

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA miR-20a
VE miR-125b EKSPRESYONLARININ APOPİTOZ VE
ENFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dilek ŞAKER

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT**

ADANA-2017

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**DENEYSEL SPİNAL KORD YARALANMASINDA miR-20a
VE miR-125b EKSPRESYONLARININ APOPİTOZ VE
ENFLAMASYON ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dilek ŞAKER

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Sait POLAT**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2016-5619' nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:
ADANA-2017

KABUL VE ONAY

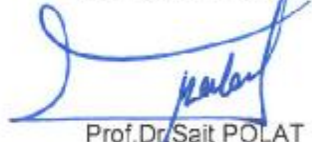
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“Deneyisel Spinal Kord Yaralanmasında miR-20a ve miR-125b Ekspresyonlarının
Apopitoz ve Enflamasyon Üzerine Etkileri ” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans**
Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 01 / 08 / 2017

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Sait POLAT
Çukurova Üniversitesi
Başkan


Prof. Dr. Ufuk Ö. METE
Çukurova Üniversitesi
Üye


Prof. Dr. S. Necati YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Hülya ÖZGÜR
Çukurova Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Leman SENCAR
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

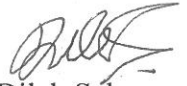
T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS / DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI
ETİK BEYANI

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesini okuduğumu ve anladığımı ve Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Tez olarak sunduğum bu çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda bu konuda hakkımda yapılacak tüm yasal işlemleri ve aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 01.10.2017

İMZA



Adı Soyadı Dilek Şaker

Kayıtlı olunan Program : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tezin Konusu : Deneysel Spinal Kord Yaralanmasında miR-20a ve miR-125b
Ekspresyonlarının Apoptoz ve Enflamasyon Üzerine Etkileri

Tezin Türü : Yüksek Lisans : ☒ Doktora: ☐

Danışmanın Adı-Soyadı : Prof. Dr. Sait POLAT
Danışmanın İletişim Bilgileri
Telefon :
E-Posta : spolat@cu.edu.tr

Öğrencinin İletişim Bilgileri
Telefon : 05348856472
E-Posta : dileksaker@gmail.com
Adresi : Ç. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.

**Bu belgenin Lisansüstü eğitim tezleri savunmaya alınmadan önce öğrenci tarafından doldurulup imzalanarak Enstitü Müdürlüğüne teslim edilmesi gerekmektedir.*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, tezin projelendirme, uygulama ve yazım aşamalarında bana her zaman destek olan ve cesaretlendiren, bilimsel duruşunu her daim örnek aldığım değerli danışman hocam ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sait POLAT’a, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca gerek tez çalışmalarım sırasında gerekse eğitim aldığım süre boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalımızın bütün öğretim üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında dokuların alınması ve diğer katkı ve yardımları için Fakültemiz Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Derviş Mansuri YILMAZ’a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca dokuların hazırlanması ve kesit alma işlemlerinde yardım ve desteklerinden dolayı Anabilim Dalımız teknisyenleri Nevriz DURAL ve Zuhal ÖZKURT’a da teşekkürü borç bilirim. Uzun bir eğitim süresini beraber paylaştığım, dostluklarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma ve tez çalışmalarım boyunca katkılarından dolayı arkadaşım Leyla ATAÇ’a da teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca beni koşulsuz ve sabırla destekleyen sevgili babam Adnan ŞAKER ile sevgili annem Emel ŞAKER’e ve kardeşlerim Mehmet ve Okan’a da sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca lisansüstü eğitim-öğretimim boyunca beni destekleyen “TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programına” desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Arş. Gör. Dilek ŞAKER

