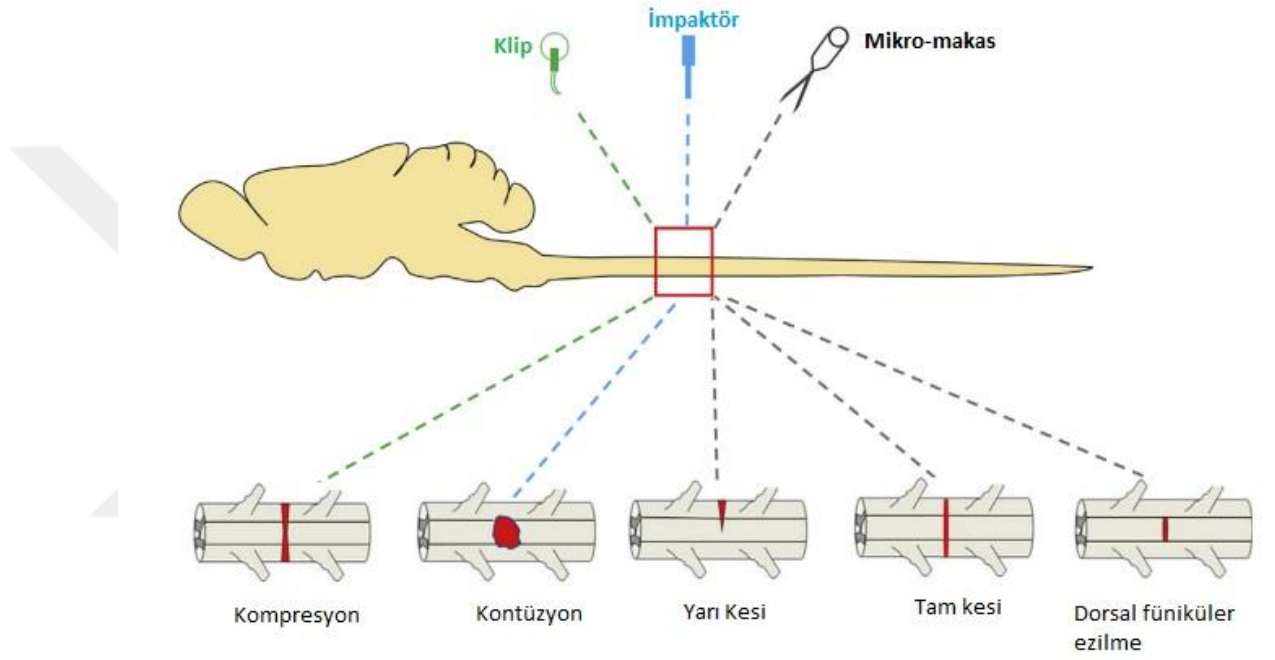
Sekonder omurilik yaralanmasında Vortioksetin'in serotonerjik yolları da devreyi sokarak oluşturacağı düşünülen nöroprotektif ve rejeneratif etkilerinin araştırıldığı ve ratların yer aldığı çalışmamızda klip kompresyon modeli kullanılmıştır. Omurilik zedelenmesi (SCI) modelleri, sadece terapötik müdahalelerin etkinliğini araştırmak için değil, aynı zamanda dahil olan moleküler yolları daha iyi anlamak için vazgeçilmezdir.

SCI modelleri, Allen'in 1911'de ilk ağırlık düşürücü kontüzyon modelini geliştirmesinden bu yana geçen yüzyılda önemli ölçüde gelişmiştir. SCI modelleri, insan spinal kord yaralanmasının özelliklerini olabildiğince yeniden yaratmayı hedeflemektedir. Bu modeller kullanılan hayvana, yaralanma yerinin oluşmasına ve yaralanma mekanizmasına göre değişir. Yaralanma mekanizmasına bağlı olarak, SCI modelleri kontüzyon, kompresyon, distraksiyon, transeksiyon veya kimyasal olarak sınıflandırılabilir. Omuriliğin yerini değiştirmek ve zedelemek için geçici bir kuvvetin uygulandığı kontüzyon modelleri arasında ağırlık düşürülmesi, elektromanyetik ve hava basıncı cihazları bulunur.

Sıkıştırma(kompresyon) modelleri, omuriliğin uzun bir süre boyunca sıkıştırılmasıyla karakterize edilir. Distraksiyon modellerinde omuriliğin gerilmesi için zıt çekiş kuvvetleri uygulanırken, vertebraların ekstenel düzlemde yer değiştirmesi nedeniyle omuriliğe zarar verilir. Transeksiyon, omuriliğin belirli bir seviyede kısmen veya tamamen kesilmesini içerir. Son olarak, kimyasal aracılı SCI modelleri ikincil hasar sekansının spesifik yönlerini araştırır. SCI üretmek için modifiye bir anevrizma klipinin kullanımı ilk önce 1978'de sıçanlarda tarif edildi. İşlem, omurganın istenen seviyesinde bir laminektomi yapılmasını içerir.

Klip, omuriliğin etrafındaki belirli bir kuvvetle kapatılarak akut bir yaralanmaya neden olur ve daha sonra kordonun belirli bir süre boyunca, genellikle en az 1 dakika süreyle, yaralanmaya neden olacak şekilde sıkıştırılması için bırakılır. Çok çeşitli kapama kuvveti olan klipler mevcuttur, bu da değişken kapama kuvveti oluşturur ve dolayısıyla hayvandaki yaralanma şiddetini oluşturur. Örneğin; sırasıyla ciddi ve orta dereceli yaralanmayı üretmek için eşit sürede 50 ve 35 g'lık bir kuvvet uygulanabilir. Klip uygulamasının süresi, değişken şiddette yaralanmalara neden olacak şekilde değişebilir. Klip sıkıştırmanın avantajları, nispeten ucuz olan, değişken şiddette SCI üreten ve omurganın tüm bölgelerinde kullanım için uyarlanabilir bir sıkıştırma modeli sağlamasıdır. Basitlik ve uyarlanabilirlik sağlasa da, elde edilen yaralanma parametreleri klibin kalibre edilmiş kapanma kuvveti ve sıkıştırma süresidir. Bu nedenle, klibin kord ile teması üzerine hızı, iletilen gerçek kuvvet ve kordon sıkıştırma kapsamı hesaba katılmaz.(Ahmed et al., 2019, Alizadeh et al., 2019)

Resim 6:Yaralanma modelleri



Diyagram, sıçanların spinal kordundaki farklı yaralanma modellerini temsil etmektedir, ilgili yayından Türkçe'ye çevrilmiştir. Kompresyon modelinde, yaralanmayı başlatmak için bir klip kullanılır. Kontüzyon yaralanma modeli için, bir çarpma tertibatı önceden tanımlanmış bir mesafeden düşürülür. Yaralanmanın kesi modelinde, farklı tipte kesi yaralanmalarını gerçekleştirmek için bir cerrahi bıçak kullanılır.(Ahmed et al., 2019)

Çalışmamızı detaylandırarak aktarmadan önce kısaca özetlediğimizde; bu çalışmada ratlarda klip kompresyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen omurilik yaralanmalarında histolojik yöntemler ve nöromotor muayene yöntemleri kullanılarak Vortiksetin'in sekonder yaralanma üzerine tedavi edici etkisi ile serotonin yolları üzerinden etki varlığı araştırılmıştır.



2.GEREÇ VE YÖNTEM:

Bu çalışmada klip kompresyon yöntemi kullanılarak omurilik yaralanması gerçekleştirilen ratlarda sakrifikasyon sonrası histolojik değerlendirme (Luksol Fast Blue boyama, Hematoksilen&Eozin boyama, serotonin immün boyama, ELISA ile spinal kord serotonin düzeyi ölçümü) yapılarak ve çalışma süresince nöromotor muayene yöntemleri(eğik düzlem, motor skrolama, ayak izi analizi) kullanılarak Vortiksetin'in sekonder yaralanma üzerine tedavi edici etkisi ile serotonin yolları üzerinden etki varlığı araştırılmıştır. Çalışmada literatürdeki diğer çalışmalara ve Power analizine göre 21 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanılmıştır. Ratların nöromotor değerlendirmeleri cerrahi işlem öncesinde bir kez kayıt altına alınmıştır. 21 adet Wistar Albino cinsi erkek yetişkin rata uygun anestezi sonrası Torakal 5 ve Torakal 12 korpusları arası mesafeden yapılan 2cm'lik

cilt insizyonunun ardından ratların paravertebral adaleleri sıyrıldıktan sonra 21 rata T 7-8-9 laminektomi yapıp, bunlardan 14'üne klip kompresyon yöntemi ile kord hasarı verilmiştir. Grup-1 (Kontrol Grubu-Laminektomi), Grup-2 (Deney Grubu-Laminektomi+Kord basısı+Vortiksetin), Grup-3 (Sham Grubu-Laminektomi+Kord basısı) olarak 7'şer rattan oluşan 3 grup oluşturulmuştur. Denekler 10 gün süresince takip edilerek, nöromotor değerlendirmeleri preoperatif, postoperatif , 3.(üçüncü) gün, 5.(beşinci) gün , 7.(yedinci) gün ve 10.(onuncu) gün olmak kaydıyla her bir rat için 6(altı) defa kayıt altına alınmıştır. Denekler histolojik değerlendirme için 10.günde sakrifiye edilmiştir.

Çalışmada kullanılan klip kompresyon modeli 1978 'de Rivlin ve Tator tarafından geliştirilmiştir.(Rivlin and Tator, 1978)

Klip yaralanması, servikal, torasik ve lomber yaralanmalarda sıçanlarda ve farelerde in vitro ve in vivo omurilik yaralanması çalışmaları için yararlıdır.Avantajları:

‘1. Ucuzdur.

2. Dayanıklıdır. Aynı klip sonsuz sayıda kullanılabilir, ancak yaylar çoklu açıklık ve kapanışlardan sonra zayıflayacaktır.

3. Omurilikte servikal, torasik ve lomber , tüm düzeylerde yaralanmalar için yararlıdır.

4. Akut, subakut ve kronik yaralanmaların modellenmesinde kullanışlıdır.

5. Sıçanlarda ve farelerde faydalıdır.

6. Dura'nın açılmasını gerektirmez.

7. Omuriliğin anterior-posterior kompresyonunu üretir.

8. Klip'in hızlı bir şekilde serbest bırakılması omuriliğe ani bir darbe üretir.

9. Zaman ve uygulama kuvvetinin kontrolü sağlanır.

10. Tutarlı dereceli yaralanmalar üretilebilir. Sıkıştırma kuvveti ve süresi, düşük ila yüksek şiddetli model yaralanmalarına göre değiştirilebilir ve hem sıkıştırma hem de baskı süresi için güvenilir doz-cevap eğrileri oluşturulabilir.

11. Omurganın yaralanma sırasında stabilize edilmesi ve hassas konumlandırılması gerekli değildir.

12. Aynı klip, değişen şiddette yaralanmalar üretmek için farklı halkalarla monte edilebilir.

13. Çok düşük mortalite ve morbidite oranlarına sahiptir.'
olarak sıralanabilir.(Chen et al., 2019)

Bu çalışmada deney grubunda yer alan 7 adet rata mevcut literatürlerde belirtildiği üzere kullanım dozuna uygun 10mg/kg (1ml SF(Serum Fizyolojik)'de 2mg Vortioksetin çözündürülerek verilmiştir.) intraperitoneal yoldan 10 gün süresince günde bir kez verilmiştir. Çalışmada yer alan deney, sham ve kontrol gruplarındaki 21 ratın günlük ağırlık takipleri yapılmıştır. Bu sayede deney grubunda yer alan 7 adet rata verilen Vortioksetin dozu mg/kg(miligram/kilogram) şeklinde günlük hesaplanarak, ratların kilosuna uygun ilaç miktarını almaları sağlanmıştır. Sham grubunda yer alan 7 adet rat ise deney grubuna verilen Vortioksetin'in içerisinde çözündürüldüğü SF hacmine eşdeğer olmak kaydıyla, intraperitoneal yoldan sadece SF almışlardır.

1., 3., 5., 10. günlerde eğik düzlem ile değerlendirilen, motor muayeneleri kayıt altına alınan ve ayak izleri alınan ratlar 10. günde anestezi altında sakrifiye edilerek; laminektomi ve travma alanlarından spinal kord doku örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerde nekroz düzeyi gösterilmesi için Hemotoksilen&Eozin (H&E) boyama ve miyelinizasyon-demiyelinizasyon görünümü için Luxol Fast Blue boyama yapılmıştır. Spinal kord dokusunda ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile serotonin seviyesi bakılmıştır. Ayrıca doku örneğinde serotonin immün işaretleme yapılmıştır.

Üniversitemiz deney hayvanları labaratuvarında gerçekleştirilen deneyde doku boyamaları ve dokuda serotonin immün işaretleme Dr. Öğr. Üyesi Aslıhan Şavlan tarafından üniversitemiz histoloji labaratuvarında uygulanmıştır. ELISA çalışmaları için dış hizmet alımı (Baran Medikal Sanayi Ticaret Limited Şirketi Konutkent Mahallesi 3028 Cadde No:2 West Gate C Blok /9 , Çankaya/Ankara) yapılmıştır.

2.1-Çalışma Grupları:

2.1.1-Çalışmada Kullanılan Ratlar ve Özellikleri:

Çalışmamızda 250-350 gr. ağırlığında 21 adet yetişkin, erkek Wistar Albino cinsi rat yer almıştır. Kulak küpesi yardımı ile numaralandırılan 21 adet rat randomizasyon ile üç gruba bölünmüştür. Çalışma ‘Deney Grubu, Sham Grubu ve Kontrol Grubu’ olarak 3 grup ile sürdürülmüştür.

Gruplar istatistiksel açıdan kabul edilebilir en az hayvan sayısı ve daha önce yapılmış benzer çalışmalar dikkate alınarak 7'şer rattan oluşturulmuştur. Ratlara tüm süreç zarfında standart pellet yem ve içme suyu ad libitum sağlanmıştır. Ratlar 12 saat/12 saat gece-gündüz döngüsünde, 18-26°C (Santigrat derece) ortam sıcaklığında, %30-70 nem oranında ; mesane fonksiyonları, idrar çıkışı takibi ve motor fonksiyonları değerlendirilmek amacı ile her biri ayrı kafeste olacak şekilde tekli kafeslerde tutulmuşlardır.

Paraplejik ratlara günlük olarak palpasyon ile glob vezikale muayenesi yapılmıştır. Ratların her biri günde üç defa, mesane masajı yardımı ile işetlenmiştir.

2.1.2-Çalışma Grupları:

1. **Kontrol (n=7):** Bu gruptaki sıçanlara ,sıçanların nöromotor değerlendirmeleri cerrahi işlem öncesinde bir kez kayıt altına alındıktan sonra , ketamin-ksilazin anestezisi altında T7-8-9 laminektomi yapılmasının ve cerrahi katların kapatılmasının ardından hiçbir işlem uygulanmamıştır. Sıçanlar on gün boyunca 1. (preoperatif-postoperatif) , 3., 5., 7., 10. günlerde her gün bir kez nöromotor muayene yöntemleri(eğik düzlem,motor skortlama,ayak izi analizi) ile değerlendirilerek standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendikten sonra 10.günün sonunda ketamin-ksilazin

anestezisi altında yapılan torakotominin ardından sağ ventrikülden eksanguinasyon sonrası eski operasyona ait vertebral orta hattaki insizyondan ilerlenerek; spinal kord dokusu alınmıştır. Alınan doku örneğinin bir kısmı hizmet alımı ile serotonin düzeyi bakılması için dış labaratuara gönderilmek üzere -80 derecede dondurulmuştur. H&E boyama, serotonin immün işaretleme ve Luksol Fast Blue boyamaları için de dokunun diğer kısmı ise % 4' lük paraformaldehitte saklanmıştır.

- 2. Deney (n=7):** Bu gruptaki sıçanlarda Rivlin ve Tator'un tarif ettiği gibi deneysel omurilik yaralanması modeli oluşturulmuştur .(Rivlin and Tator, 1978) Nöromotor değerlendirmeleri cerrahi işlem öncesinde bir kez kayıt altına alındıktan sonra Ketamin (100 mg/kg, i.m.) ve Ksilazin (10mg/kg, i.m.) ile anestezi edilen sıçanların Torakal 5 ve Torakal 12 korpusları arası mesafeden yapılan 2cm'lik cilt insizyonunun ardından paravertebral adaleleri sıyrılıp, her birine T7-8-9 laminektomi yapıp, klip kompresyon yöntemi ile kord hasarı verilmiştir. Sıçanlar on gün boyunca her gün 10mg/kg Vortioksetin SF içinde çözülerek (1ml SF'de 2mg Vortioksetin olacak şekilde) intraperitoneal olarak verilip; 1.(preoperatif-postoperatif) , 3., 5., 7., 10. günlerde her gün bir kez nöromotor muayene yöntemleri(eğik düzlem,motor skollama,ayak

izi analizi) ile değerlendirilerek; standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendikten sonra, 10.günün sonunda ketamin-ksilazin anestezisi altında yapılan torakotominin ardından sağ ventrikülden eksanguinasyon sonrası eski operasyona ait vertebral orta hattaki insizyondan ilerlenerek; spinal kord dokusu alınmıştır. Alınan doku örneğinin bir kısmı hizmet alımı ile serotonin düzeyi bakılması için dış labaratuara gönderilmek üzere -80 derecede dondurulmuştur. H&E boyama, serotonin immün işaretleme ve Luksol Fast Blue boyamaları için de dokunun diğer kısmı ise % 4' lük paraformaldehitte saklanmıştır.

- 3. Sham (n=7):** Bu gruptaki sıçanlarda Rivlin ve Tator'un tarif ettiği gibi deneysel omurilik yaralanması modeli oluşturulmuştur .(Rivlin and Tator, 1978) Nöromotor değerlendirmeleri cerrahi işlem öncesinde bir kez kayıt altına alındıktan sonra Ketamin (100 mg/kg, i.m.) ve Ksilazin (10mg/kg, i.m.) ile anestezi edilen sıçanların Torakal 5 ve Torakal 12 korpusları arası mesafeden yapılan 2cm'lik cilt insizyonunun ardından paravertebral adaleleri sıyrılıp, her birine T7-8-9 laminektomi yapıp, klip kompresyon yöntemi ile kord hasarı verilmiştir. Sıçanlara on gün boyunca her gün deney grubuna verilen Vortioksetinin çözündürüldüğü SF hacmi kadar (1.5ml-2.5ml) intraperitoneal olarak sadece SF verilir;

1. (preoperatif-postoperatif) , 3., 5., 7., 10. günlerde her gün bir kez nöromotor muayene yöntemleri(eğik düzlem,motor skorlama,ayak izi analizi) ile değerlendirilerek; standart pellet yem ve çeşme suyu ile beslendikten sonra, 10.günün sonunda ketamin-ksilazin anestezisi altında yapılan torakotominin ardından sağ ventrikülden eksanguinasyon sonrası eski operasyona ait vertebral orta hattaki insizyondan ilerlenerek;spinal kord dokusu alınmıştır. Alınan doku örneğinin bir kısmı hizmet alımı ile serotonin düzeyi bakılması için dış labaratuara gönderilmek üzere -80 derecede dondurulmuştur. H&E boyama,Serotonin immün işaretleme ve Luksol Fast Blue boyamaları için de dokunun diğer kısmı ise % 4' lük paraformaldehitte saklanmıştır.

Resim 7:Ratlar ya da sıçanlar tekli kafeslerde uygun koşullarda tutulmuştur



2.2-Anestezi Altında Uygulanacak İşlemler:

Ketamin ve Ksilazin anestezisi altında (100mg/kg Ketamin ve 10mg/kg Ksilazin İ.M.) spinal kord yaralanması oluşturulmuştur; her üç gruptaki yetişkin ratlara uygun anestezi sonrası Torakal 5 ve Torakal 12 korpusları arası mesafeden yapılan 2cm'lik cilt insizyonunun ardından ratların paravertebral adeleleri sıyrılıp, üç grubun toplamı 21 rata T 7-8-9 laminektomi yapıp,iki gruptaki 14 rata klip kompresyon yöntemi ile kord hasarı verilmiştir. Deney sonunda 21 adet ratın insizyonu kapatılmıştır.