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Spinal Kord Histolojisi	4
2.2. Spinal Kord Yaralanmaları	5
2.3. Metilprednizolon Tedavisi	9
2.4. Enflamatuvar Cevaplar ve Sitokinlerin Rolü	10
2.5. Spinal Kord Hasarından Sonra Gen Ekspresyon Değişimi	12
2.6. MikroRNA	13
2.6.1. MikroRNA Biyogenezi	14
2.7. Spinal Kord Hasarında MikroRNA'lar	16
2.7.1. miR-20a ve miR-125b	22
2.8. Tümör Nekroz Faktör Alfa ve İnterlökin-6	23
2.9. Apoptoz	26
2.9.1. Kaspaz-3	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi ve gruplara ayrılması	30
3.2. Operasyon	30
3.3. Tedavinin Uygulanması	31
3.4. Dokuların Alınması	32
3.5. Işık Mikroskopi Yöntemleri	32
3.6. İmmünohistokimya Yöntemleri	33
3.6.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi	34
3.7. Elektron Mikroskopi Yöntemleri	34

3.8. Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT- PCR) ..	36
3.9. İstatistiksel Analiz	38
4. BULGULAR.....	39
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	39
4.1.1. Kontrol Grubu	39
4.1.2. Sham operasyon grubu	40
4.1.3. Deney Kontrol Grubu.....	41
4.1.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup.....	43
4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular	45
4.2.1. Kontrol Grubu	45
4.2.2. Sham operasyon grubu	48
4.2.3. Deney Kontrol Grubu.....	50
4.2.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup.....	54
4.3. İmmünohistokimya Bulguları	57
4.3.1. Kontrol grubu	59
4.3.2. Sham operasyonu grubu	61
4.3.3. Deney Kontrol Grubu.....	63
4.3.3.1. TNF- α immünoaktivitesi.....	63
4.3.3.2. IL-6 İmmünoaktivitesi	64
4.3.3.3. Kaspaz-3 İmmünoaktivitesi	66
4.3.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup	67
4.3.4.1. TNF- α İmmünoaktivitesi	67
4.3.4.2. IL-6 İmmünoaktivitesi	69
4.3.4.3. Kaspaz-3 İmmünoaktivitesi	70
4.3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme	72
4.4. Moleküler Biyolojik Bulgular	74
4.4.1. Spinal Kord Hasarının miR-20a üzerine etkisi	74
4.4.2. Spinal Kord Hasarının miR-125b üzerine etkisi	74
5. TARTIŞMA.....	76
6. SONUÇLAR.....	87
KAYNAKLAR	90
ÖZGEÇMİŞ	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:

Sayfa No:

Çizelge 1. Işık mikroskopik doku takip işlemi	32
Çizelge 2. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi.....	35
Çizelge 3. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi.....	35
Çizelge 4. Gömme materyalinin hazırlanışı.....	35
Çizelge 5. Reverse-transkripsiyon reaksiyon bileşenleri	37
Çizelge 6. Real time PCR reaksiyon bileşenleri	37
Çizelge 7. Real time PCR döngü koşulları	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. MikroRNA yolağı	15
Şekil 2. SKH’nda antienflamatuvar ve antiapoptotik etkili miRNA’lar.....	19
Şekil 3. SKH’nda proenflamatuvar ve proapoptotik etkili miRNA’lar	20
Şekil 4. Operasyon..	31
Şekil 5. Kontrol grubu. Spinal kordun ışık mikroskopik görünümü.	40
Şekil 6. Sham operasyon grubu. Spinal kordun ışık mikroskopik görünümü.	41
Şekil 7. Deney kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü.	43
Şekil 8. Metilprednizolon grubu ışık mikroskopik görünümü..	45
Şekil 9. Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	47
Şekil 10. Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	47
Şekil 11. Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü..	49
Şekil 12. Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü..	49
Şekil 13. Deney kontrol grubunda 1. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	51
Şekil 14. Deney kontrol grubundan 3. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 15. Deney kontrol grubundan 7. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	52
Şekil 16. Deney kontrol grubundan 7. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü..	53
Şekil 17. Deney kontrol grubundan 14. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	53
Şekil 18. Metilprednizolon grubundan 1. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü..	55
Şekil 19. Metilprednizolon grubundan 3. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü..	55
Şekil 20. Metilprednizolon grubundan 7. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	56
Şekil 21. Metilprednizolon grubundan 14. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.	56
Şekil 22. Metilprednizolon grubundan 14. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü.....	57
Şekil 23. TNF- α immünoreaktivitesi.....	57