Deney sonrası 10 günlük takibin sonucunda tüm gruptaki sıçanlar intramüsküler Ketamin ve Ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilmiştir.

2.3-Cerrahi ve Spinal Kord Basısı:

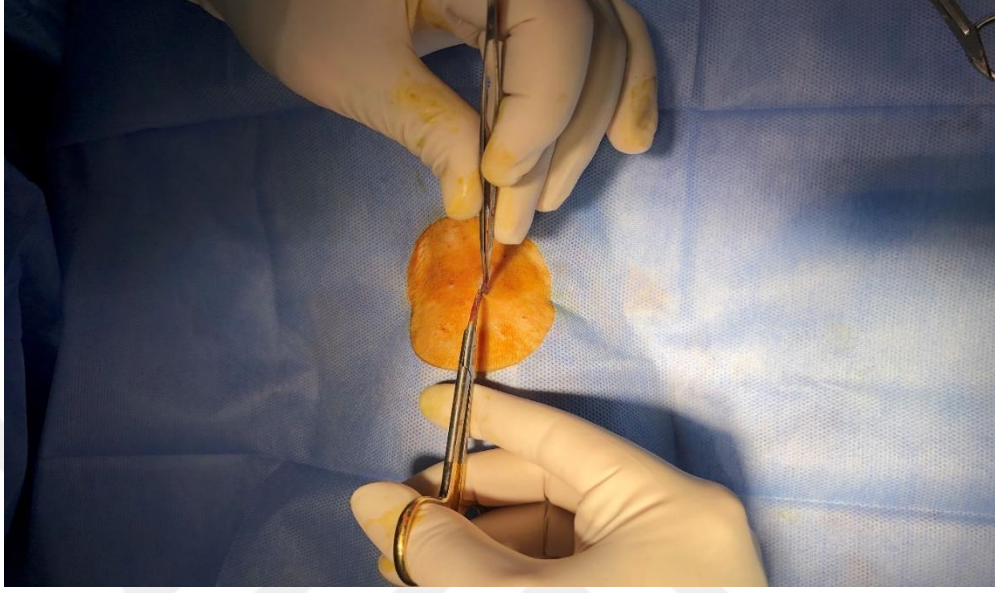
Cerrahi öncesi tüm ratların motor fonksiyonları değerlendirildi.21 ratın motor güçlerinin tam olduğu tespit edildi.

Ratlar tartıldıktan sonra ağırlıklarına uygun dozda yapılan intramusküler Ketamin-Ksilazin anestezisi sonrası; anestezisi derinliği Righting Refleks (Dört ayak üzerine kalkma refleksi) olmaması ve Toe-pinch (Ayak ucunun sıkılması) ile kontrol edildi. Ardından ratlar tespit tahtalarına prone pozisyonunda konumlandırıldı. Torakal bölge önce PVD iyot (Batticon st solüsyon) ile sterilize

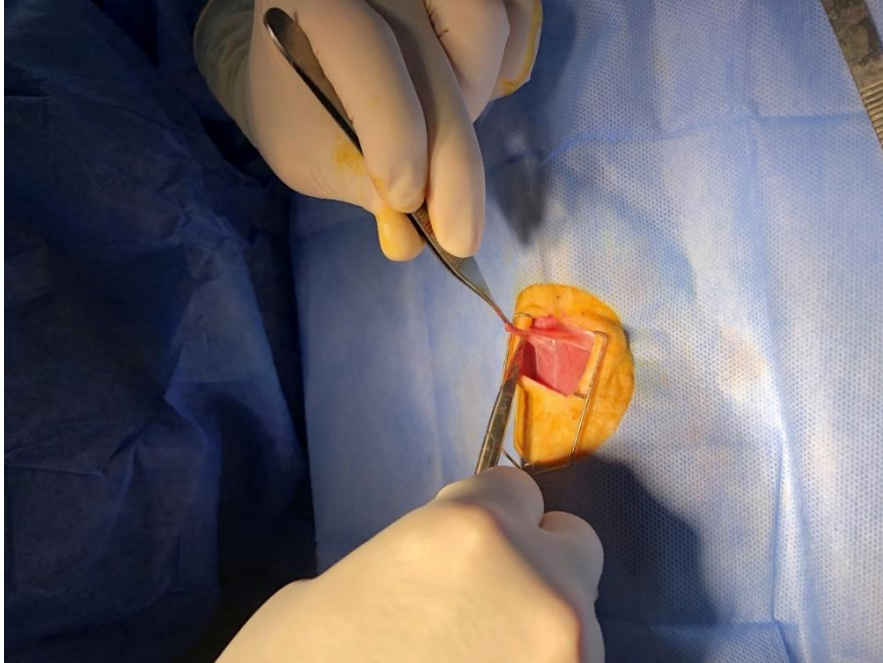
edildikten sonra tıraş edildi; cilt tıraşını takiben tekrar PVD iyot ile sterilizasyon sağlandı. Operasyon boyunca ve anestezi etkisi sonlanana kadar ısıtıcı pedle vücut ısısı 37 °C derecede tutuldu. İnterskapular mesafe referans alınarak T5-T12 seviyesinde 2 cm'lik insizyonla cilt, cilt altı geçilip paravertebral adaleler sıyrılıp, laminalar ortaya konuldu. Ekartör yerleştirildikten sonra elektrikli tur yardımı ile T 7-8-9 mesafelere laminektomi yapıldı. Açığa çıkarılan medulla spinalis segmentinde, duramater intakt bırakılacak şekilde 1 dakika boyunca anevrizma klipi ile bası uygulanarak standart omurilik travması oluşturuldu. Klip süresi sonunda çıkarıldı. Kontrol grubuna sadece laminektomi yapıldı. Deney ve Sham gruplarına laminektomi ve klip kompresyon ile omurilik travması oluşturuldu . Hemostazı takiben paravertebral adaleler anatomik katlarına uygun olarak 3/0 vicryl ile primer sütüre edildi. Cilt 3.0 ipek ile sütüre edildi. PVD iyot (Batticon antiseptik solüsyon) ile ratların yara yeri pansumanları yapıldı.

Ratlar uyandığında motor muayeneleri yapıldı. Omurilik travması oluşturulan 14 sıçanın paraplejik olduğu görüldü.

Resim 8:İnsizyon

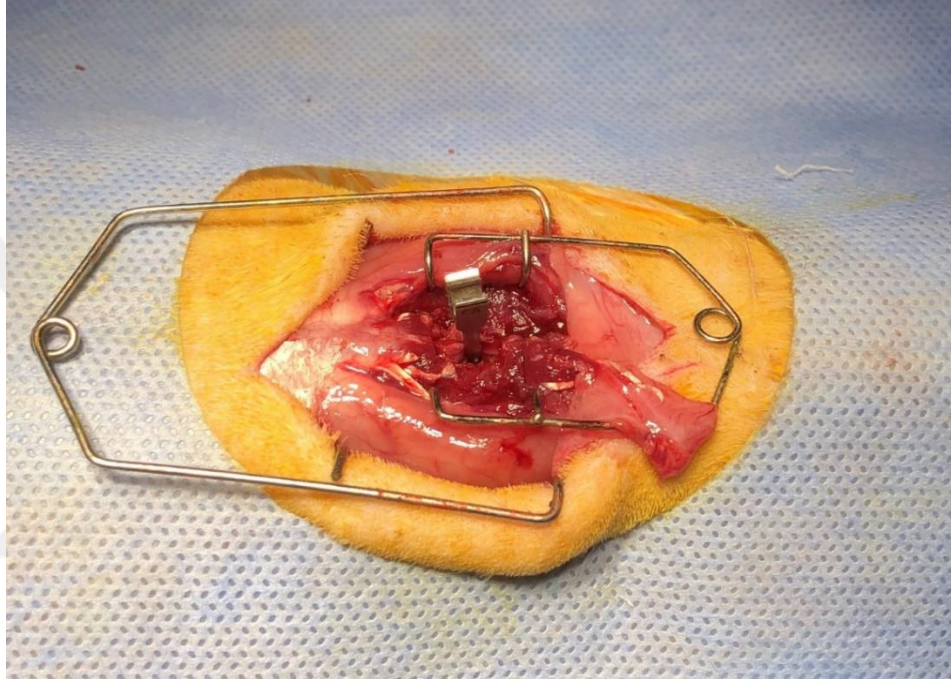


Resim 9:Cerrahi katların açılması

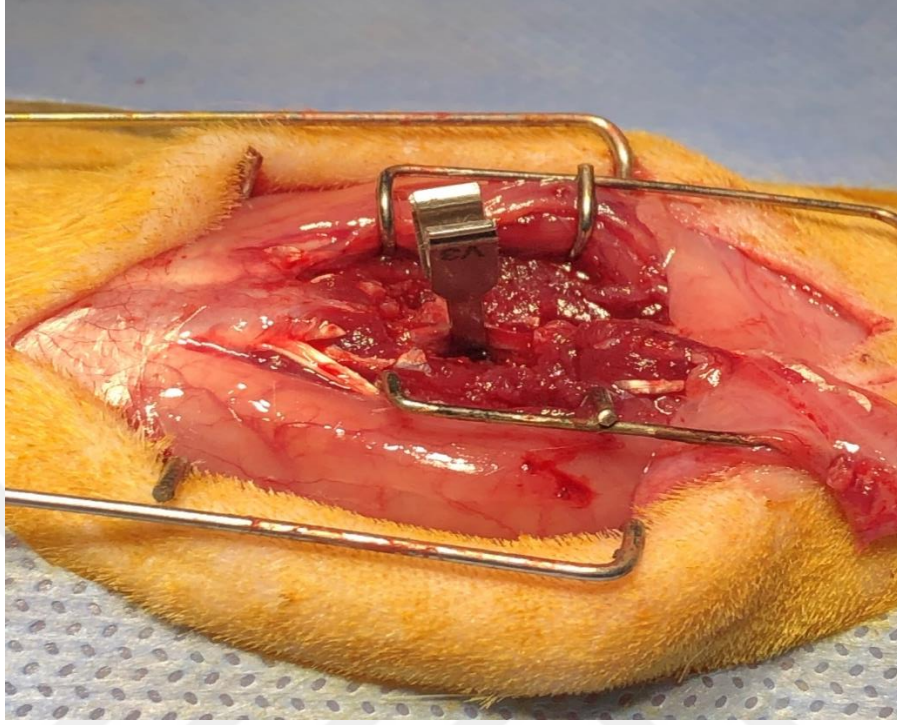


Resim 10:Ekartörlerin yerleştirilmesi, laminektomiyi takiben klip

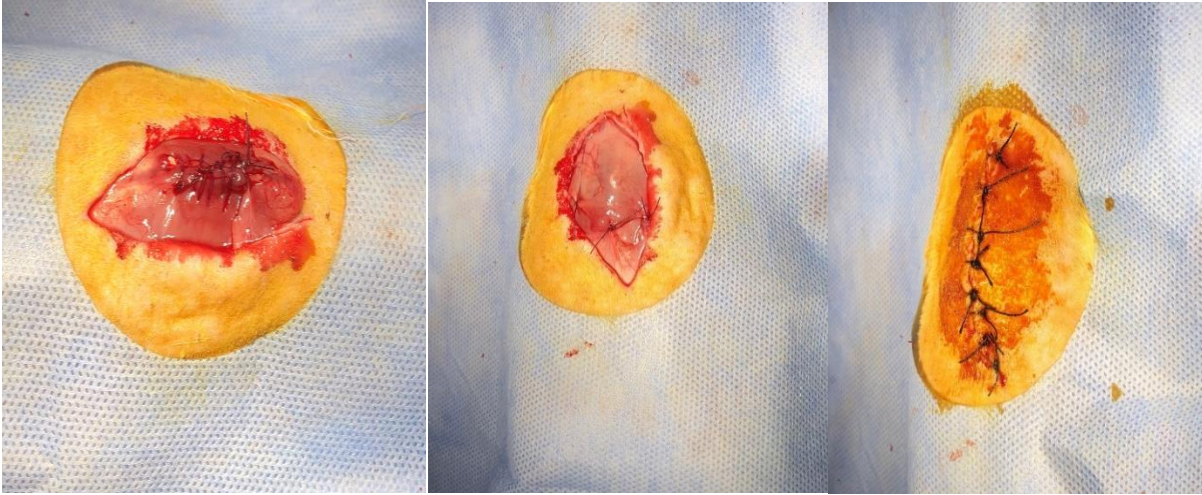
bası uygulanması



Resim 11:Klip kompresyon modeli



Resim 12:Cerrahi katların kapatılması



2.4-Motor Muayene, Eğik Düzlem ve Ayak İzi ile

Değerlendirme:

Ratların motor fonksiyonları Drummond ve Moore Kriterleri ve eğik düzlem kullanılarak 1. (travma öncesi ve sonrası), 3., 5., 7., 10. günlerde toplamda 6 kez kayıt altına alınmıştır. 1. (travma öncesi ve sonrası), 3., 5., 7., 10. günlerde toplamda 6 kez ratların ön ayakları mavi mürekkep arka ayakları kırmızı mürekkep ile boyandıktan sonra ratlar beyaz kağıt üzerinde yürütülerek yürüyüş boyunca kağıda yansıyan ayak izleri kayıt altına alınmıştır.

2.4.1-Motor Muayenede Faydalanılan Drummond ve Moore

Kriterleri:

Motor muayenenin derecelendirilmesinde Drummond ve Moore Kriterleri'nden faydalanılmıştır.(Drummond and Moore, 1989)

Tablo 1: Drummond ve Moore Kriterleri

0	Paraplejik, alt ekstremitelerde motor fonksiyon yok.
1	Alt ekstremitelerde motor fonksiyon zayıf, sadece yer çekimine karşı güç iyi fakat bacaklarını vücudun altına çekemiyor.
2	Orta derecede alt ekstremitelerde motor fonksiyonu, yer çekimine karşı güç iyi fakat bacaklarını vücudun altına çekemiyor.
3	Motor fonksiyon çok iyi, bacaklarını vücudun altına çekip zıplayabiliyor fakat tam normal motor fonksiyon değil.
4	Normal motor fonksiyonu.

2.4.2-Eğik Düzlem ile Değerlendirme :

Rivlin ve Tator tarafından 1977’de tanımlanmış olduğu eğik düzlem ile değerlendirme yöntemi kullanılmıştır. Ratın düzgün zemin üzerinde yere paralel olarak yerleştirilmiş bir tabla üzerine yerleştirilmesini takiben tabla sabit olmayan tarafından yükseltilerek eğimi arttırılmıştır. Ratın tabla üzerinde 5 saniye boyunca düşmeden durabildiği en yüksek açı eğik düzlem açısı olarak kayıt altına alınmıştır . (Rivlin and Tator, 1977)

Resim 13:Eğik düzlem ile değerlendirme



2.4.3-Ayak İzi Analizi:

8cm eninde 50cm uzunluğunda ve kenarları 10cm yükseklikte olan bir yürüyüş yolu düzeneği üzerinde ratların aynı doğrultuda yürümeleri sağlanarak ; yürüyüş yolu üzerine düzeneğin enine uygun kesilen beyaz kağıtlar serilmiştir. Ratların her iki ön ayakları mavi ve her iki arka ayakları kırmızı mürekkep emdirilmiş ıstampaya bastırıldıktan sonra ; her bir rat yürüyüş yolu üzerinde yürütülmüştür. Bu sayede ayak izleri alınmıştır. Genellikle rat siyatik sinir modelinde siyatik sinir fonksiyonel indeksi belirlemek üzere tasarlanan ayak izi analizi yöntemi çalışmamızda kullanılsa da; ayak izleri üzerinde herhangi bir ölçüm yapılmamış olup alınan ayak izlerinde çalışmanın 1. günü cerrahi ve kord kompresyonu ile paraplejik hale gelmiş deney ve sham grubundaki ratların 10. güne doğru özellikle arka ayak izlerinin varlığına ve sayılarına dikkat edilmiştir. Bu bağlamda herhangi bir istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.(Bregman et al., 1993, Fouad et al., 2000, Özmen et al., 2002, Varejão et al., 2001, Varejão et al., 2004)

Resim 14:Ayak izi analizi



2.5-Ağırlık Takibi ile Doz Ayarlaması Yapılan

Vortioxetine'in ve Serum Fizyolojik'in İntraperitoneal Yoldan

Uygulanması :

Tablet formundaki Vortioksetin etken maddesi mermer ecza havanında tamamı toz haline gelene kadar kuvvetlice ezildikten sonra SF ile sulandırılarak “Vortex” (tüp karıştırıcı) cihazında tamamen homojen hale dönene kadar karıştırılmıştır. 20mg etken madde 10cc %0,9 NaCl (SF) içinde dilüe edilmiştir. Böylece yaklaşık 250-350gr ağırlığındaki ratlara 1ml SF’de 2mg Vortioksetin çözündürülerek 1.25 ml- 1.75 ml arasında hacimde olacak şekilde ilaç intraperitoneal yoldan enjeksiyon ile verilmiştir. Sham grubuna, deney grubundaki ratların ağırlıklarına uygun dozda etken madde almalarını sağlayacak SF hacmine eşit miktarda olmak üzere sadece SF intraperitoneal yoldan enjekte edilmiştir. Vortioksetin, 10 gün boyunca her gün deney grubuna uygulanmaya başlanmadan önce ‘Vortex’ yardımı ile SF’de homojenize edildikten sonra verilmiştir.

Spinal travmanın uygulandığı 1. gün deney grubundaki ratlara, ratların hassas ağırlıkları hassas tartı ile kayıt altına alındıktan sonra, 10mg/kg dozunda SF içerisinde çözündürülmüş Vortioksetin intraperitoneal olarak verilmiştir, uygulama 10 gün süresince her gün günde bir kez olarak tekrarlanmıştır.

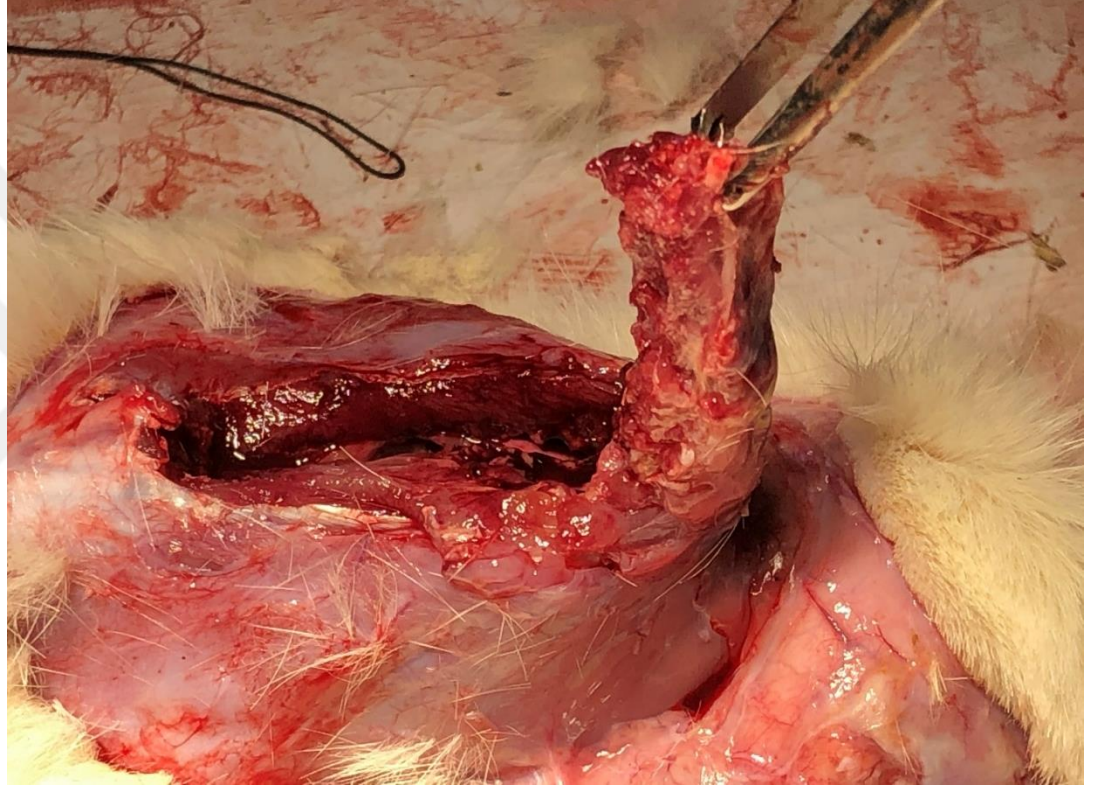
Aynı şekilde sham grubundaki ratlara 10mg/kg dozunda Vortiksetin uygulamasının hacmine eşdeğer, intraperitoneal yoldan SF enjekte edilmiştir. Kontrol grubundaki ratlara herhangi bir ilaç uygulaması yapılmamıştır. Tüm grupların ağırlıkları hassas tartı ile günlük olarak deney boyunca kayıt altına alınmıştır.

2.6-Sakrifikasyon Yöntemi ve Örneklerin Toplanması:

Ratlar tartıldıktan sonra ağırlıklarına uygun dozda intramusküler Ketamin-Ksilazin anestezi yapıldıktan sonra; anestezi derinliği Righting Refleks (Dört ayak üzerine kalkma refleksi) olmaması ve Toe-pinch (Ayak ucunun sıkılması) ile kontrol edildi. Ratlar 3 grup halinde sırayla operasyon masasına alındı. Sırası ile ratlara torakotomi yapılmasını takiben kardiyak eksanguinasyon yapıldıktan sonra; ratlar prone pozisyona alındı. Eski insizyon sahasındaki ipek dikişler alındı. T5-T12 seviyesinde 10 gün önceki 2 cm'lik insizyon, bistüri yardımı ile açıldıktan sonra cilt, cilt altı geçilip paravertebral adaleler sıyrılıp, laminalar ortaya kondu. Ekartör yerleştirildikten sonra T6-T10 arasındaki omurga segmenti inferior ve superiorundan kesilerek kemik doku ile beraber blok halinde eksize edildi. Daha sonra mikrosset yardımı ile kemik doku uzaklaştırılarak yaralanma bölgesi de dahil olarak spinal kord ortaya konuldu. Elevatör ile deney ve sham gruplarındaki 14 ratın T7-T9 arasında yer alan spinal kordlarının klip basısına uğrayan bölgesi yaralanma bölgesinin 1cm inferioru

ve superioru dahil olarak zarar verilmeden çıkarıldı. Kontrol Grubu'ndaki 7 ratın T7-T9 arasında laminektomi yapılan alandan basıya uğramayan spinal kord dokuları alındı. 3 gruptaki 21 adet rattan alınan her bir doku örneği deney ve sham gruplarında yaralanma bölgesi üzerinden olmak kaydıyla bistüri yardımı ile iki parçaya bölündü. Ayrılan parçalardan biri %10 'luk tamponlanmış Formalin çözeltisi ile dolu eppendorf tüpüne -20°C sıcaklıkta saklanmak üzere konuldu. Spinal kord doku örneğinin diğer yarısı ise eppendorf tüplerine yerleştirildikten sonra kuru buz içerisine konuldu. Toplamda 42 adet eppendorf tüpü ratların kulak küpesinde yer alan numaraya göre numaralandırıldı. Formalin çözeltisi ile dolu 21 eppendorf tüpündeki doku örnekleri Hemotoksilen Eozin, Luxol Fast Blue ve Serotonin immün işaretleme boyamaları için Histoloji Laboratuvarı'na verildi. Eppendorf tüplerinde kuru buza konulan diğer 21 numune uygun malzeme ile sıkıca sarıldıktan sonra dış merkezde yaptırılacak ELISA doku çalışması için -80°C sıcaklıktaki dolaba hızlıca aktarıldı.

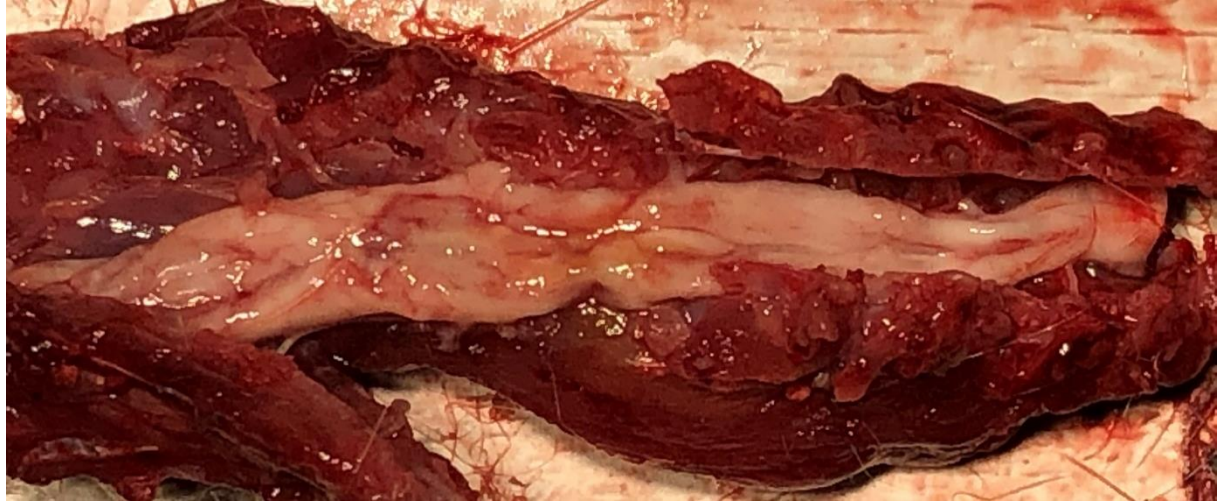
Resim 15:Sakrifikasyon



Resim 16:Sakrifikasyon, rattan alınan blok halinde omurga



Resim 17:Klip basıya uğramış omurilik dokusu

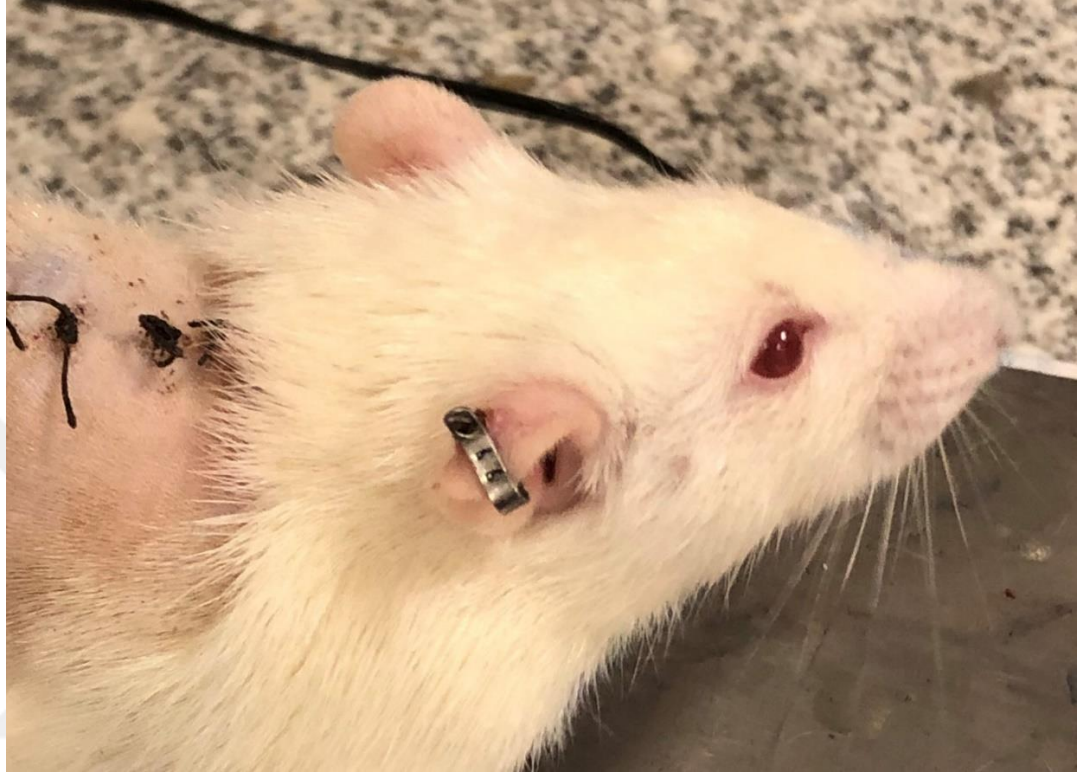


2.7-ELISA Çalışmaları için Test Prosedürleri:

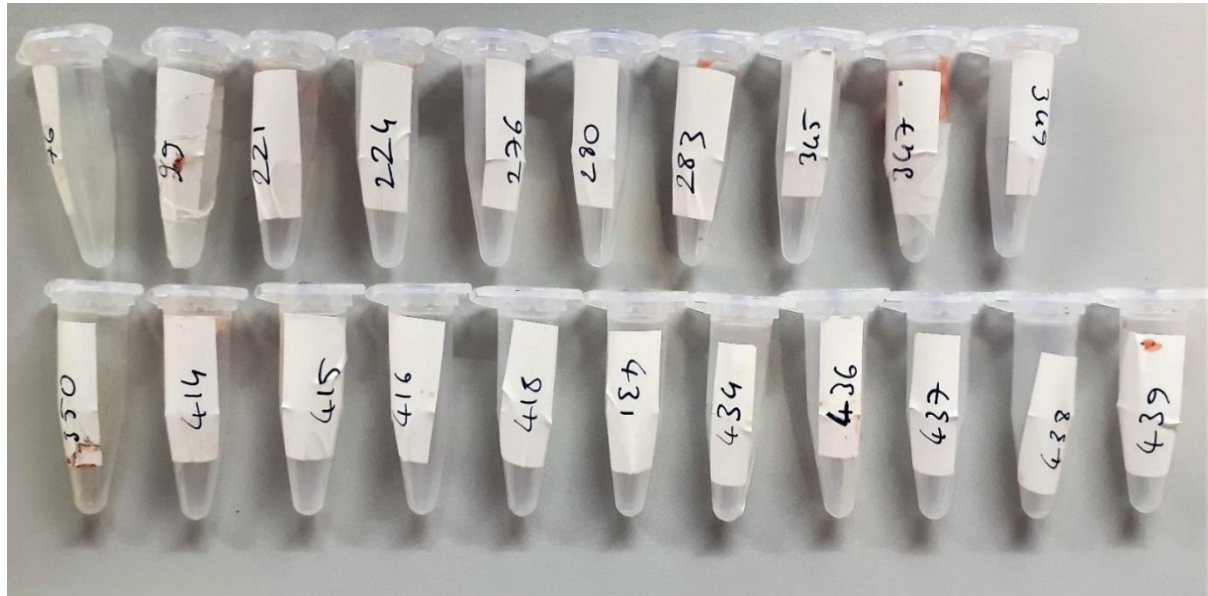
Çalışmanın ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile gerçekleştirilen, ratların sakrifikasyonu sonrası elde edilen ve -80°C’de saklanan spinal kord dokusunda serotonin (ST/5-HT) miktarlarının ölçülmesi aşaması Baran Medikal Sanayi Ticaret Limited Şirketi’nden (Konutkent Mahallesi 3028 Cadde No:2 West Gate C Blok /9 , Çankaya/Ankara) hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir.

ELISA çalışmalarında kullanılan kitler ilgili firma tarafından temin edilmiş ve firmanın laboratuvarlarında çalışılmıştır. ELISA çalışmaları Elabscience® marka kitler ile gerçekleştirilmiş olup ilgili protokoller aşağıda anlatılmıştır.

Resim 18: Kulak küpesi ve ağırlık takibi



Resim 19: Sakrifikasyon ile alınan spinal kord doku örneklerinin
ratların küpe numaralarına göre eppendorf tüplerine yerleştirilmesi



2.7.1- Rat Serotonin Ölçümü İçin ELISA Protokolü:

Bu ELISA kiti, Sandwich-ELISA ilkesini kullanır. Bu kit içinde sağlanan mikro ELISA plakası, Rat Serotonin'ine (Rat ST) özgü bir antikorla önceden kaplanmıştır. Standartlar veya numuneler, mikro ELISA plaka oyuklarına ilave edilir ve spesifik antikorla birleştirilir. Daha sonra Sıçan ST ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü bir biyotinlenmiş tespit antikoru, her bir mikro plakaya art arda eklenir ve inkübe edilir. Serbest bileşenler yıkanır. Substrat çözeltisi her oyuğa eklenir. Yalnızca Rat ST, biyotinlenmiş saptama antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görünmektedir. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve renk sarıya döner. Optik yoğunluk (OD), $450\text{ nm} \pm 2\text{ nm}$ dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. OD değeri, Rat ST konsantrasyonuyla orantılıdır. Numunelerin OD'sini standart eğriyle karşılaştırarak numunelerdeki Rat ST konsantrasyonunu hesaplanır.

2.8-Hemotoksilen-Eozin Boyama Prosedürü :

Parafin kesitler 60-65°C'lik etüvde 30 dakika bekletildikten sonra önce Ksilol I'de 2 dakika, ardından Ksilol II'de 2 dakika bekletildi. Takiben iki defa %100'lük alkolde 1'er dakika bekletilip peşinden iki defa %96'lık alkolde 1'er dakika bekletildi. Akan suda yıkandı ve sonra Hematoksilen boyasında 5 dakika bekletildi. Tekrar akan suda yıkandı. Sonra asit alkole bir kere daldırıldı ve yine akan suda yıkandı. Ardından amonyaklı suda 10 saniye bekletildi ve akan suda yıkandı. Daha sonra %80'lik alkolde 1 dakika bekletildi. Takiben Eozin boyasında 1 dakika bekletildi. İki defa %96'lık alkolde 2'şer dakika bekletildi. İki defa %100'lük alkolde 2'şer dakika bekletildi. Ve son olarak Ksilolde 10 dakika bekletildi, çıkarılıp entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Doku; vakuol oluşumu,ödem,hemoraji,akson ve nöron dejenerasyonu bakımından incelendi.Hasar yüzdesi 0=%0,1= %1-25,2= %25-50, 3=%50-75, 4=%75-100 olarak skorlandı.

2.9-Serotonin İmmün Boyama Çalışmasının Protokolü

(5HT) :

Her bir rat için spinal kord dokularında ayrı ayrı kesitlere serotonin immün işaretlemeleri yapıldı. Örnekler, iki kere 5'er dakika Ksilol'de bekletildikten sonra %100'lük alkolde 5 dakika, %96'lık alkolde 3 dakika, %70'lik alkolde 3 dakika, %50'lik alkolde 3 dakika bekletildi. Sonra distile suda 3 dakika bekletildi. Kesitler sonra PBS' ye alındı.

Taze hazırlanan Citrate Buffer (x10) solüsyonuna alınan kesitler 360°C'de 10 dakika kaynatıldı. Soğuduktan sonra dokuların etrafı pap-pen ile çizildi ve PBS ile yıkandı. Hidrojen peroksit damlatılarak 15 dakika bekletildi. Takiben iki kere PBS ile yıkandı. Serum block (Ultra V Block) damlatılarak 10 dakika bekletildi.

Çalışılacak olan işaretlemeye uygun şekilde serotonin (SigmaAldrich; Cat No: S5545 rabbit polyclonal) antikoru (1:5000 dilüsyon) taze olarak hazırlandı ve her bir kesite 100 µl damlatıldı. Kesitler +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün iki kere PBS ile yıkandı. Biotinylated antikor (sekonder) ile 30 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanarak Streptavidin solüsyonunda 15 dakika bekletildi. PBS ile yıkandı.

Taze hazırlanan Diaminobenzidin (DAB) solüsyonu damlatılarak 5dk. bekletildi. Distile su ile yıkandı. Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Distile su ile yıkanan kesitler alkol serilerinden geçirildi. Ksilol ile 5 dakika şeffaflaştırıldıktan sonra lamel ile kapatıldı.

Örnekler 40X büyütme ile on alanda immün pozitif hücreler ve boyanma yoğunlukları açısından değerlendirildi. Spinal kord örneklerinin immünhistokimyasal incelemesinde boyanma yoğunlukları “0= yok, 1= %0 – 25, 2= %25 – 50, 3= %50 – 75, 4= %75 – 100” olarak skorlandı.

2.10-Luxol Fast Blue Boyama Prosedürü:

Deparafinizasyon (60-64°C’lik etüvde 30 dakika) işleminden geçirilen kesitler, % 95’lik alkole alındı. Luxol Fast Blue boyasında 60°C’lik etüvde bir gece bekletildi. % 95’lik alkole alınıp boya artıkları giderildi. Distile suda yıkandı. Lityum karbonatta 10 sn. tutuldu. %70’lik alkole alındı. Bu aşamada kesitlere mikroskopta bakılarak gri madde renksiz, beyaz madde yeşilimsi mavi olana kadar lityum karbonat ve alkol aşaması tekrarlandı. Distile suya alındı.

Kristal viole solüsyonunda 6 dk. bekletildi.% 95’lik alkolde birkaç defa bekletildi. Absolü alkole alındı. Ksilende 2 defa 2dk. bekletildikten sonra entellan dökülerek kesitler kapatıldı. Sonuçta myelin mavi, sinir hücreleri pembe-mor görüldüler.

LFB boyanması miyelinizasyonu gösterir. Myelinli doku alanı maviye boyanır.

1: normal miyelinizasyon, 2: az demiyelinizasyon (>%50 myelin boyanması), 3: şiddetli demiyelinizasyon (<%50 myelin boyanması) olarak skorlandı.

2.11-İstatistiksel Analiz:

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Shapiro-Wilk Testi) kullanılarak incelenmiştir. Verilerin tamamının normal dağılım göstermediği tespit edilmiştir. Tanımlayıcı analizler yüzde olarak ve sürekli değişkenler için ortalama±standart sapma(SS) ve medyan(minimum-maksimum) değerleri kullanılarak verilmiştir.Ordinal (sıralı) değişkenlerin deney grupları ile ilişkisini değerlendirirken ‘linear-by-linear association (Mantel-Haenszel test

of trend)' analiziyle değerlendirilmiştir. Kategorik verilerin analizinde ki-kare veya Fisher's exact testi de kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan verilerde, ikiden fazla grupların karşılaştırılması Kruskal-Wallis Testi kullanılarak analiz edilmiştir. Kruskal-Wallis testi sonucu anlamlı çıkan grupların ikili gruplarının değerlendirilmesi Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Bonferroni düzeltmesiyle l grupların ikili grup değerlendirmesinde istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $P \leq 0,017$ olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar %95 güven aralığında, istatistiksel hata payı 0,05 olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel değerlendirme Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 25.0 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL) programı kullanılarak yapılmıştır.