Şekil 24. IL-6 immunoreaktivitesi.	58
Şekil 25. Kaspaz-3 immunoreaktivitesi.....	58
Şekil 26. Kontrol grubunda TNF- α immunoreaktivitesi..	59
Şekil 27. Kontrol grubunda IL-6 immunoreaktivitesi..	60
Şekil 28. Kontrol grubunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi.	60
Şekil 29. Sham operasyon grubunda TNF- α immunoreaktivitesi..	61
Şekil 30. Sham operasyon grubunda IL-6 immunoreaktivitesi.	62
Şekil 31. Sham operasyon grubunda kaspaz- 3 immunoreaktivitesi.	62
Şekil 32. Deney kontrol grubu TNF- α immünoreaktivitesi.....	64
Şekil 33. Deney kontrol grubu IL-6 immunoreaktivitesi.	65
Şekil 34. Deney kontrol grubu kaspaz-3 immünoreaktivitesi..	67
Şekil 35. Metilprednizolon grubu TNF- α immünoreaktivitesi.....	68
Şekil 36. Metilprednizolon grubunda IL-6 immunoreaktivitesi.	70
Şekil 37. Metilprednizolon grubunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi.....	71
Şekil 38. IL-6, TNF- α ve kaspaz-3 için immünohistokimyasal skorlama.	73
Şekil 39. Spinal kord hasarının miR-20a gen ekspresyonuna etkisi.....	74
Şekil 40. Spinal kord hasarının miR-125b gen ekspresyonuna etkisi	75

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptoz İndükleyici Faktör
AMPA	: α -amino- 3- hidroksi-5- metil-4-izoksazolepropanoik asit
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
Ca	: Kalsiyum
CAMs	: Hücre Adhezyon Molekülleri
cDNA	: Complementary DNA
C.Elegans	: Caenorhabditis elegans
COX	: Siklooksijenaz
Downregülasyon	: Azaltarak düzenleme
Downstream	: Aşağı akış
EAA	: Ekstraselüler Eksitator Aminoasit
EMT	: Epitelyal Mezenşimal Geçiş
FasL	: Fas Ligand
GAP-43	: Growth Associated Protein-43
Hsp-70	: 70 kd ısı şok proteini
ICAM	: İntersellüler Hücre Adhezyon Molekülü
IL-1	: İnterlökin-1
IL-1β	: İnterlökin-1 β
IL-2	: İnterlökin-2
IL-6	: İnterlökin-6
IL-10	: İnterlökin-10
IV	: İntravenöz
IRF	: İnterferon Düzenleyici Faktör
iNOS	: İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
Mcl	: Myeloid Hücre Lösemi Proteini
MCP	: Monosit Kemotaktik Protein
MIP	: Makrofaj Enflamatuvar Protein
miRNA	: MikroRNA
mm	: Milimetre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi

MP	: Metilprednizolon
MPO	: Miyeloperoksidaz
mTOR	: Rapamisinin Memeli Hedefi
Ngn	: Neurogenin
NASCIS	: Amerikan Ulusal Akut Spinal Kord Hasarları Çalışma Grubu
NBC	: Sodyum bikarbonat ko-Transporter
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa B
ng	: Nanogram
NO	: Nitrik oksit
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
O₂⁻	: Süperoksit
OH⁻	: Hidroksil
ONOO⁻	: Oksidan Peroksinitrit
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
PDCD	: Programlanmış Hücre Ölüm Proteini
PECAM	: Platelet Endotelial Hücre Adhezyon Molekülü
PTEN	: Fosfotaz ve Tensin Homoloğu
RISC	: RNA Induced Silencing Complex
Pre-miRNA	: Precursor microRNA
Pri-miRNA	: Primer microRNA
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SKH	: Spinal Kord Hasarı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TGF-β	: Transforming Büyüme Faktörü-β
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktör-α
TRBP	: Tar Binding Protein
μg	: Mikrogram
μm	: Mikrometre
UTR	: Untranslated Region
Upregülasyon	: Artırarak düzenleme