3.BULGULAR:

3.1-Drummond Moore Kriterleri ile Motor Muayene:

Tablo 2:Drummond Moore Kriterleri ile yapılan motor muayene sonuçları

	Deney		SHAM		Kontrol		P
	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	
Motor Muayene							
Preop	4±0	4(4-4)	4±0	4(4-4)	4±0	4(4-4)	1,000
Postop	0±0	0(0-0)	0±0	0(0-0)	4±0	4(4-4)	<0,001
3. Gün	1±0,58	1(0-2)	0±0	0(0-0)	4±0	4(4-4)	<0,001
5. Gün	1,29±0,76	1(0-2)	0,14±0,38	0(0-1)	4±0	4(4-4)	<0,001
7. Gün	1,43±0,79	2(0-2)	0,14±0,38	0(0-1)	4±0	4(4-4)	<0,001
10. Gün	1,43±0,79	2(0-2)	0±0	0(0-0)	4±0	4(4-4)	<0,001

¹Kruskal Wallis

Motor muayene karşılaştırması yapılan 3 grubun motor güçleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı farkı olduğu tespit edilmiştir.

Bonferroni düzeltmesi, birkaç bağımlı veya bağımsız istatistiksel testin tek bir veri seti üzerinde aynı anda gerçekleştirilmesi durumunda p değerlerinde yapılan bir ayarlamadır. Çalışmanın istatistiksel gücü daha sonra bu değiştirilmiş p değerine göre hesaplanır. Bonferroni düzeltmesi, tek bir veri setinde birden fazla çift yönlü test yapıldığında yanlış pozitif sonuçları elde etme şansını azaltmak için kullanılır. Motor muayenelerin değerlendirmesinde grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında Bonferroni düzeltmesi yapılmıştır; buna göre istatistiksel anlamlılık için sınır $p \leq 0,017$ olarak kabul edilmiştir.(Napierala, 2012)

1. gün post operatif yapılan motor muayenelerin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında post operatif muayenelerde farkı yaratan kontrol grubudur. Gruplar ikili karşılaştırıldıklarında sham-kontrol ($p=0,001$) ve deney-kontrol grupları ($p=0,001$) arasında istatistiksel anlamlılık olduğu, deney-sham gruplarının ikili karşılaştırmasında ise istatistiksel fark olmadığı görülmüştür. ($p=1,000$)

3. gün yapılan motor muayene kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında; sham-kontrol($p=0,001$) ve deney-kontrol($p=0,001$) grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı fark mevcutken, deney-sham($p=0,004$) arasında da istatistiksel anlamlı farkın olduğu görülmektedir.(Bonferroni düzeltmesinden dolayı sınır $p \leq 0,017$.)

5. günde yapılan motor muayenelerin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında sham-kontrol($p=0,001$) ve deney-kontrol($p=0,001$), deney-sham($p=0,008$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur.($p=0,008$, Bonferroni düzeltmesinden dolayı sınır $p \leq 0,017$ 'dir.)

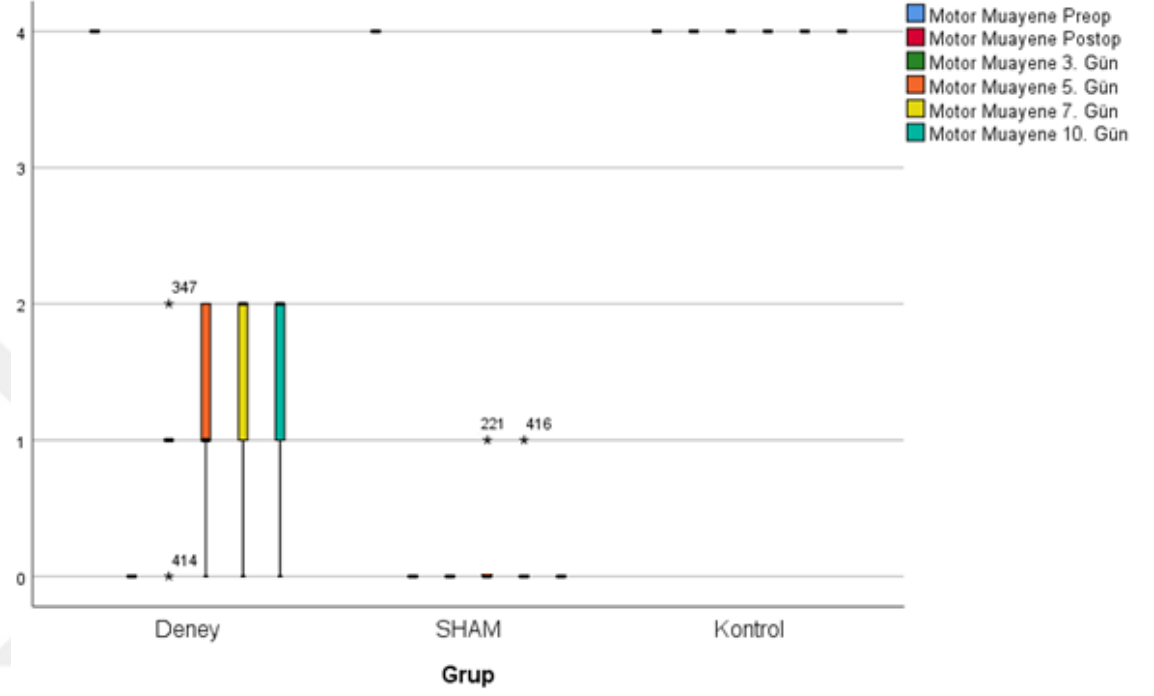
7. günde yapılan motor muayenelerin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında sham-kontrol($p=0,001$); deney-kontrol grupları($p=0,001$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark devam ederken , deney-sham($p=0,011$) gruplarının ikili karşılaştırmasında istatistiksel farkın deney grubu lehine devam ettiği görülmektedir. Tüm ikili gruplar arasında anlamlı fark olup, deney-sham grupları ikili karşılaştırması arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur.

10. günde yapılan motor muayenelerin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında sham-kontrol ($p=0,001$); deney-kontrol($p=0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark devam ederken, deney-sham($p=0,004$) grupları arasında anlamlı farkın daha ileriye taşındığı görülmektedir.



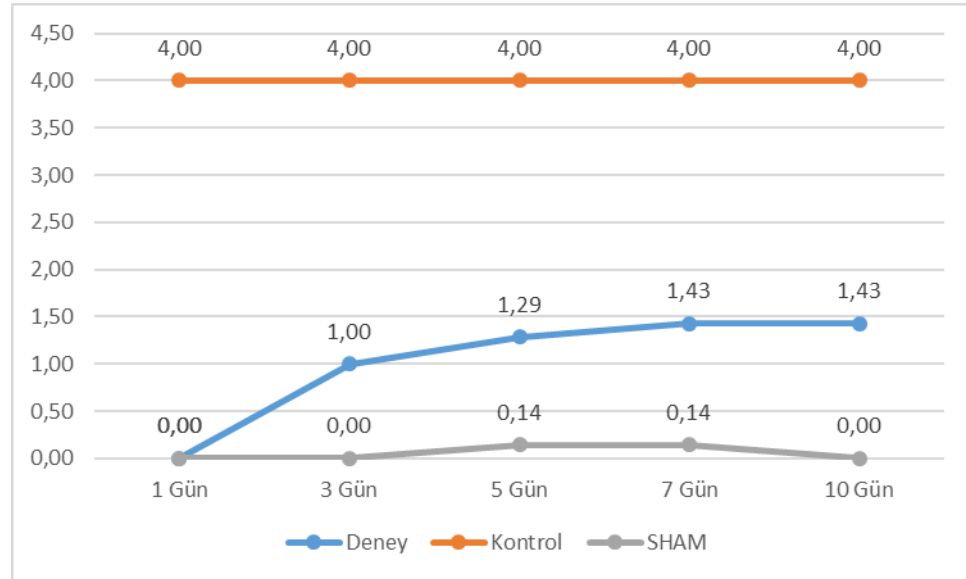
Grafik 1: Grupların motor muayene durumlarının karşılaştırması

boxplot grafiği



Grafik 2: Grupların motor muayene ortalamalarının karşılaştırması

grafiği



3.2-Eğik Düzlem ile Değerlendirme:

Tablo 3:Eğik düzlem ile değerlendirilen ratların açılı dereceleri

	Deney		SHAM		Kontrol		P
	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	
Eğik Düzlem Açısı							
Preop	60±0	60(60-60)	60±0	60(60-60)	60±0	60(60-60)	1,000
Postop	33,57±3,78	35(30-40)	32,14±4,88	30(25-40)	47,14±8,09	50(35-60)	0,004
3. Gün	42,86±4,88	45(35-50)	33,57±4,76	35(25-40)	57,86±3,93	60(50-60)	<0,001
5. Gün	45,71±4,5	45(40-50)	35±4,08	35(30-40)	60±0	60(60-60)	<0,001
7. Gün	49,29±4,5	50(45-55)	32,86±2,67	35(30-35)	60±0	60(60-60)	<0,001
10. Gün	49,29±4,5	50(45-55)	32,86±2,67	35(30-35)	60±0	60(60-60)	<0,001
¹ Kruskal Wallis							

1. gün post operatif yapılan eğik düzlem değerlendirmesinin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında sham-kontrol (p=0,002); deney-kontrol (p=0,004) grupları arasında anlamlı fark vardır. Deney-sham grupları (p=0,620) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. (Bonferroni düzeltmesinden dolayı sınır $p \leq 0,017$ 'dir.)

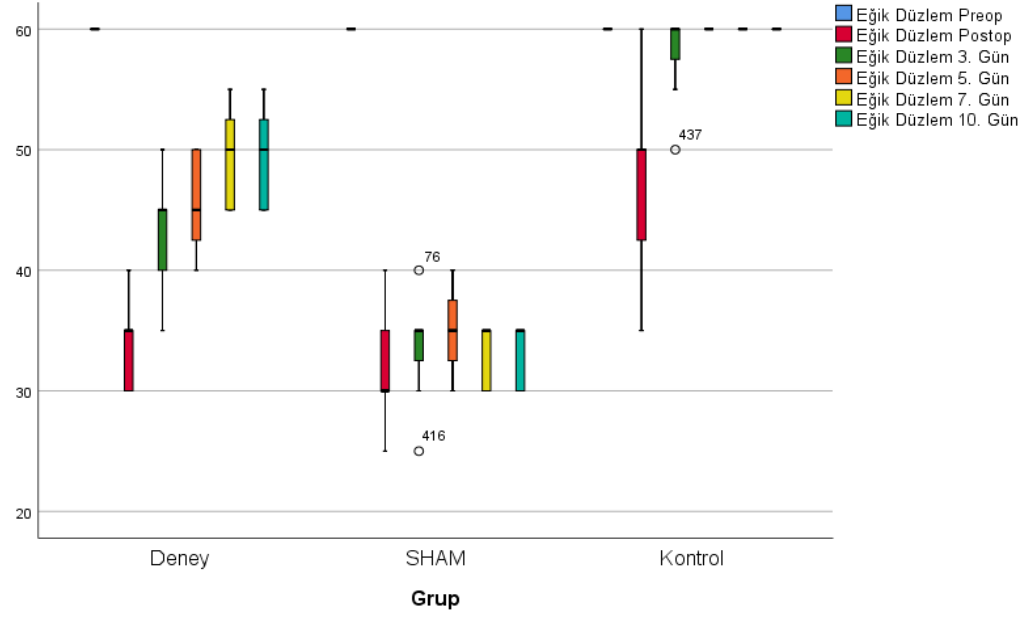
3. günde yapılan eğik düzlem değerlendirmesinin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında sham-kontrol($p=0,001$); deney-kontrol($p=0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark devam ederken, deney-sham grupları arasındaki istatistiksel anlamlı farkın da olduğu görülmektedir.($p=0,007$)

5. günde yapılan eğik düzlem değerlendirmesinin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında; sham-kontrol($p=0,001$), deney-kontrol($p=0,001$) ve deney-sham ($p=0,001$) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur.

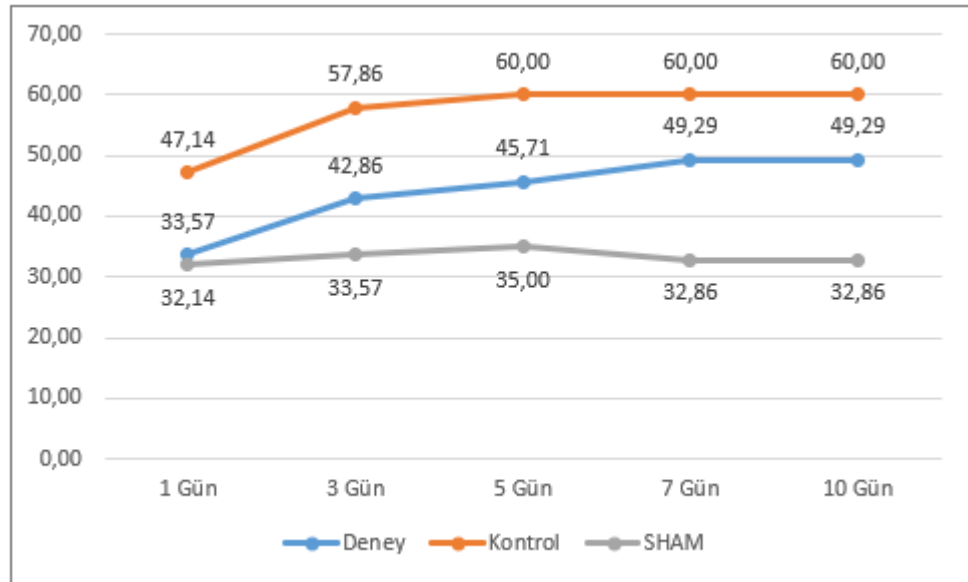
7. günde yapılan eğik düzlem değerlendirmesinin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında; sham-kontrol($p=0,001$); deney-kontrol($p=0,001$) ve deney-sham grupları ($p=0,001$) arasında, yani tüm ikili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur.

10. günde yapılan eğik düzlem değerlendirmesinin kayıtlarında grupların ikili karşılaştırmalarına bakıldığında; sham-kontrol($p=0,001$); deney-kontrol($p=0,001$) ve deney-sham($p=0,001$) grupları arasında, yani tüm ikili gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark mevcut olduğu görülmektedir.

Grafik 3: Grupların eğik düzlem açılarının karşılaştırması boxplot grafiği



Grafik 4: Grupların eğik düzlem aç ortalamalarının karşılaştırması grafiği



3.3-Ayak izi analizi:

Resim 20: Deney grubu 224 numaralı ratın sırası ile preoperatif, postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri



Resim 21: Deney grubu 349 numaralı ratın sırası ile preoperatif,
postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri



Resim 22: Sham grubu 415 numaralı ratın sırası ile preoperatif, postoperatif, 3., 5., 7., 10. günlerdeki ayak izleri



3.4-Ağırlık(gr):

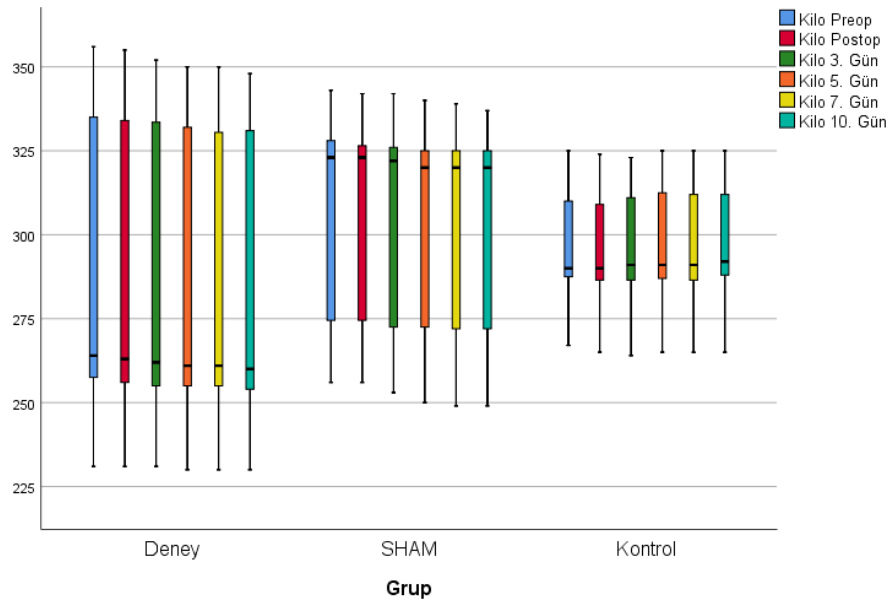
Tablo 4:Ağırlık takibi

	Deney		SHAM		Kontrol		P
	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	
Kilo (gr)							
Preop	290,86±50,3	264(231-356)	303,86±34,57	323(256-343)	296,71±19,64	290(267-325)	0,690
Postop	289,86±50,14	263(231-355)	303,29±34,03	323(256-342)	295,71±19,81	290(265-324)	0,690
3. Gün	288,86±49,58	262(231-352)	302±35,14	322(253-342)	296,14±20,33	291(264-323)	0,690
5. Gün	287,86±48,95	261(230-350)	300,71±35,06	320(250-340)	297,14±20,71	291(265-325)	0,748
7. Gün	287,43±48,46	261(230-350)	300,29±35,28	320(249-339)	296,86±20,69	291(265-325)	0,780
10. Gün	286,86±48,49	260(230-348)	300±34,92	320(249-337)	297,43±20,48	292(265-325)	0,732

¹Kruskal Wallis

Ratların ağırlıkları arasında gruplar arası fark bulunmamaktadır.

Grafik 5:Ağırlık takibi boxplot grafiği



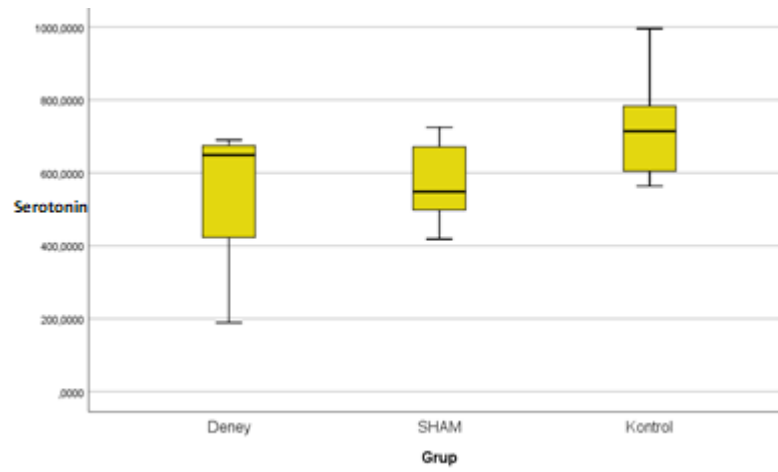
3.5-Serotonin Düzeyi:

Tablo 5:ELISA ile serotonin düzeyi

	Deney		SHAM		Kontrol		P
	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	Ort±SS	Medyan (Min-Maks)	
Serotonin Düzeyi	531,99±191,85	648,92 (189,15-690,39)	575,92±119,44	548,41 (418,39-725,02)	683,35±220,68	714,28 (297,69-995,58)	0,286
¹ Kruskal Wallis							

İstatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır.(p=0,286)

Grafik 6: Grupların serotonin düzeylerinin karşılaştırılması boxplot grafiği



Tablo 6: ELISA sonuçları

Numune	Absorbans	Sonuç
76	2,456	451,95
99	2,297	297,6894
221	2,542	548,4173
224	2,429	423,5507
276	2,64	669,4971
280	2,624	648,9176
283	2,656	690,3933
345	2,539	544,8982
347	2,648	679,9056
349	2,428	422,5161
350	2,61	631,1702
414	2,159	189,1505
415	2,682	725,0249
416	2,424	418,3905
418	2,672	711,6061
431	2,621	645,0942
434	2,867	995,5836
436	2,772	851,3603
437	2,674	714,28
438	2,675	715,6188
439	2,555	563,7956

Numune numaraları; numunenin alındığı ratın küpe numarasıdır.