ÖZET

Deneyssel spinal kord yaralanmasında miR-20a ve miR-125b ekspresyonlarının apoptoz ve enflamasyon üzerine etkileri

MikroRNA'lar (miRNA'lar), hedef mRNA'lara bağlanıp, mRNA'ların translasyonlarını baskılayan kısa (18-25 nükleotid uzunluğunda), kodlanmayan RNA'lardır. MiRNA'lar hücrede çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçlerde yer alan, post-transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli roller üstlenen yapılardır. MiRNA'lar; gen ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzenlenmesi, metabolik düzenleme, hafıza ile sinaptik gelişim, organizmada embriyogenez, organogenez, farklılaşma ve büyümenin kontrolü gibi kritik rollere sahiptir. Bunların yanında, son zamanlarda yapılan araştırmalarda, miRNA'ların kanser, metabolik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, virüs enfeksiyonları ve travmatik nörolojik yaralanmalarda da önemli rollerinin olduğu gösterilmiştir. Hücrelerde meydana gelen fonksiyonel bozukluğun oluşmasında, en önemli mekanizma, miRNA'ların ifade düzeyinde meydana gelen değişikliklerdir. Bu bağlamda, hücrelerde miRNA'ların değişen ekspresyon düzeyleri ile hastalıkların oluşumu ile teşhis ve terapötik uygulamalar arasında çok yakın ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Günümüzde moleküler tıp uygulamalarında miRNA'lar, hastalıkların gelişiminde yeni bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Spinal kord hasarı (SKH) motor ve duysal fonksiyonların tam veya kısmen kaybına neden olan ciddi bir merkezi sinir sistemi hastalığıdır. Bugüne kadar geliştirilen çeşitli tedavi stratejilerine rağmen, SKH sonrası fonksiyonel iyileşme için etkili bir tedavi henüz tam olarak bulunamamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ve biyoinformatik analizler SKH patogeneğinde, miRNA'ların ifadelerinde meydana gelen değişimlerin, sekonder doku hasarında etken olabileceğini göstermektedir. Sıçanlarda yapılan deneyssel çalışmalarda, microarray analizlerine göre SKH sonrasında 300'e yakın miRNA'nın eksprese olduğu ve 97 miRNA'nın ifadesinde önemli değişikliklerin meydana geldiği rapor edilmiştir. Bu bulgular, SKH tedavisinde, miRNA'ların potansiyel hedefler olabileceğini düşündürmektedir. miRNA'ların SKH patogeneğinde çeşitli koruyucu veya zararlı etkilerinin olabileceği ileri sürülmektedir. Bununla birlikte, günümüzde hala SKH patogenezinin altında yatan mekanizmalar tam açık değildir. Bu nedenle çalışmamızda, deneyssel olarak yetişkin erkek sıçanlarda oluşturulan SKH'nda miR-20a ve miR-125b ekspresyonları ile apoptoz ve enflamasyon arasındaki ilişkilerin mikroskobik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler ile araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla 42 adet Wistar cinsi erkek sıçan, herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan kontrol grubu, spinal kord T2-T7 segmentleri arasında yalnızca laminektomi oluşturulan sham operasyon grubu ve T2-T7 arasında klip kompresyon yöntemi ile SKH oluşturulan deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı. SKH'nı takiben deney grubunda yer alan hayvanlar da kendi aralarında; spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra yalnızca serum fizyolojik verilen deney kontrol grubu; spinal kord hasarını takiben MP tedavisi uygulanan grup olarak 2 alt gruba ayrıldı. Tüm sham ve deney gruplarından spinal kord doku örnekleri yaralanmayı takiben 1, 3, 7, ve 14. günlerde elde edilerek, ışık ve elektron

mikroskobik, immunohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle değerlendirildi.

TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun, deney kontrol grubunda 1. ve 3. günlerde yükseldiği, 7. ve 14. günlerde azaldığı, MP tedavisi alan grupta ise özellikle 7. ve 14. günlerde her iki sitokinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi. Kaspaz-3 ekspresyonunun, deney kontrol grubu 1. günde yükseldiği, 3, 7 ve 14. günlerde anlamlı olarak azaldığı izlendi. Tedavi gruplarında kaspaz-3 ekspresyonunun azalmış olduğu dikkati çekti. Işık ve elektron mikroskobik incelemelerde, SKH oluşturulan gruplarda, nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde yapısal dejenerasyonların meydana geldiği ve bu değişikliklerin, 1. ve 3. günlerde daha belirgin olduğu, 7. ve 14. günlerde azaldığı gözlemlendi. Tedavi gruplarında hücresel yapının, deney kontrol gruplarına oranla daha iyi korunduğu belirlendi. SKH'ndan sonra deney kontrol grubu 1. ve 3. günlerde ve tedavi grubu 1. günde miR-20a ekspresyonunun upregüle olduğu görüldü. miR-125b ekspresyonunun ise deney kontrol grubu 3. ve 7. günlerde downregüle olduğu görüldü.

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel akut spinal kord yaralanmasından sonra miR-20a upregülasyonunun proenflamatuvar molekülleri indükleyerek enflamasyonu artırabileceği düşünüldü. Diğer taraftan, miR-125b'nin kaspaz-3 ile ilişkili olabileceği ve hasardan sonra miR-125b downregülasyonunun apoptozu inhibe edebileceği şeklinde yorumlandı. Bu nedenle, miR-20a ve miR-125b'nin SKH'nda biyomarkır ve tedavi ajanı olarak dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: miR-20a, miR-125b, apoptoz, enflamasyon, spinal kord yaralanması.

ABSTRACT

The effects of miR-20a and miR-125b expressions on apoptosis and inflammation in experimental spinal cord injury

MicroRNAs (miRNAs) are a class of short (18-25 nucleotide), noncodingRNAs that bind to target mRNAs, blocking their translation. MiRNAs are involved in many physiological and pathological processes in the cell and play an important role in post-transcriptional gene regulation. Furthermore, miRNAs play critical roles in the organism, such as post-transcriptional regulation of gene expression, metabolic regulation, memory, synaptic development, embryogenesis, organogenesis, differentiation and growth control. Additionally, in recent studies, it has been reported that miRNAs have significant roles in cancer, metabolic disorders, cardiovascular diseases, viral infections and traumatic neurological injuries. Changes in the expression levels of miRNAs is the major cause of functional disorders that occurred in the cells. It is revealed that there is a close relationship between varying expression levels of miRNA and formation, diagnosis and treatment of diseases. Nowadays, miRNAs are used as a new biomarker for the development of disease in molecular medicine. Spinal cord injury (SCI), is a serious central nervous system disorder leads to complete or partial loss of sensory and motor functions. Although various treatment strategies has been developed until today, there is still no effective treatment protocol for functional recovery after spinal cord injury. In recent years, researches and bioinformatic analyses showed that the variations in miRNA expression levels can cause secondary tissue damage in SCI pathogenesis. It has been reported that in experimental SCI model in rats, approximately 300 miRNAs are expressed and significant expression changes occurred in 97 of those miRNAs according to the microarray analyses. It is suggested that miRNAs can be potential targets in SCI treatment. On the other hand It is also suggested that miRNAs may have protective and harmful effects in SCI pathogenesis. However, the underlying mechanisms of spinal cord injury pathogenesis is still unclear today. In this study we aimed to investigate the relationship between miR-20a and miR-125b expressions and apoptosis and inflammation in experimental SCI model in rats with using microscopic, immunohistochemical and molecular biological methods.

Fourty two wistar rats were divided into 3 main groups as intact control group; they did not receive any operation, sham operation group; we created laminectomy on T2-T7 levels of spinal cord, and experimental group received spinal cord compression injury. Following injury the experimental group subdivided into 2 groups as: experimental control group, which did not receive any drug administration, methylprednisolone treatment group; they received MP following injury. Tissue samples were obtained from all groups at 1, 3, 7 and 14. days after injury for light and electron microscopic, immunohistochemical and molecular biological examinations.

We found an increase in TNF- α and IL-6 levels in experimental control group on 1. and 3. days. We also obtained that there were a significant decrease in both cytokines expressions in experimental control group on 7. and 14. days and MP treatment group. Moreover we observed an increase on kaspaz-3 levels in

experimental control group on 1 th day. On the other hand, in experimental control group on 3, 7 and 14. days and in the treatment group there were a significant decrease in kaspaz-3 levels. Furthermore we found structural degenerations in neurons, glia cells and axons in the SCI groups of the light and electron microscopic examinations. These degenerations were more prominent in 1 and 3 days injury groups. However, the ultrastructure of the cells were well preserved in MP treatment group when compared with experimental control groups. Also, we obtained that the expression of miR-20a was upregulated in experimental control group on 1 and 3 days and in treatment group on 1 day after injury. In contrast we observed that miR-125b expression was downregulated in experimental control groups on 3 and 7. days.

When all results are evaluated together, we thought that after experimental SCI, miR-20a upregulation could induce proinflammatory molecules and thus increases inflammation. On the other hand, we thought that miR-125b may be associated with caspase-3 and after injury miR-125b downregulation may inhibits apoptosis. These results suggest that miR-20a and miR-125b can be considered as biomarkers and treatment agents in SCI.

Key Words: miR-20a, miR-125b, apoptosis, inflamation, spinal cord injury.

1. GİRİŞ

Spinal kord hasarı (SKH), günümüzde çok sayıda insanı etkileyen ciddi bir sağlık sorunudur. Motorlu araç kazaları, spor ve eğlence aktiviteleri ile işyeri veya evde düşmeye bağlı kazalar, spinal kord hasarının başlıca sebepleri arasındadır¹. Spinal kord yaralanmaları sonucu meydana gelen doku hasarının nedenleri ortaya konulmuş olmakla birlikte hücresel mekanizmalar hala önemli bir araştırma konusu olarak güncelliğini korumaktadır. Yaralanma sonucu uygulanan geleneksel terapötik yöntemler, duyuşal işlev kaybını ve paralizi önlemek için moleküler bir yaklaşımdan yoksundur². SKH'nda uygulanan steroid ilaç uygulamaları ve hücre transplantasyonu gibi çeşitli tedavi stratejilerine rağmen, yaralanma sonrası klinik uygulamalarda fonksiyonel iyileşme için bugün hala tam olarak etkili bir tedavi yöntemi bulunmamaktadır³.

SKH patolojisi iki aşamaya ayrılmaktadır; primer yaralanma, travma sonucu spinal korda doğrudan zarar veren mekanik bir etkidir; sekonder yaralanma ise, iskemi, fokal kanama, iyonik homeostazın bozulması ve enflamatuvar cevapları içeren, oldukça karmaşık moleküler reaksiyonlara bağlı olarak meydana gelmektedir⁴. SKH'ndan sonra oluşan hücresel süreçler, değiştirilmiş gen ifade şekilleri ile ilişkilidir, buna bağlı olarak enflamasyon ve hücre ölümü ile ilgili genler yaralanma sonrası güçlü bir şekilde upregüle olmaktadır⁵.