Deney grubu: 349- 224- 276- 414- 283- 280- 347

Sham grubu: 345- 415- 418- 416- 221- 76- 350

Kontrol grubu: 431- 438- 437- 439-99- 434-436

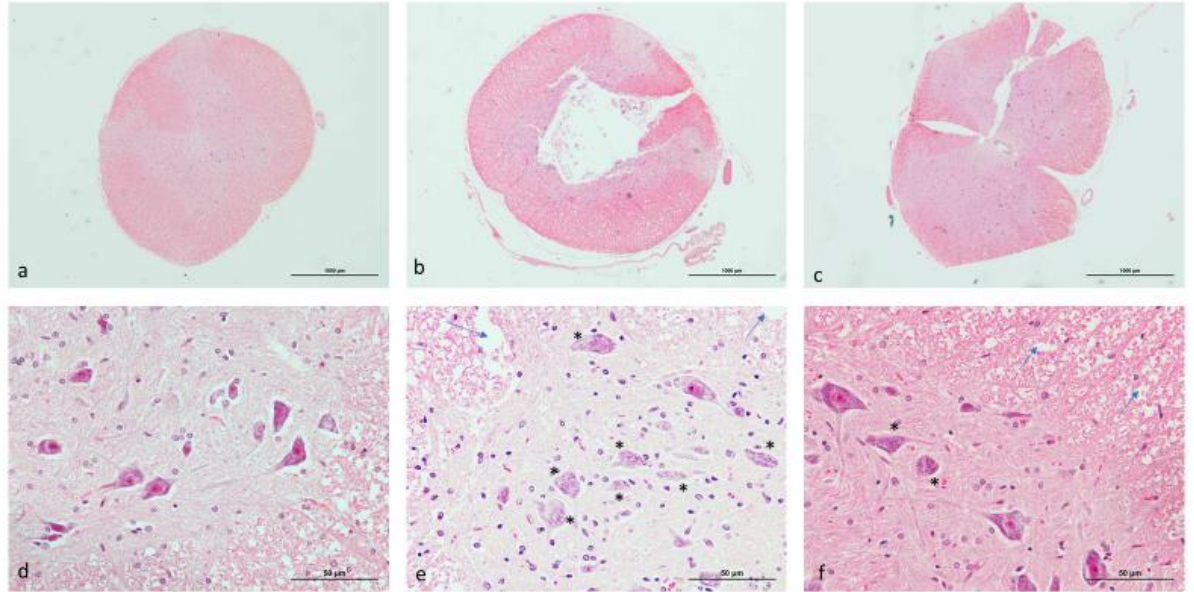
3.6-Histolojik Veriler:

3.6.1-Kullanılan Işık Mikroskobu:

Nicon Eclipse 80i light microscope kullanılmıştır.

3.6.2- H&E Boyama:

Resim 23: Deneyden 10 gün sonra H&E ile boyanmış spinal cord enine kesit



a.Kontrol grubu spinal cord normal doku görünümü. X20 büyütme.

H&E boyama.

b. Sham grubu spinal cord hasarı sonrası genel doku görünümü.

Doku bütünlüğü bozulmuş. X20 büyütme. H&E boyama.

c. Deney grubu, genel doku görünümü. Sham grubuna göre doku

bütünlüğü normale daha yakın. X20 büyütme. H&E boyama.

d. Kontrol grubu spinal cord normal nöron ve akson yapısı. X200

büyütme. H&E boyama.

e. Sham grubu spinal cord hasarı sonrası nöron ve akson yapısı.

Aksonal hasar (*), nöron dejenerasyonu (ok) ve nöron boyutlarında

küçülme mevcut. X200 büyüme. H&E boyama.

f. Deney grubu nöron ve akson yapısı. Hasarlı akson ve dejenere nöron sayısı

sham grubuna oranla daha az. X200 büyütme. H&E boyama.

Tablo 7:Hasar yüzdesi

Hasar yüzdesi	Kontrol	Sham	Deney	p
H&E (%) n(%)				0,022
0	7(100)	0(0)	0(0)	
1-25	0(0)	0(0)	3(42,9)	
26-50	0(0)	2(28,6)	3(42,9)	
51-75	0(0)	3(42,9)	1(14,3)	
76-100	0(0)	2(28,6)	0(0)	

Linear-by-Linear Association

Kontrol ve deney gruplarında hasar yüzdesi arttıkça

yüzdelik dilimlerdeki rat sayısında azalma olurken sham grubunda

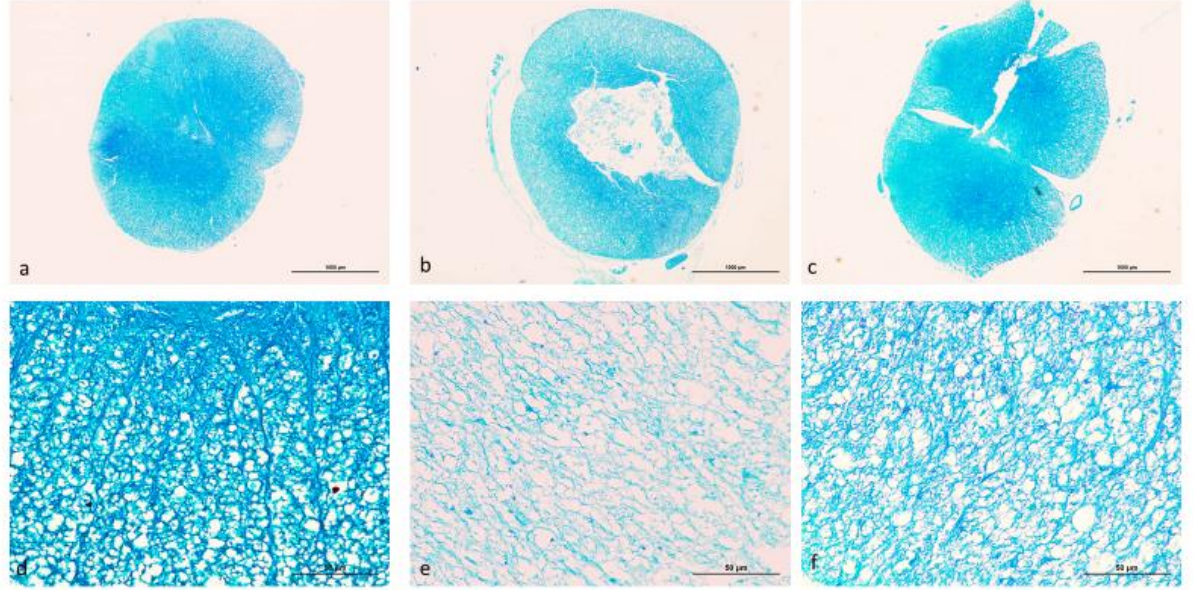
hasar yüzdesinin fazla olduğu dilime doğru rat sayısında artış tespit

edilmiş olup bu linear by linear ilişki analizine göre istatistiksel

olarak anlamlıdır.(P=0,022)

3.6.3- LFB Boyama:

Resim 24: Deneyden 10 gün sonra LFB ile boyanmış spinal cord enine kesit



(Merkezde substantia alba, çevresinde substantia grisea. Boya yoğunluğu myelinizasyon ölçütüdür.)

a.Kontrol grubu spinal cord normal doku görünümü. X20 büyütme.

LFB boyama.

b. Sham grubu spinal cord hasarı sonrası genel doku görünümü.

Doku bütünlüğü bozulmuş. X20 büyüme. LFB boyama.

c. Deney grubu, genel doku görünümü. Sham grubuna göre doku

bütünlüğü daha normale yakın. X20 büyütme. LFB boyama.

d. Kontrol grubu spinal cord substansia alba. Normal

miyelinizasyon. X200 büyütme. LFB boyama.

e. Sham grubu spinal cord substansia alba. Demiyelinizasyon

gözlenmekte. X200 büyüme. LFB boyama.

f. Deney grubu spinal cord substansia alba. Demiyelinizasyon sham

grubuna oranla daha az. X200 büyütme. LFB boyama.



Tablo 8:Normal Miyelinizasyon-Az ve Şiddetli Demiyelinizasyon

	Kontrol	Sham	Deney	p
LFB n(%)				0,720
Normal Miyelinizasyon	6(85,7)	1(14,3)	5(71,4)	
Az Demiyelinizasyon	1(14,3)	3(42,9)	2(28,6)	
Şiddetli Demiyelinizasyon	0(0)	3(42,9)	0(0)	

Linear-by-Linear Association

Linear by linear ilişki analizine göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.(p=0,720) Fakat tabloda görüleceği üzere spinal travma sonrası parapleji gelişen ardından günde bir kez intraperitoenal yoldan Vortiksetin verilerek 10 günlük takibin sonucundaki sakrifikasyon sonrası yaralanma bölgesindeki spinal kord doku örneklerinde Luxol Fast Blue boyama yapılan deney grubundaki ratların %71,4'ü normal miyelinizasyon ile karşımıza çıkmıştır.Oysa ki spinal travma sonrası parapleji gelişen ardından günde bir kez intraperitoenal yoldan SF verilerek 10 günlük takibin sonucundaki sakrifikasyon sonrası yaralanma bölgesinden alınan spinal kord doku örneklerinde Luxol Fast Blue boyama yapılan sham grubundaki ratların %14,3'ünde normal miyelinizasyon mevcut olup %42.9'unda ise şiddetli demiyelinizasyon görülmüştür.

Tablo 9:Demyelinizasyon

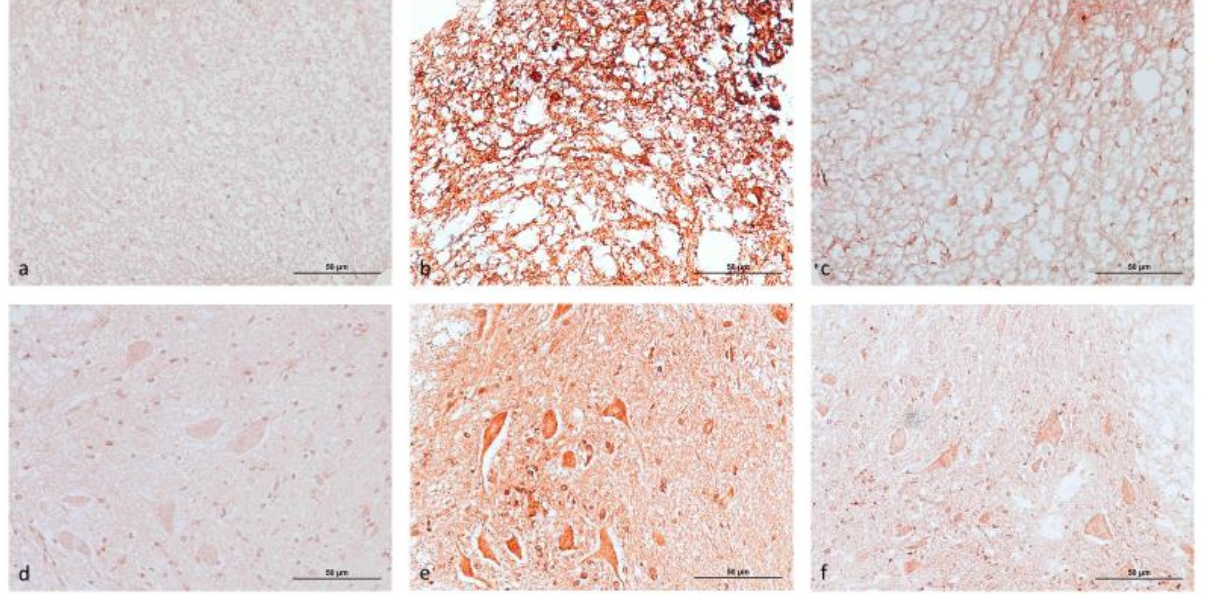
Demyelinizasyon	Yok	Var	p
Gruplar			0,017
Kontrol	6(50)	1(11,1)	
Sham	1(8,3)	6(66,7)	
Deney	5(41,7)	2(22,2)	

Fisher's exact test

İstatistiki olarak Luxol Fast Blue boyamada demyelinizasyon varlığı üzerinden bakıldığında ; sham grubunda kontrol grubuna göre daha fazla patoloji görülmektedir.($P < 0,01$) Sham ile deney grupları ($p=0,030$) ve deney ile kontrol grupları ($p=0,514$) karşılaştırıldığında bonferroni düzeltmesine göre sınır 0,017 olduğundan dolayı istatistiksel fark yoktur.Yine bu durum denek sayısının az olmasına bağlanmıştır.Demyelinizasyon görülen ratların %66,7'si sham grubundaki , %22,2'si deney grubundaki ve % 11,1 'i kontrol grubundaki ratlardan oluşmaktadır.

3.6.4- Serotonin İmmün İşaretleme:

Resim 25: Deneyden 10 gün sonra serotonin immün işaretleme



(Spinal cord enine kesit. Boyanma şiddeti; serotonin varlığını gösterir.)

a. Kontrol grubu spinal cord substansia alba. Aksonlarda serotonin varlığı gözlenmemektedir. X200 büyütme. Serotonin immün işaretleme.

b. Sham grubu spinal cord hasarı sonrası substansia alba. Aksonlarda boyanma yoğunluğu artmıştır. X200 büyüme. Serotonin immün işaretleme .

c. Deney grubu, substansia alba. Aksonlarda boyanma yoğunluğu azdır. X200 büyütme. Serotonin immün işaretleme .

d. Kontrol grubu spinal cord substansia grisea. Alanda serotonin varlığı gözlenmemektedir. X200 büyütme. Serotonin immün işaretleme .

e. Sham grubu spinal cord hasarı sonrası substansia grisea. Alanda; serotonin pozitif hücre gözlenmektedir. X200 büyütme. Serotonin immün işaretleme .

f. Deney grubu, substansia grisea. Alanda; serotonin pozitif hücre gözlenmektedir. Boyanma yoğunluğu sham grubuna göre azdır. X200 büyütme. Serotonin immün işaretleme .

Tablo 10:Serotonin Boyama

	Kontrol	Sham	Deney	p
Serotonin Boyama (%) n(%)				
0	3(42,9)	1(14,3)	1(14,3)	0,354
1-25	4(57,1)	3(42,9)	5(71,4)	
26-50	0(0)	1(14,3)	1(14,3)	
51-75	0(0)	2(28,6)	0(0)	

Linear-by-Linear Association

Linear by linear ilişki analizine göre istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.(p=0354)

4.TARTIŞMA:

Omurilikte hasar, hem yaralanma anında (primer) hem de sonrasında (sekonder) meydana gelir. Primer kord yaralanması, kordu çevreleyen bağlar ve omurlar gibi destekleyici yapıların, kordun kendisinin veya kan akışının kesinti ya da baskıya uğraması sonucunda gerçekleşir. Sekonder yaralanma ise hipotansiyon, hipoksemi, hemoraji ve kord ödemi gibi bir dizi lokal veya sistemik sürecin bir sonucu olarak primer yaralanmanın alevlenmesidir. Bu mekanizmalar, zaten hasar görmüş kordun perfüzyonunu ve oksijen iletimini bozar. Primer kord yaralanmasını tersine çevirmek için yapılabilecekler oldukça sınırlıyken, sekonder yaralanmayı önlemek veya en aza indirmek için yapılabilecekler çoktur.(Patek and Stewart, 2020)

Yapılan çalışmalarda spinal kord yaralanması sonrası tedavide steroid verilen grupların yara enfeksiyonları, pnömoni ve sepsis gibi komplikasyon oranlarında klinik olarak önemli artışların bulunduğu belirtilmiştir.(Sultan et al., 2020, Patek and Stewart, 2020) Netice olarak, spinal kord yaralanmasının tedavisinde steroidler şu anda önerilmemektedir.(Patek and Stewart, 2020, Miğkisiak et al., 2019, Hurlbert et al., 2015, Walters et al., 2013)

Bu bağlamda tedavide yeni ajanların araştırılması önem arz etmektedir.

Bu çalışma da Vortiksetin'in spinal travma modelinde sekonder yaralanmanın önlenmesi ve/veya nörorejenerasyon üzerine olabilecek etkilerini araştırmak üzere planlanmıştır.

4.1-Deneysel Rat Omuriliği Yaralanma Modeli:

Klip sıkıştırma modeli, kord yaralanmasından sonra akut patofizyolojiyi, dekompresyonun zamanlamasını ,elektrik stimülasyonu ve nöroprotektif ajanlar gibi potansiyel tedavileri incelemek için çok değerli bir ortam sağladığı için bu çalışmada klip sıkıştırma modeli tercih edilmiştir.(Kwon et al., 2002)

Çalışmamızda deney ve sham gruplarındaki 14 adet ratın kendilerine yapılan klip kompresyonu sonrasındaki post op motor muayenelerine bakıldığında ;hepsinin paraplejik vaziyette olduğu görülmüştür.Uygulanan deneysel rat omuriliği yaralanma modeli sayesinde çalışmanın devamı için zemin hazırlanmıştır.

4.2-Cerrahi:

Deneysel prosedürlerin standart hale getirilmesi arzu edildiğinden, omurilik yaralanmalarıyla ilgili çalışmaların kesin anatomik bölgelerde yapılması gerektiği göz önünde bulundurularak; çalışmamızdaki tüm ratlara interskapular mesafe referans alınarak; Torakal 5-Torakal 12 vertebralar seviyesinden insizyon yapılmış olup;Torakal 7-8-9 seviyelerinde total laminektomi uygulanmıştır.(de Medinaceli, 1986) Kontrol grubunda cerrahi bu şekilde tamamlanıp açılan katlar kapatılırken, deney ve sham gruplarında kord basısı yapıldıktan sonra tüm katlar usulüne uygun olarak kapatılmıştır. Post operatif dönemde rat kaybı

yaşanmamıştır. Post operatif muayenede deney ve sham grubundaki 14 ratta parapleji geliştiği görülmüştür. Kontrol grubundaki 7 ratın post operatif motor muayeneleri tam güçtedir. Ratların post operatif takiplerinde yara yerlerine düzenli pansuman yapılmıştır. Yapılan cerrahi işlemin sonucu çalışmanın devamı için istenilen düzeyde gerçekleşmiştir.

4.3-Sakrifikasyon:

Sakrifikasyon işleminde kardiyak eksanguinasyon uygulanmış olup, sonrasında cerrahi alan açılıp T6-T10 arasındaki omurga segmenti inferior ve superiorundan kesilerek kemik doku ile beraber blok halinde eksize edildikten sonra mikrosset ile kemik dokular ayrıştırılıp; spinal kordun yaralanma bölgesindeki doku örneğinin sakrifikasyon esnasında etkilenmesinin olabildiğince önüne geçilmeye çalışılmıştır.

Bu sayede çalışmanın histoloji ayağında daha doğru sonuçların alınması hedeflenmiştir. Nitekim kontrol grubunda yer alan ve sadece laminektomi yapılan ratlardan alınan 7 farklı doku örneğinin H&E boyamalarında hasar yüzdesi %0 olarak görülmüştür, aynı doku örneklerinin LFB boyamalarına bakıldığında; örneklerden 6'sı normal miyelinizasyonda iken sadece bir ratın doku örneğinde laminektomi esnasında olduğu düşünülen hafif demiyelinizasyon görülmüştür. Dolayısı ile sakrifikasyon esnasında; cerrahi ile oluşturan klip kompresyon modelinin yanında spinal korda ek travma yaratmamak, deneyin seyrinin ve sonuçların doğruluğunun etkilenmemesi için büyük bir özen gösterilmiştir.

4.4-Vortioksetin ve Serotonin(5-HT) :

Vortioksetin, 3 etki modu ile aynı anda 6 farmakolojik hedefe etki eden "multimodal" bir ajandır.Bu 3 etki modu;

‘1. Serotonin (5HT) taşıyıcısının inhibisyonu

2. Birkaç G-protein bağlantılı reseptördeki eylemler

(5HT1A reseptörlerinde agonist etki, 5HT1B reseptörlerinde kısmi agonist etki, 5HT1D ve 5HT7 reseptörlerinde antagonist etki)

3. Ligand kapılı bir iyon kanalının (5HT3 reseptörü)

inhibisyonu’ olarak sıralanabilir.(Stahl, 2015)

İlk olarak 1937'de İtalya, Roma'da, Maffu Vialli ve Vittorio Erspamer (1909-1999), bağırsakların enterokromaffin hücrelerinden türetilen ve sıçan uterusunda düz kas kasılmasına neden olan bir maddeyi tanımladılar .Bu maddeye başlangıçta "Enteramine" adını verdiler. Daha sonra, Cleveland Ohio, ABD'de 1940'ların sonlarında Maurice Rapport , Arda Green ve Irvine Page 5-HT'yi bir "serum vazokonstriktör" olarak saflaştırdı ve adını tasarladı. Serumdan başlangıç saflaştırması ("sero-") ve damar tonunun modülasyonu ("-tonin") nedeniyle "serotonin" adı verildi.. Kısa bir süre sonra, 1949'da Rapport, serotoninin kimyasal yapısını 5-hidroksitriptamin olarak açıkladı. 1952'de Erspamer ve meslektaşı Biagio Asero, 5-HT ve enteramin'in aynı madde olduğunu doğruladı.(Noristani and Perrin, 2019)

Serotonin ;amino asit olan L-triptofandan indol halkasının hidroksilasyonu ve ardından amino asidin dekarboksilasyonu ile sentezlenir.(Katzung, 2012)

Bitkilerde ve şimdiye kadar incelenen tüm metazoan yaşam dallarında serotonin sentezinin varlığı serotoninin yaşamın evriminde nispeten erken ortaya çıktığını göstermektedir. Serotonin'in işlevi en ilkel sinir sistemlerinde bile sinir sistemi modülasyonuna ve sinyalizasyonuna karmaşık bir şekilde bağlıdır.(Lam et al., 2010)

"Mutluluk hormonu" olan serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT), sinir iletiminde filogenetik açıdan çok eski bir role sahiptir .(Sodhi and Sanders-Bush, 2004)

Charles Sherrington ve Thomas Graham Brown gibi öncüler, yirminci yüzyılın başlarında, hareketin sinirsel kontrolü hakkında deneyler gerçekleştirmişlerdir. On yıllarca süren kanıtlarla desteklenen ufuk açıcı çalışmalarıyla yürüme, uçma ve yüzmenin büyük ölçüde, genellikle hareket için merkezi model oluşturucu (CPG) olarak adlandırılan bir spinal nöron ağı tarafından kontrol edildiği sonucuna varmışlardır.(Guertin, 2013)

Omurilikteki patern jeneratörü olarak da bilinen nöronal devre, yürüme gibi karmaşık motor işlevlere aracılık edebilir. Hem norepinefrin hem de 5-HT bulboşpinal sistemleri patern oluşturucuların tonik stimölasyonunu sağlar. Embriyonik raphe hücrelerinin, spinal transeksiyondan sonra yetişkin sıçan omuriliğine aşılması greft sağkalımı ve% 40'lık bir 5-HT alım artışı göstermiştir. Transplant ile alt motor nöronların fonksiyonel yeniden inervasyonu elektrofizyolojik olarak gösterilmiştir. SCI sonrası 5-HT reseptör değişiklikleri hakkında çok az şey bilinmektedir.(Shapiro, 1997)

Serotonerjik nöronlar, geniş aksonal ağları aracılığıyla neredeyse tüm Merkezi Sinir Sistemi (SSS) alanlarına ulaşabilir ve onları etkileyebilir. 5-HT uyku ve sirkadiyen ritimler, ruh hali, hafıza ve ödül, duygusal davranış, nosisepsiyon ve duyuşal işleme, otonomik tepkiler ve motor aktivite gibi çok sayıda işlevi düzenler.(Crispino et al., 2020)

Omurilik zengin bir serotonerjik innervasyona sahiptir.(Hadjiconstantinou et al., 1984) Sıçan omuriliği farklı segmentlerinde ve laminalarında SERT1 (serotonin taşıyıcı) yaygın, ancak heterojen bir dağılımda bulunmaktadır.(Sur et al., 1996)

Omurilik travmasından sonraki ilk birkaç saat içinde yaralanma bölgesinde ve çevresinde 5-HT birikiminin nöral hasarın ilerlemesine katıldığı öne sürülmüştür.(Salzman et al., 1987, ZIVIN et al., 1976) Öte yandan ventral kordda projeksiyon yapan 5-HT nöronunun, omurilik hasarından sonra fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunabildiği aktarılmıştır.5-HT sistemlerinin omurilik hasarının iki fazı sırasında tamamen farklı fonksiyonlara sahip olması özellikle ilgi çekicidir.(Hashimoto and Fukuda, 1991)

5-hidroksitriptamin (5-HT) olarak da adlandırılan serotonin, lokomasyonda önemli bir rol oynar ve 5-HT nörotransmisyonundaki artış, spinal kord yaralanması sonrası fonksiyonel iyileşmeyi destekler. Ayrıca, omurgasızlarda yapılan son çalışmalar yaralanma sonrası aksonal rejenerasyonu teşvik etmede 5-HT'nin doğrudan bir rolünü göstermektedir. SCI, yaralanma tipi, lezyon şiddeti ve hayvan modeline bağlı olarak 5-HT projeksiyonlarında çeşitli değişikliklere neden olur. 5-HT aksonlarının SCI'ye tepkisi, yaralanma yerine göre göre farklılık gösterir. 5-HT aksonlarının SCI bölgesine rostral ve kaudal tepkisi, hem sıçanlarda hem de farelerde büyük ölçüde farklılık gösterir. Lezyonun hemen rostral 5-HT projeksiyonları, çeşitli SCI modelleri kullanılarak her iki türde de belirgin filizlenmeye uğrar .(Noristani and Perrin, 2019)

Çok sayıda çalışma, omurilik lezyonundan sonra yaralanma bölgesine paralel olarak 5-HT immünreaktivitesinde bir artış bulmuştur.(Holmes et al., 2005, Hayashi et al., 2010, Saruhashi et al., 1996) Bununla birlikte, tüm 5-HT aksonlarının lezyonlu olduğu omuriliğin tamamen ezilmesini takiben lezyona hemen rostral 5-HT akson yoğunluğundaki artış, akson rejenerasyonunu destekler. Bu, 5-HT sistem plastisitesinin, SCI sonrası aktif akson filizlenmesine ve rejenerasyona izin veren spesifik rejeneratif yeteneklerle sonuçlandığını göstermektedir.(Noristani and Perrin, 2019)

Memelilerde, serotonin reseptörlerinin biyokimyasal ve farmakolojik kriterlere dayalı yedi farklı alt tipi (5-HT1 ila 5-HT7) tanımlanmıştır.(Sharker et al., 2020)

7 farklı reseptörün ve bunların alt tiplerinin bir kısmı spinal kord ile ilişkilidir. 5-HT1A reseptörleri esas olarak dorsal boynuzun yüzeysel tabakasında gösterilmiştir.(Marlier et al., 1991)5-HT1D reseptörlerinin varlığı, çeşitli servikolumbar seviyelerinde dorsal kök gangliyonlarında da bildirilmiştir.(Classey et al., 2010) 5-HT1D reseptörleri son zamanlarda intrafüzal kas liflerini inerve ederek kas iğlerinin hassasiyetini düzenleyen omurilikteki gama motor nöronları için seçici bir belirteç olarak tanımlanmıştır.(Enjin et al., 2012) 5-HT1F reseptörü, üst servikal omuriliğin substantia jelatinozasında önemli miktarlarda bulunur.(Castro et al., 1997) Sıçan omuriliğinde beyaz ve gri maddede, sakrokaudal seviyelerde, 5-HT2C reseptör immünoreaktivitesi bulunur.(Ren et al., 2013) Omuruliğin tüm seviyelerinde substantia gelatinosa'da yüksek yoğunlukta 5-HT3 reseptörleri mevcuttur.(Parker et al., 1996, Waeber et al., 1989) Rat omuriliğinde immünohistokimyasal olarak 5-HT5A reseptörlerinin varlığı, tespit edilmiştir.(Doly et al., 2004) İmmünoreaktivitenin, en çok dorsal boynuzun iki yüzeyel tabakasında ve lomber seviye L6'da dorsolateral motor çekirdekte güçlü olduğu bildirilmiştir. Lateral spinal çekirdekte, lamina X (merkezi kanalı çevreleyen

bölge) ve lamina IX'da daha orta düzeyde sinyaller gözlenmiştir. L6'daki elektron mikroskopik gözlem, dorsal boynuzda immünoreaktivitenin, dendritlerde ve hücre gövdelerinde yalnızca postsinaptik olarak mevcut olduğunu göstermiştir.(Doly et al., 2004) Western blot analizi ile omuriliğin dorsal kısmında ve dorsal kök gangliyonlarında 5-HT_{5A} reseptörlerinin varlığı bildirilmiştir ve serotonin reseptörünün bu alt tipinin antinosisepsiyona aracılık etmedeki rolü, sıçanlarda çeşitli ağrı modellerinde deneysel olarak kanıtlanmıştır.(Avila-Rojas et al., 2015) 5-HT₆ reseptörlerinin spinal kordda görüldüğü bildirilmiştir. 5-HT₇ reseptörleri ayrıca tüm torako-lomber seviyelerde ve ağırlıklı olarak lamina I-III ve VI-VIII'de kedi omuriliğinin nöronlarında ifade edilir. Bu 5-HT₇ içeren nöronların çoğu, lokomotorla aktive olan nöronlardır ve bu reseptörler için (5-HT_{1A} ve 5-HT_{2A} ile birlikte) hareket modülasyonunda bir rol olduğunu düşündürür.(Noga et al., 2009)

5-HT, memeli omuriliğinde ritmik motor aktivitede önemli yer tutar.(Maclean et al., 1998)

Yapılan bir çalışmada sinaptik yarıktaki 5-HT'nin düşük seviyelerde lokomasyonu kolaylaştırıcı etkisi olduğu fakat yüksek seviyelerde inhibe ettiği aktarılmıştır.Yine bu çalışmada endojen 5-HT'nin lokomotor aktiviteye katkıda bulunduğu gösterilmiştir.(Dunbar et al., 2010)

Omurilik ventral boynuzundaki 5-HT salınımı lokomotor fonksiyona aracılık etmede önemli bir rol oynamaktadır. SCI'yi takiben supraspinal serotonerjik projeksiyonların kesilmesi ile 5-HT tükenir. Buradan yola çıkılarak 5-HT kaybının motor fonksiyonun iyileşmesini engelleyen en önemli sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu söylenebilir.(Ghosh and Pearse, 2015)

Spinal kord yaralanmasının lokomosyon üzerine etkisi lokomosyonu başlatmaya ve kontrol etmeye yarayan özel inen sinir yollarının kaybıdır. Bunlardan en önemlisi ;kemirgenlerde medulla hücrelerinde başlayan ve omuriliğin tüm seviyelerine ulaşır sonlanan serotonerjik(5 hidroksitriptamin, 5-HT) yollarıdır.(Sławińska et al., 2014)

5-HT_{1A} ve 5-HT₃ reseptörleri, spinal nosiseptif iletimin serotonerjik regülasyonuna katkıda bulunur. (Glaum et al., 1990, Oyama et al., 1996, Hains et al., 2003, Jeong et al., 2004) 5-HT₃ reseptörleri esas olarak omurilikteki akson terminallerinde bulunur.(Conte et al., 2005) 5-HT_{1A} reseptörlerinin aktivasyonu, SCI sonrası motor fonksiyonel iyileşmeyi indükleyebilir.(Fuller and Gates, 2016) 5-HT'nin uyarıcı etkileri motonöronlar üzerindeki 5-HT_{1A} reseptörlerinin aktivasyonu ile gerçekleşir.(Takahashi and Berger, 1990)

Lokomosyonun serotonerjik modülasyonu torako-lomber segmentlerin lamina VII ve VIII içindeki serotonerjik-innervasyon edilen lokomotor aktive nöronların soma ve proksimal dendritlerinde bulunan 5-HT₇ / 5-HT_{2A} / 5-HT_{1A} reseptörlerini içerir. 5-HT₇ reseptörlerinin 5-HT kaynaklı ritmisiteyi bloke ettiği gösterilmiştir.(Noga et al., 2009)

Genel olarak 5-HT₇ aktivasyonunun, adenilil siklaz-siklik AMP yollarının aktivasyonu ve hücre içi Ca²⁺ seviyelerinin yükselmesi yoluyla nöronal uyarılabilirliği arttırdığı bilinmektedir.(Baker et al., 1998) Buna karşılık, 5-HT_{1A}'nın hem presinaptik hem postsinaptik olarak lokalize edildiği ve G_i-protein aktivasyonu ve K⁺ kanal açılması yoluyla adenilil siklaza negatif olarak bağlandığı bilinmektedir.(Landry et al., 2006) Ayrıca 5-HT₇ reseptör varlığının, lokomosyonun başlatılmasından sorumlu internöronların tanımlayıcı bir özelliği olabileceği öne sürülmüştür.(Cabaj et al., 2017)

5-HT1A reseptörünün gelişimin erken safhalarında mevcut olduğu ve serotonerjik sistem gelişiminin düzenlenmesinde rol oynadığını gösterilmiştir. İnsan fetal beyinde, 5-HT1A mRNA ekspresyonu 16 ila 22 hafta arasında pik yapar. Çeşitli beyin bölgelerinde yapılan araştırmalar, en yüksek 5-HT1A mRNA ekspresyonunun o bölgenin gelişimi sırasında meydana geldiğini ve olgunlaşma gerçekleşikten sonra azaldığını göstermektedir.(Sodhi and Sanders-Bush, 2004) Sıçan omuriliğinin otonomik bölgelerinde bulunan 5-HT içeren lifler, beyin sapından kaynak alır.(Newton et al., 1986)

5-HT1A veya 5-HT7 aktivasyonunun memelilerde CPG aracılı lokomotor ritmogeneze katkıda bulunduğu aktarılmıştır.(Landry et al., 2006) 5-HT7 reseptörleri esas olarak sinaptik kolaylaştırma üretmekten sorumludur.(Garraway and Hochman, 2001) 5-HT reseptörlerinin omurilik hasarından sonra lokomasyonu indükleme kabiliyetine olan ilgi, 5-HT reseptör agonisti Buspiron'un omurilik hasarı olan insanlarda kullanılması için girişimlere yol açmıştır.(Sławińska and Jordan, 2019) 5-HT1A, 5-HT2 ve 5-HT7 reseptörlerinin bir agonisti olan Buspiron'un spinal kord yaralanmalı farelerde lokomotor iyileşmeyi kolaylaştırdığı gösterilmiştir.(Jeffrey-Gauthier et al., 2018) Çalışmamızda sham grubuna göre deneysel gruptaki istatistiksel anlamda lokomotor iyileşmeyi aynı şekilde spinal kord

yaralanması sonrası verilen Vortiksetin'in yüksek oranda 5-HT_{1A} agonizması ve buna kıyasla düşük oranda 5-HT₇ antagonizması ile motor fonksiyonlarda iyileştirici bir etki yaratmış olabileceği öngörülebilir. Ancak 5-HT_{1A} agonizmasının omurilikleri yaralanan kaplumbağalarda iyileşmeyi olumsuz yönde etkilediği de söylenmektedir.(Fabbiani et al., 2018) Diğer bir çalışmada 5-HT_{1A} agonistlerinin spinal kord yaralanması ile indüklenen solunum anormallikleri üzerine yararlı etkileri olduğu bildirilmiştir.(Teng et al., 2003) Bu hipotezi desteklemese de daha eski bir çalışmada ise 5-HT'nin spinal lokomotor ağ üzerindeki temel inhibitör etkisine, 5-HT₁ reseptör sınıfının belirli alt tiplerinin aracılık ettiği sonucuna varılmıştır.(Beato and Nistri, 1998) Kaplumbağalarda spinal kord yaralanması ile yapılan bir çalışmada 5-HT_{1A} reseptörlerinin nöron yeniden oluşmasını engellemedeki olası bir rolünü incelemek için, omurilikleri yaralanan kaplumbağalardan bir gruba 10 gün süreyle seçici 5-HT_{1A} agonisti verilmiştir ,sonucunda ilaç alan kaplumbağalarda, tedavi edilmeyen hayvanlara göre önemli ölçüde daha az 5-HT + nöron olduğu saptanmıştır.(Fabbiani et al., 2018) Ek olarak; Vortiksetin, sıçanlarda 5-HT_{1A} ve 5-HT₇ reseptörlerinde yaklaşık on kat daha zayıf afiniteye sahipken, sıçan 5-HT₃ reseptöründe üç kat daha güçlü bir afiniteye sahiptir.(Du Jardin et al., 2016)

Bu çalışmalardan çıkarımda bulunursak; spinal kord yaralanması sonrası verilen Vortioksetin'in serotonin yolakları üzerinden motor fonksiyonlar üzerine iyileştirici etki varlığını araştırmada, serotonin düzeyi bakmanın yanında bu durumu reseptörler üzerinde araştırmak üzere daha fazla çalışmanın yapılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Çalışmamızda Vortioksetin'in spinal kord yaralanması sonrası motor fonksiyonlar üzerine etkisi araştırılırken ;literatürdeki bilgiler ışığında bu etkide serotoninin yeri olduğu düşünülmüştür. Nitekim Vortioksetin 5-HT üzerine multimodal etkinliği olan bir ilaçtır. Bu nedenle sakrifikasyon ile alınan spinal kord doku örneklerinde; hem histoloji birimince serotonin immün boyama yapılmış olup hem de dış merkezde ELİSA yöntemi ile serotonin seviyesi baktırılmıştır.

Serotonin immün işaretleme ile histoloji biriminin değerlendirmesinde ise deney grubunda sham grubuna göre boyanma yoğunluğu az olarak karşımıza çıkmıştır. Serotonin immün boyamada kontrol grubu boya tutmamıştır. Yani doku serotonin seviyesi üzerinden motor iyileşmeyi değerlendirmek pek mümkün görünmemektedir.

Çalışmanın 10. gününde sakrifikasyon sonrası alınan spinal kord doku örneklerinin H&E boyama ile değerlendirilmesinde deney grubundaki aksonal hasar ve nöronal dejenerasyon sham grubuna göre hayli düşük çıkmıştır. Bu durum motor değerlendirme sonuçları ile paralellik göstermektedir. Yani Vortioksetin'in multimodal etki mekanizmalarının bir ya da birkaçının nöroprotektif ve nörorejeneratif özellik gösterdiğini desteklemektedir.

ELISA yöntemi sonrası sonuçlara bakıldığında deney ve sham grupları arasında serotonin düzeyi açısından anlamlı fark görülmemiştir. ELISA ile kontrol grubunda serotonin düzeyi yüksek olarak çıkmıştır, bu durumun serotonin immün boyama ile paralellik göstermeyişi serotonin immün boyama ile elde edilen sonuçların güvenilirliğini tartışılır hale getirmektedir. Multimodal etkinliği olan Vortioksetin'in motor fonksiyonlar üzerine iyileştirici etkisi olduğu yapılan motor muayeneler ile gözlenmiş olup bu gözlem yaralı kord dokusundaki serotonin düzeyi üzerinden açıklanmaya çalışılmış olsa da iyileştirici etkide daha karmaşık yolların varlığını akla getirmektedir. Serotoninin bir dizi immünolojik süreci etkilediği gösterilmiştir ve proinflamatuvar sitokinlerde hem artışa hem de azalmaya yol açabildiği gösterilmiştir .(Nau Jr et al., 2013)

Vortioksetin'in monosit ve makrofajlarda PPARY'nin gen ekspresyonunu indüklemenin yanı sıra, TNF α ekspresyonunda negatif bir eğilimi indüklediği gösterilmiştir. Bu etkinin 5-HT ile paralelleştirildiği, Vortioksetin'in hedef dışı bir etkisinden kaynaklanma olasılığının düşük olduğu (yani serotoninerjik sistem söz konusudur) aktarılmıştır. Ayrıca 5-HT'deki bir artışın (SERT'nin inhibisyonuna bağlı olarak), reseptörlerinden birinde doğrudan agonistik bir etkinin veya Vortioksetin'in çok modlu etkisinden kaynaklanan karışık bir etkinin sonucu olabileceği vurgulanmıştır.(Talmon et al., 2018) Ek olarak, immünohistokimya ve in situ hibridizasyon çalışmaları, sıçan omuriliğinin dorsal boynuzunda inhibitör nöronal iletimi yayan 5-HT₃ reseptörlerinin varlığını göstermiştir. 5-HT₃ reseptör antagonistlerinin nöroproteksiyonda yer alabileceği vurgulanmıştır.(Gupta et al., 2016)

Bu bilgiler ışığında Vortioksetin alan deney grubundaki ratların sakrifikasyon sonrası alınan spinal kord doku örneklerinde serotoninin, H&E boyama ile de doğrulandığı üzere, antienflamatuar bir etki yarattığı varsayılabilir. İstatistiki olarak anlamlı fark oluşması için çalışmanın daha fazla denek sayısı ile gerçekleşmesi gerektiği düşünülmüştür. Ayrıca çalışmanın 10 günden daha uzun bir süre devam ettirilmesinin serotonin bazında değerlendirme yapılabilmesi için daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

4.5-Kilo Alımının Vortioksetin ile İlişkisi:

Vortioksetin'in özellikle ilginç bir özelliği, kilo alımının indüksiyonu ile diğer metabolik değişikliklerin varlığı arasındaki ilişkinin kurulduğu diğer antidepresanların aksine, kilo üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı görünmesidir.(Alvarez et al., 2014)

Çalışmamızda; cerrahi ile sham ve deney gruplarında deneysel rat omuriliği yaralanması yaratılmıştır. Kontrol grubuna ise cerrahi yük bindirmek adına; cerrahi ile sham ve deney gruplarında olduğu gibi aynı seviyeden laminektomi yapıp korda dokunulmamıştır. Ratlarda deney süresince ölçümler ile kayıt altına alınan kilolar arasında deney süresince kontrol, sham ve Vortioksetin verilen deney grupları arası fark bulunmamaktadır.

Bu durum Vortioksetin'in kilo alımı üzerine belirgin etkisi olmadığını destekleyen yayınlar ile örtüşmektedir.(Alvarez et al., 2014, D'Agostino et al., 2015, Salagre et al., 2018, Schatzberg et al., 2014)

4.6-Histolojik Verilerin Analizi:

Sıçan modellerinde, in vitro çalışmalar, Vortioksetin kullanımını takiben hipokampusta artmış sinaptik iletim ve plastisite göstermiştir. Sitokinler, kemokinler, reaktif oksijen ve nitrojen türleri gibi çözünür enflamatuar moleküllere ikincil nöronal hasar, neonatal hipoksi-iskemide nöronal hasarın ana aracısı olarak kaydedilmiştir. Nitekim hipoksik beyin hasarına ikincil depresyon tedavisi deneyiminin aktarıldığı bir vaka bildiriminde Vortioksetin'in dikkate değer bir gelişme yarattığı aktarılmıştır.(Ahsan et al., 2020) Ayrıca Vortioksetin'in antienflamatuar etkisi de aktarılmıştır.(Talmon et al., 2018)

Histolojik değerlendirmeler sonucunda Vortioksetin'in spinal kord yaralanmasında sekonder yaralanma üzerine nöroprotektif ,antienflamatuar ve iyileştirici etkisi olduğu düşünülmüştür.

H&E boyama ile değerlendirilen yaralanma bölgesinden alınmış olan doku örnekleri incelendiğinde Vortioksetin alan deney grubundaki örneklerde SF alan sham grubundaki örneklerle göre doku bütünlüğü normale daha yakın gözükmüş olup hasarlı akson ve dejenere nöron sayısı daha azdır. İstatistiki olarak da anlamlı çıkan bu sonuç hipotezimiz ile örtüşmektedir.

Luxol Fast Blue boyama ile değerlendirilen yaralanma bölgesinden alınmış olan doku örnekleri incelendiğinde Vortiooksetin alan deney grubundaki örneklerde SF alan sham grubundaki örneklerle göre doku bütünlüğü normale daha yakın gözükmüş olup ,demyelinizasyon daha azdır. Spinal travma sonrası parapleji gelişen, ardından günde bir kez intraperitoneal yoldan Vortiooksetin verilerek 10 günlük takibin sonucundaki sakrifikasyon sonrası yaralanma bölgesindeki spinal kord doku örneklerinde Luxol Fast Blue boyama yapılan deney grubundaki ratların %71,4'ü normal miyelinizasyon ile karşımıza çıkmış olup; şiddetli demiyelinizasyon hiçbirinde görülme de istatistiki olarak bakıldığında gruplar arası anlamlı fark çıkmaması denek sayısının az olmasına bağlanmıştır. Vortiooksetin alan ratlarda miyelinizasyonun fazla ve demiyelinizasyonun az görülmesi motor muayene sonuçları ile örtüşmüştür.

4.7-Vortioksetin ve Motor Fonksiyonlar Üzerine

İyileştirici Etkisi:

Çalışmamızda Vortioksetin'in motor fonksiyonlar üzerine iyileştirici etkisi araştırılmıştır. Araştırmada sonuca gitmek üzere ; histolojik ve nöromotor muayene yöntemleri kullanılarak kayda alınan veriler kullanılmıştır. 3., 5., 7. ve 10. günlerdeki Drummond Moore Kriterleri kullanılarak yapılan motor değerlendirmelerde tüm ikili gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmiştir. Sham grubunda SF verilen 7 ratın 10. günde paraplejik vaziyette kaldıkları görülmüştür. Deney grubunda Vortioksetin verilen 7 ratın motor muayenelerinde 10. güne doğru anlamlı ilerleme kaydedildiği fark edilmiştir. Yine eğik düzlem ile değerlendirilen ratlarda 3. günden itibaren tüm ikili gruplar arasında anlamlı fark mevcuttur. Deney grubunda yer alan ratların eğik düzlem açıları sham grubundakilere göre daha yüksek olarak ölçülmüştür. Eğik düzlem ile değerlendirmede kontrol grubundaki ratların post op ölçümlerinde eğik düzlem açılarının düştüğü fark edilmiştir. Sadece laminektomi yapılan ratlardaki bu durum cerrahi yüke bağlı gelişen ağrı ve bu nedenle oluşan hareket kısıtlılığına bağlanmıştır.

Yapılan bir çalışmada, insizyonel ağrı için bir rat modeli tanımlanmış olup, bu modelin insizyondan sonra birkaç gün süren tekrarlanabilir, ölçülebilir mekanik hiperaljezi gösterdiği gösterilmiştir.(Brennan et al., 1996)

Kayıt altına alınan ayak izlerine bakıldığında deney grubunda yer alan ratlarda arka ayak izlerinin 10. güne doğru artarak belirdiği ve sham grubundaki ratlarda gözükmeyen arka ayak izlerinin deney grubunda çıkmaya başladığı tespit edilmiştir.

5.SONUÇ:

Nöromotor değerlendirme yöntemleri ile yapılan klinik değerlendirmeler neticesinde Vortioksetin'in motor fonksiyonlar üzerine iyileştirici etki yarattığı istatistiksel olarak da gösterilmiş, ancak iyileşmenin doku seretonin düzeyleri ile ilişkisi göz önüne serilememiştir. Bu iyileşmenin yukarıda ayrıntılarıyla tartışıldığı üzere multimodal etkilere sahip Vortioksetin'in farklı reseptörler üzerine etkisi ve antienflamatuar özelliklerinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR:

AHMED, R. U., ALAM, M. & ZHENG, Y.-P. 2019. Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*, 5, e01324.

AHSAN, S. M., AHSAN, S. D., KHALID, O. & AGHA, H. 2020. Usefulness of vortioxetine noted in depression secondary to hypoxic brain injury and residual cognitive deficits. *Therapeutic Advances in Psychopharmacology*, 10, 2045125320943399.

AHUJA, C. S., WILSON, J. R., NORI, S., KOTTER, M. R., DRUSCHEL, C., CURT, A. & FEHLINGS, M. G. 2017. Traumatic spinal cord injury. *Nature reviews Disease primers*, 3, 1-21.

ALIZADEH, A., DYCK, S. M. & KARIMI-ABDOLREZAEI, S. 2019. Traumatic spinal cord injury: an overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms. *Frontiers in neurology*, 10, 282.

ALVAREZ, E., PEREZ, V. & ARTIGAS, F. 2014. Pharmacology and clinical potential of vortioxetine in the treatment of major depressive disorder. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1297.

ASSINCK, P., DUNCAN, G. J., HILTON, B. J., PLEMEL, J. R. & TETZLAFF, W. 2017. Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature neuroscience*, 20, 637-647.

- AVILA-ROJAS, S. H., VELAZQUEZ-LAGUNAS, I., SALINAS-ABARCA, A. B., BARRAGAN-IGLESIAS, P., PINEDA-FARIAS, J. B. & GRANADOS-SOTO, V. 2015. Role of spinal 5-HT_{5A}, and 5-HT_{1A/1B/1D}, receptors in neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *brain research*, 1622, 377-385.
- BAKER, L. P., NIELSEN, M. D., IMPEY, S., METCALF, M. A., POSER, S. W., CHAN, G., OBRIETAN, K., HAMBLIN, M. W. & STORM, D. R. 1998. Stimulation of Type 1 and Type 8 Ca²⁺/Calmodulin-sensitive Adenylyl Cyclases by the Gs-coupled 5-Hydroxytryptamine Subtype 5-HT_{7A} Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17469-17476.
- BEATO, M. & NISTRI, A. 1998. Serotonin-induced inhibition of locomotor rhythm of the rat isolated spinal cord is mediated by the 5-HT₁ receptor class. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265, 2073-2080.
- BRAMBRINK, A. M. & KIRSCH, J. R. 2019. *Essentials of neurosurgical anesthesia & critical care: strategies for prevention, early detection, and successful management of perioperative complications*, Springer Nature.
- BREGMAN, B. S., KUNKEL-BAGDEN, E., REIER, P. J., DAI, H. N., MCATEE, M. & GAO, D. 1993. Recovery of function after spinal cord injury: mechanisms underlying transplant-mediated recovery of function differ after spinal cord injury in newborn and adult rats. *Experimental neurology*, 123, 3-16.
- BRENNAN, T. J., VANDERMEULEN, E. P. & GEBHART, G. 1996. Characterization of a rat model of incisional pain. *Pain*, 64, 493-502.
- CABAJ, A. M., MAJCZYŃSKI, H., COUTO, E., GARDINER, P. F., STECINA, K., SŁAWIŃSKA, U. & JORDAN, L. M. 2017. Serotonin controls initiation of locomotion and afferent modulation of coordination via 5-HT₇ receptors in adult rats. *The Journal of physiology*, 595, 301-320.
- CASTRO, M., PASCUAL, J., ROMON, T., DEL ARCO, C., DEL OLMO, E. & PAZOS, A. 1997. Differential distribution of [3H] sumatriptan binding sites (5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptors) in human brain: focus on brainstem and spinal cord. *Neuropharmacology*, 36, 535-542.
- CHEN, J., XU, Z. C., XU, X. M. & ZHANG, J. H. 2019. *Animal models of acute neurological injury*, Springer.
- CLASSEY, J., BARTSCH, T. & GOADSBY, P. 2010. Distribution of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} and 5-HT_{1F} receptor expression in rat trigeminal and dorsal root ganglia neurons: relevance to the selective anti-migraine effect of triptans. *Brain research*, 1361, 76-85.

- CONTE, D., LEGG, E., MCCOURT, A., SILAJDZIC, E., NAGY, G. & MAXWELL, D. 2005. Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that possess the serotonin (5-hydroxytryptamine) 3 receptor. *Neuroscience*, 134, 165-173.
- CRISPINO, M., VOLPICELLI, F. & PERRONE-CAPANO, C. 2020. Role of the Serotonin Receptor 7 in Brain Plasticity: From Development to Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 505.
- D'AGOSTINO, A., ENGLISH, C. D. & REY, J. A. 2015. Vortioxetine (brintellix): a new serotonergic antidepressant. *Pharmacy and Therapeutics*, 40, 36.
- DE MEDINACELI, L. 1986. An anatomical landmark for procedures on rat thoracic spinal cord. *Experimental neurology*, 91, 404-408.
- DOLY, S., FISCHER, J., BRISORGUEIL, M. J., VERGÉ, D. & CONRATH, M. 2004. 5-HT_{5A} receptor localization in the rat spinal cord suggests a role in nociception and control of pelvic floor musculature. *Journal of Comparative Neurology*, 476, 316-329.
- DRUMMOND, J. C. & MOORE, S. S. 1989. The influence of dextrose administration on neurologic outcome after temporary spinal cord ischemia in the rabbit. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 70, 64-70.
- DU JARDIN, K. G., LIEBENBERG, N., MÜLLER, H. K., ELFVING, B., SANCHEZ, C. & WEGENER, G. 2016. Differential interaction with the serotonin system by S-ketamine, vortioxetine, and fluoxetine in a genetic rat model of depression. *Psychopharmacology*, 233, 2813-2825.
- DUNBAR, M. J., TRAN, M. A. & WHELAN, P. J. 2010. Endogenous extracellular serotonin modulates the spinal locomotor network of the neonatal mouse. *The Journal of physiology*, 588, 139-156.
- ENJIN, A., LEÃO, K. E., MIKULOVIC, S., LE MERRE, P., TOURTELLOTTE, W. G. & KULLANDER, K. 2012. Sensorimotor function is modulated by the serotonin receptor 1d, a novel marker for gamma motor neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 49, 322-332.
- FABBIANI, G., REHERMANN, M. I., ALDECOSEA, C., TRUJILLO-CENÓZ, O. & RUSSO, R. E. 2018. Emergence of serotonergic neurons after spinal cord injury in turtles. *Frontiers in neural circuits*, 12, 20.
- FADEN, A. I., GANNON, A. & BASBAUM, A. I. 1988. Use of serotonin immunocytochemistry as a marker of injury severity after experimental spinal trauma in rats. *Brain research*, 450, 94-100.

- FERABOLI-LOHNHERR, D., ORSAL, D., YAKOVLEFF, A., Y RIBOTTA, M. G. & PRIVAT, A. 1997. Recovery of locomotor activity in the adult chronic spinal rat after sublesional transplantation of embryonic nervous cells: specific role of serotonergic neurons. *Experimental Brain Research*, 113, 443-454.
- FONSECA, M. I., NI, Y. G., DUNNING, D. D. & MILEDI, R. 2001. Distribution of serotonin 2A, 2C and 3 receptor mRNA in spinal cord and medulla oblongata. *Molecular brain research*, 89, 11-19.
- FORREST, V., INCE, P., LEITCH, M., MARSHALL, E. & SHAW, P. 1996. Serotonergic neurotransmission in the spinal cord and motor cortex of patients with motor neuron disease and controls: quantitative autoradiography for 5-HT_{1a} and 5-HT₂ receptors. *Journal of the neurological sciences*, 139, 83-90.
- FOUAD, K., METZ, G. A., MERKLER, D., DIETZ, V. & SCHWAB, M. E. 2000. Treadmill training in incomplete spinal cord injured rats. *Behavioural brain research*, 115, 107-113.
- FULLER, H. & GATES, M. 2016. *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*, BoD—Books on Demand.
- GARRAWAY, S. M. & HOCHMAN, S. 2001. Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons. *Journal of neurophysiology*.
- GHOSH, M. & PEARSE, D. D. 2015. The role of the serotonergic system in locomotor recovery after spinal cord injury. *Frontiers in neural circuits*, 8, 151.
- GLAUM, S. R., PROUDFIT, H. K. & ANDERSON, E. G. 1990. 5-HT₃ receptors modulate spinal nociceptive reflexes. *Brain research*, 510, 12-16.
- GUERTIN, P. A. 2013. Central pattern generator for locomotion: anatomical, physiological, and pathophysiological considerations. *Frontiers in neurology*, 3, 183.
- GUPTA, D., PRABHAKAR, V. & RADHAKRISHNAN, M. 2016. 5HT₃ receptors: Target for new antidepressant drugs. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 64, 311-325.
- HADJICONSTANTINO, M., PANULA, P., LACKOVIC, Z. & NEFF, N. 1984. Spinal cord serotonin: a biochemical and immunohistochemical study following transection. *Brain research*, 322, 245-254.
- HAINS, B. C., WILLIS, W. D. & HULSEBOSCH, C. E. 2003. Serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₃ reduce hyperexcitability of dorsal horn neurons after chronic spinal cord hemisection injury in rat. *Experimental brain research*, 149, 174-186.

- HAMON, M., GALLISSOT, M., MENARD, F., GOZLAN, H., BOURGOIN, S. & VERGE, D. 1989. 5-HT₃ receptor binding sites are on capsaicin-sensitive fibres in the rat spinal cord. *European journal of pharmacology*, 164, 315-322.
- HASHIMOTO, T. & FUKUDA, N. 1991. Contribution of serotonin neurons to the functional recovery after spinal cord injury in rats. *Brain research*, 539, 263-270.
- HAYASHI, Y., JACOB-VADAKOT, S., DUGAN, E., MCBRIDE, S., OLEXA, R., SIMANSKY, K., MURRAY, M. & SHUMSKY, J. 2010. 5-HT precursor loading, but not 5-HT receptor agonists, increases motor function after spinal cord contusion in adult rats. *Experimental neurology*, 221, 68-78.
- HILTON, B. J., MOULSON, A. J. & TETZLAFF, W. 2017. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods. *Neuroscience letters*, 652, 3-10.
- HOLMES, G. M., VAN METER, M. J., BEATTIE, M. S. & BRESNAHAN, J. C. 2005. Serotonergic fiber sprouting to external anal sphincter motoneurons after spinal cord contusion. *Experimental neurology*, 193, 29-42.
- HURLBERT, R. J., HADLEY, M. N., WALTERS, B. C., AARABI, B., DHALL, S. S., GELB, D. E., ROZZELLE, C. J., RYKEN, T. C. & THEODORE, N. 2015. Pharmacological therapy for acute spinal cord injury. *Neurosurgery*, 76, S71-S83.
- JEFFREY-GAUTHIER, R., JOSSET, N., BRETZNER, F. & LEBLOND, H. 2018. Facilitation of locomotor spinal networks activity by buspirone after a complete spinal cord lesion in mice. *Journal of neurotrauma*, 35, 2208-2221.
- JEONG, C. Y., CHOI, J. I. & YOON, M. H. 2004. Roles of serotonin receptor subtypes for the antinociception of 5-HT in the spinal cord of rats. *European journal of pharmacology*, 502, 205-211.
- KATZUNG, B. G. 2012. *Basic and clinical pharmacology*, Mc Graw Hill.
- KIDD, E. J., LAPORTE, A., LANGLOIS, X., FATTACCINI, C.-M., DOYEN, C., LOMBARD, M., GOZLAN, H. & HAMON, M. 1993. 5-HT₃ receptors in the rat central nervous system are mainly located on nerve fibres and terminals. *Brain research*, 612, 289-298.
- KWON, B. K., OXLAND, T. R. & TETZLAFF, W. 2002. Animal models used in spinal cord regeneration research. *Spine*, 27, 1504-1510.
- LAM, D. D., GARFIELD, A. S., MARSTON, O. J., SHAW, J. & HEISLER, L. K. 2010. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 97, 84-91.

- LANDRY, E. S., LAPOINTE, N. P., ROUILLARD, C., LEVESQUE, D., HEDLUND, P. B. & GUERTIN, P. A. 2006. Contribution of spinal 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors to locomotor-like movement induced by 8-OH-DPAT in spinal cord-transected mice. *European Journal of Neuroscience*, 24, 535-546.
- MACLEAN, J. N., COWLEY, K. C. & SCHMIDT, B. J. 1998. NMDA receptor-mediated oscillatory activity in the neonatal rat spinal cord is serotonin dependent. *Journal of neurophysiology*, 79, 2804-2808.
- MARLIER, L., TEILHAC, J.-R., CERRUTI, C. & PRIVAT, A. 1991. Autoradiographic mapping of 5-HT₁, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT₂ receptors in the rat spinal cord. *Brain research*, 550, 15-23.
- MIAZGA, K., FABCZAK, H., JOACHIMIAK, E., ZAWADZKA, M., KRZEMIENÍ-OJAK, Ł., BEKISZ, M., BEJROWSKA, A., JORDAN, L. M. & SŁAWIŃSKA, U. 2018. Intraspinal grafting of serotonergic neurons modifies expression of genes important for functional recovery in paraplegic rats. *Neural plasticity*, 2018.
- MIĘKISIAK, G., ŁĄTKA, D., JARMUŻEK, P., ZAŁUSKI, R., URBAŃSKI, W. & JANUSZ, W. 2019. Steroids in Acute Spinal Cord Injury: All But Gone Within 5 Years. *World neurosurgery*, 122, e467-e471.
- MØRK, A., MONTEZINHO, L. P., MILLER, S., TRIPPODI-MURPHY, C., PLATH, N., LI, Y., GULINELLO, M. & SANCHEZ, C. 2013. Vortioxetine (Lu AA21004), a novel multimodal antidepressant, enhances memory in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 105, 41-50.
- MURPHY, R. M. & ZEMLAN, F. P. 1992. Quantitative autoradiographic mapping of a novel serotonin receptor-5-HT_{1S}. *Neuroreport*, 3, 837-840.
- MUSK, E. 2019. An integrated brain-machine interface platform with thousands of channels. *Journal of medical Internet research*, 21, e16194.
- NAPIERALA, M. A. 2012. What is the Bonferroni correction. *AAOS Now*, 6, 40.
- NAU JR, F., YU, B., MARTIN, D. & NICHOLS, C. D. 2013. Serotonin 5-HT_{2A} receptor activation blocks TNF- α mediated inflammation in vivo. *PloS one*, 8, e75426.
- NEWTON, B. W., MALEY, B. E. & HAMILL, R. W. 1986. Immunohistochemical demonstration of serotonin neurons in autonomic regions of the rat spinal cord. *Brain research*, 376, 155-163.
- NOGA, B. R., JOHNSON, D. M., RIESGO, M. I. & PINZON, A. 2009. Locomotor-activated neurons of the cat. I. Serotonergic innervation and co-localization of 5-HT₇, 5-HT_{2A}, and 5-HT_{1A} receptors in the thoraco-lumbar spinal cord. *Journal of neurophysiology*, 102, 1560-1576.

- NORISTANI, H. N. & PERRIN, F. E. 2019. Serotonergic Mechanisms in Spinal Cord Injury.
- OYAMA, T., UEDA, M., KURAISHI, Y., AKAIKE, A. & SATOH, M. 1996. Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord. *Neuroscience research*, 25, 129-135.
- OYINBO, C. A. 2011. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 71, 281-99.
- ÖZMEN, S., AYHAN, S. & LATIFOGLU, O. 2002. Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plastic and reconstructive surgery*, 109, 1760-1761.
- PAPA, S., MAURI, E., ROSSI, F., PERALE, G. & VEGLIANESE, P. 2020. Introduction to spinal cord injury as clinical pathology. *Spinal Cord Injury (SCI) Repair Strategies*. Elsevier.
- PARKER, R. M., BARNES, J. M., GE, J., BARBER, P. C. & BARNES, N. M. 1996. Autoradiographic distribution of [3H]-(S)-zacopride-labelled 5-HT₃ receptors in human brain. *Journal of the neurological sciences*, 144, 119-127.
- PATEK, M. & STEWART, M. 2020. Spinal cord injury. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*.
- PERRIER, J.-F. & COTEL, F. 2015. Serotonergic modulation of spinal motor control. *Current opinion in neurobiology*, 33, 1-7.
- PISARCHIK, A. N., MAKSIMENKO, V. A. & HRAMOV, A. E. 2019. From novel technology to novel applications: Comment on “An integrated brain-machine interface platform with thousands of channels” by Elon Musk and Neuralink. *Journal of medical Internet research*, 21, e16356.
- REN, L.-Q., WIENECKE, J., CHEN, M., MØLLER, M., HULTBORN, H. & ZHANG, M. 2013. The time course of serotonin 2C receptor expression after spinal transection of rats: an immunohistochemical study. *Neuroscience*, 236, 31-46.
- RIVLIN, A. & TATOR, C. 1978. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical neurology*, 10, 38.
- RIVLIN, A. S. & TATOR, C. H. 1977. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat. *Journal of neurosurgery*, 47, 577-581.
- RUPPERT, K., OLSON, S. & COX, C. 2019. Spinal Cord Injury. *A Roadmap to Non-Hematopoietic Stem Cell-based Therapeutics*. Elsevier.

- SALAGRE, E., GRANDE, I., SOLÉ, B., SANCHEZ-MORENO, J. & VIETA, E. 2018. Vortioxetine: a new alternative for the treatment of major depressive disorder. *Revista de Psiquiatria y Salud Mental (English Edition)*, 11, 48-59.
- SALZMAN, S. K., HIROFUJI, E., LLADOS-ECKMAN, C., MACEWEN, G. D. & BECKMAN, A. L. 1987. Monoaminergic responses to spinal trauma: Participation of serotonin in posttraumatic progression of neural damage. *Journal of neurosurgery*, 66, 431-439.
- SANCHEZ, C., ASIN, K. E. & ARTIGAS, F. 2015. Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data. *Pharmacology & therapeutics*, 145, 43-57.
- SARUHASHI, Y., YOUNG, W. & PERKINS, R. 1996. The recovery of 5-HT immunoreactivity in lumbosacral spinal cord and locomotor function after thoracic hemisection. *Experimental neurology*, 139, 203-213.
- SAVIC, G., DEVIVO, M., FRANKEL, H., JAMOUS, M., SONI, B. & CHARLIFUE, S. 2017. Long-term survival after traumatic spinal cord injury: a 70-year British study. *Spinal Cord*, 55, 651-658.
- SCHATZBERG, A. F., BLIER, P., CULPEPPER, L., JAIN, R., PAPAKOSTAS, G. I. & THASE, M. E. 2014. An overview of vortioxetine. *The Journal of clinical psychiatry*, 75, 1411-1418.
- SCHMIDT, B. J. & JORDAN, L. M. 2000. The role of serotonin in reflex modulation and locomotor rhythm production in the mammalian spinal cord. *Brain research bulletin*, 53, 689-710.
- SEKHON, L. H. & FEHLINGS, M. G. 2001. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*, 26, S2-S12.
- SHAPIRO, S. 1997. Neurotransmission by neurons that use serotonin, noradrenaline, glutamate, glycine, and γ -aminobutyric acid in the normal and injured spinal cord. *Neurosurgery*, 40, 168-177.
- SHARKER, M. R., SUKHAN, Z. P., KIM, S. C., LEE, W. K. & KHO, K. H. 2020. Identification, characterization, and expression analysis of a serotonin receptor involved in the reproductive process of the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. *Molecular Biology Reports*, 47, 555-567.
- SHARMA, H., OLSSON, Y. & DEY, P. 1990. Early accumulation of serotonin in rat spinal cord subjected to traumatic injury. Relation to edema and blood flow changes. *Neuroscience*, 36, 725-730.
- SŁAWIŃSKA, U. & JORDAN, L. M. 2019. Serotonergic influences on locomotor circuits. *Current Opinion in Physiology*, 8, 63-69.

- SŁAWIŃSKA, U., MIAZGA, K. & JORDAN, L. M. 2014. The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. *Acta Neurobiol. Exp.(Wars)*, 74, 172-187.
- SODHI, M. & SANDERS-BUSH, E. 2004. Serotonin and brain development. *Int Rev Neurobiol*, 59, 111-74.
- SONG, Z., MEYERSON, B. A. & LINDEROTH, B. 2011. Spinal 5-HT receptors that contribute to the pain-relieving effects of spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy. *PAIN®*, 152, 1666-1673.
- STAHL, S. M. 2015. Modes and nodes explain the mechanism of action of vortioxetine, a multimodal agent (MMA): actions at serotonin receptors may enhance downstream release of four pro-cognitive neurotransmitters. *CNS spectrums*, 20, 515-519.
- SULTAN, I., LAMBA, N., LIEW, A., DOUNG, P., TEWARIE, I., AMAMOO, J. J., GANNU, L., CHAWLA, S., DOUCETTE, J. & CERECEDO-LOPEZ, C. D. 2020. The safety and efficacy of steroid treatment for acute spinal cord injury: A Systematic Review and meta-analysis. *Heliyon*, 6, e03414.
- SUR, C., BETZ, H. & SCHLOSS, P. 1996. Localization of the serotonin transporter in rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 8, 2753-2757.
- TAKAHASHI, T. & BERGER, A. J. 1990. Direct excitation of rat spinal motoneurons by serotonin. *The Journal of Physiology*, 423, 63-76.
- TALMON, M., ROSSI, S., PASTORE, A., CATTANEO, C. I., BRUNELLESCHI, S. & FRESU, L. G. 2018. Vortioxetine exerts anti-inflammatory and immunomodulatory effects on human monocytes/macrophages. *British journal of pharmacology*, 175, 113-124.
- TENG, Y. D., BINGAMAN, M., TAVEIRA-DASILVA, A. M., PACE, P. P., GILLIS, R. A. & WRATHALL, J. R. 2003. Serotonin 1A receptor agonists reverse respiratory abnormalities in spinal cord-injured rats. *Journal of Neuroscience*, 23, 4182-4189.
- THOR, K., NICKOLAUS, S. & HELKE, C. 1993. Autoradiographic localization of 5-hydroxytryptamine1A, 5-hydroxytryptamine1B and 5-hydroxytryptamine1C/2 binding sites in the rat spinal cord. *Neuroscience*, 55, 235-252.
- VAREJÃO, A. S., CABRITA, A. M., MEEK, M. F., BULAS-CRUZ, J., MELO-PINTO, P., RAIMONDO, S., GEUNA, S. & GIACOBINI-ROBECCHI, M. G. 2004. Functional and morphological assessment of a standardized rat sciatic nerve crush injury with a non-serrated clamp. *Journal of neurotrauma*, 21, 1652-1670.

- VAREJÃO, A. S., MEEK, M. F., FERREIRA, A. J., PATRÍCIO, J. A. & CABRITA, A. M. 2001. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *Journal of neuroscience methods*, 108, 1-9.
- WAEBER, C., HOYER, D. & PALACIOS, J. 1989. 5-hydroxytryptamine₃ receptors in the human brain: autoradiographic visualization using [3H] ICS 205-930. *Neuroscience*, 31, 393-400.
- WAGNER, F. B., MIGNARDOT, J.-B., LE GOFF-MIGNARDOT, C. G., DEMESMAEKER, R., KOMI, S., CAPOGROSSO, M., ROWALD, A., SEÁÑEZ, I., CABAN, M. & PIRONDINI, E. 2018. Targeted neurotechnology restores walking in humans with spinal cord injury. *Nature*, 563, 65-71.
- WALTERS, B. C., HADLEY, M. N., HURLBERT, R. J., AARABI, B., DHALL, S. S., GELB, D. E., HARRIGAN, M. R., ROZELLE, C. J., RYKEN, T. C. & THEODORE, N. 2013. Guidelines for the management of acute cervical spine and spinal cord injuries: 2013 update. *Neurosurgery*, 60, 82-91.
- WESTGREN, N. & LEVI, R. 1998. Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 79, 1433-1439.
- WITIWI, C. D. & FEHLINGS, M. G. 2015. Acute spinal cord injury. *Journal of Spinal Disorders and Techniques*, 28, 202-210.
- WITT, A., KUMRU, H., OPISSO, E. & VIDAL, J. 2018. Traumatic spinal cord injury due to human tower accident in Catalonia. *Spinal cord series and cases*, 4, 1-4.
- ZEMLAN, F. P., BEHBEHANI, M. M. & MURPHY, R. M. 1988. Serotonin receptor subtypes and the modulation of pain transmission. *Progress in brain research*. Elsevier.
- ZEMLAN, F. P. & SCHWAB, E. F. 1991. Characterization of a Novel Serotonin Receptor Subtype (5-HT_{1s}) in Rat CNS: Interaction with a GTP Binding Protein. *Journal of neurochemistry*, 57, 2092-2099.
- ZHANG, Y.-Q., GAO, X., JI, G.-C., HUANG, Y.-L., WU, G.-C. & ZHAO, Z.-Q. 2002. Expression of 5-HT_{1A} receptor mRNA in rat lumbar spinal dorsal horn neurons after peripheral inflammation. *Pain*, 98, 287-295.
- ZIVIN, J. A., DOPPMAN, J. L., REID, J. L., TAPPAZ, M. L., SAAVEDRA, J. M., KOPIN, I. J. & JACOBOWITZ, D. M. 1976. Biochemical and histochemical studies of biogenic amines in spinal cord trauma. *Neurology*, 26, 99-99.

EKLER:

EK 1-Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası:

	
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI CERTIFICATE of ANIMAL USE in EXPERIMENTAL RESEARCH	
BERKAY BOZKURT	
Yeditepe Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun düzenlediği 80 saatlik Laboratuvar Hayvanları kursunu tamamlamış ve kurs sınavında başarılı olmuştur Has completed the 80 hours course and passed the examination in Laboratory Animal Science organized by the Animal Research Ethics Committee of Yeditepe University.	
14-24 Mayıs 2012/May 14-24,2012 İstanbul,TÜRKİYE/Istanbul,TURKEY	
 Prof. Dr. Ece GENÇ Yeditepe Üniversitesi/Yeditepe University Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanı / Head of the Animal Research Ethics Committee	 Prof. Dr. Nurcan BAÇ T.C.Yeditepe Üniversitesi Rektörü President of the Yeditepe University



YEDİTEPE ÜNİVERSİTESİ

DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI CERTIFICATE of ANIMAL USE in EXPERIMENTAL RESEARCH



14-24 Mayıs (May) 2012

	Konu / Subject	Teorik / Lectures (Saat / Hours)	Pratik / Practical (Saat / Hours)
1	Hayvan Deneyleri Etiği / Ethics in Animal Experiments	2	
2	Mevzuat ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi / Legislation and Laboratory Animal Science	3	
3	Deney Hayvanları Tutuş Teknikleri / Handling Techniques of Laboratory Animals	2	5
4	Deney Hayvanlarının Anatomi, Histoloji, Fizyoloji ve Biyokimyası / Anatomy, Histology, Physiology and Biochemistry of Laboratory Animals	6	
5	Deney Hayvanı Hastalıkları (Mikrobiyoloji, Viroloji ve Parazitoloji) / Diseases of Laboratory Animals (Microbiology, Virology and Parasitology)	2	
6	Alternatif Yöntemler / Alternative Methods	3	
7	Transgenik Hayvan Üretimi / Transgenic Animals	2	
8	Deney Hayvanları Merkezi Kuruluş ve İşletmesi / Establishment and Management of Laboratory Animals Research Center	1	
9	İş Sağlığı ve Güvenliği ve Biyoistatistik / Work Health and Safety and Biostatistics	4	
10	Deney Hayvanlarının Beslenmesi (Gavaj Uygulama Metodu) / Feeding of Laboratory Animals (Gavage Application Method)	1	5
11	İlaç Uygulama Teknikleri / Drug Administration Techniques	3	5
12	Anestezi ve Ötenazi Teknikleri / Anesthesia and Euthanasia Techniques	3	5
13	Hayvan Refahı ve Davranışları / Animal Welfare and Behavior	2	
14	Kan ve Örnek Alma Teknikleri (Temel Yöntemler) / Blood Collection and Sampling Techniques (Basic Procedures)	3	5
15	Deney Hayvanlarının Üretilmesi / Breeding of Laboratory Animals (Vaginal Smear Test)	2	5
16	Laboratuvar Temizliği ve Güvenliği / Laboratory Hygiene and Safety	2	
17	Deney Hayvanlarının Anatomi, Histoloji, Fizyoloji ve Biyokimyası Uygulama Eğitimi / Practical in Anatomy, Histology, Physiology and Biochemistry of Laboratory Animals		5
18	Deney Hayvanı Uygulamaları / Practicals on Experimental Animals		5
	Toplam / Total	40	40

Kurs Sınav Puanı / Course Exam Score : 84

Adı Soyadı: BERKAY BOZKURT
(Name Surname)

Sertifika No (Certificate Number): YTÜDHK VII / 27

EK 2 -Etik Kurul Onayı:

T.C
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : 2
Konu: Kararlar

14.1/2020

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Deneyel Rat Omuriliği Yaralanma Modelinde Vortioxetin'in Tedavi Edici ve Motor Fonksiyonlar Üzerine İyileştirici Etkilerinin Değerlendirilmesi
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Evaluation the effect of vortioxetin on treatment and improvement of Motor functions in experimental Rat Spinal Injury Model
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Prof.Dr.Ali Rıza GEZİCİ
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Dr.Öğr.Üyesi Aslıhan ŞAYLAN, Dr.Berkay BOZKURT
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2020/01	Tarih (Date): 08.01.2020
	Prof.Dr.Ali Rıza GEZİCİ'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın 21 adet sıçan ile gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof.Dr.Tufan MERT (Başkan)	Biyofizik AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Prof. Dr. Hamit COŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Fen Edebiyat Fakültesi	Katılmadı
Doç. Dr. Yeşim YENER (Üye)	Temel Eğitim Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Eğitim Fakültesi	Katılmadı
Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cerrahi AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr.Uğur ÜYETÜRK (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr.Mustafa DİLEK (Üye)	Çocuk Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	Katılmadı
Dr.Öğr.Üyesi Serdar GÖZÜTOK (Üye)	Yaban Hayatı ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hayriye ORALLAR (Üye)	Kanatlı Hayvan Yetiştiriciliği Bölümü	BAİBÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ÇETİNKAYA (Üye)	Fizyoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr.Öğr.Üyesi Canan AKÜNAL TÜREL (Üye)	Nöroloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr.Öğr.Üyesi ÖZGÜR Mehmet YİS (Üye)	Biyokimya AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr.Öğr.Üyesi Şevki GÜLER	Periodontoloji AD Öğretim Üyesi	BAİBÜ Diş Hekimliği Fakültesi	İzinli
Veteriner Hekim Enes EĞİLMEZ (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	BAİBÜ Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi	
Veteriner Hekim Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLU BEYPİLİÇ AŞ.	
Av.Cihan YAVUZ (TC Üyesi)	Avukat	Aşağı Soku Mah. Şair Şinasi Sok. Ayşe Hanım Apt.24/6 BOLU	

ÖZGEÇMİŞ:

Berkay BOZKURT, 1990 yılında Sakarya’da doğmuştur. İlköğrenimini Sakarya Üniversitesi Vakfı İlköğretim Okulu’nda tamamlamıştır ve Sakarya Fen Lisesi’nden mezun olmuştur. Tıp eğitimini 2008-2014 yılları arasında Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde alarak tıp doktoru ünvanını taşımaya hak kazanmıştır. 2014 yılında Sakarya Akyazı Toplum Sağlığı Merkezi’nde başladığı zorunlu hizmet görevine; Sakarya Ferizli’de ilçe sağlık müdürü ve ardından Sakarya Taşkısığı Kışlası’nda kışla hekimi olarak devam ettikten sonra 2015 yılında Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde beyin ve sinir cerrahisi uzmanlık eğitimine başlamıştır. Edirne’de geçen bir yılı takiben 2016’da beyin ve sinir cerrahisi uzmanlık eğitimine Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde devam etmeye başlamıştır. Halen Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.