MikroRNA (miRNA)'lar, hedef mRNA'ların veya promotörlerin spesifik dizileri ile etkileşerek gen ekspresyonunu düzenleyen, 18-24 nükleotid uzunluğunda küçük kodlanmayan RNA molekülleridir⁶. MikroRNA'lar hücrede transkripsiyon sonrasında, mRNA'ları hedef alarak protein sentezini baskılar veya mRNA yıkımını hızlandırır. Günümüzde farklı hücre ve dokularda pek çok yeni biyolojik rolleri keşfedilen mikroRNA'ların bir ya da birden fazla hedef geni baskılayarak çeşitli gelişim süreçlerinde, hücre farklılaşması ve çoğalması ile hücre ölümü gibi pek çok farklı olaylarda rol oynadıkları belirlenmiştir⁷. MikroRNA'ların sinir sisteminde mRNA transkripsiyonu sonrası translasyonda düzenleyici olarak görev yaptıkları bilinmektedir⁶. Literatürde SKH'na bağlı miRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler hakkında yayınlanmış sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır⁸. MikroRNA'ların, SKH'ndan sonra gen ekspresyonlarının düzenlenmesinde görev almaları, bu nedenle de, nöronal hücre ölümü ve hücrelerin hayatta kalmalarının

sağlanmasında potansiyel terapötik ajanlar olarak değerlendirilebilecekleri rapor edilmiştir⁶.

SKH sonrasında, pek çok sitokin ve kemokin sentezi ile beraber, hasar gören bölgenin periferik kan lökositleri tarafından eşgüdümlü infiltrasyonu ile karakterize olan, güçlü bir immün cevap başlamaktadır⁹. SKH'nın akut evresindeki travmatik çevrede, proenflamatuvar sitokinler olan IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın yüksek ekspresyonu belirlenmiştir. Biyoinformatik analizler, miRNA'ların, enflamasyon cevabına aracılık eden mRNA'ların hedeflenmesi yoluyla, SKH'ndan sonra enflamasyona katıldıklarını ortaya koymaktadır⁶. SKH'nda enflamatuvar cevabı modüle eden sitokinlerin (IL-1, IL-6 ve TNF- α) ekspresyonları yaralanmadan sonra seviyeleri değişen miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir¹⁰.

Merkezi sinir sisteminde hasarı takiben hücrelerde oluşan apoptoz; nöronal atrofi, akson demiyelinizasyonu ile mikroglial nodül oluşumlarıyla sonuçlanan, başlıca nöronlar, oligodendrositler ve mikroglial hücrelerde oluşan aktif bir hücre ölüm şeklidir^{11,12}. Kaspazlar, apoptotik yolun en etkili efektörleridir; bundan dolayı da, programlanmış hücre ölümü için önemli araçlardır. Kaspaz-9; kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi, efektör kaspazların inaktif formlarını parçalayan bir kaç başlatıcı kaspazdan birisidir. Buna karşılık, aktif kaspaz-3, yaralanmayı takiben apoptozun temel aracısıdır ve hem kaspaz-9'u hem de kendisini parçalayabilir¹³. miRNA'ların, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu inhibe ederek apoptozda rol oynadıkları bilinmektedir. SKH'ndan sonra, proapoptotik genleri hedefleyen birden çok miRNA downregüle olurken, antiapoptotik genleri hedef alan miRNA'lar upregüle olarak düzenlenmektedir¹⁴.

Biyoinformatik analizler, SKH'ndan sonra değişen miRNA ekspresyonunun sekonder SKH patogeneze katkıda bulunabileceğini önermektedir. Bununla birlikte, SKH patogenezinin altında yatan mekanizmalar günümüzde halen tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konuda yeni miRNA'lar keşfedilmeye devam etmektedir. Dolayısıyla spinal kord hasarı ile ilişkili miRNA'ların işlevlerini ve hedeflerini araştırmak için daha fazla çalışma gerekmektedir¹⁴⁻¹⁶. Günümüze kadar literatürde SKH'nda miR-20a ve miR-125b'nin apoptoz ve enflamasyonla ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Sunulan bu çalışmada, deneysel olarak yetişkin erkek sıçanlarda oluşturulan SKH'nda, miR-20a ve miR-125b ekspresyonları ile apoptoz ve enflamasyon arasındaki muhtemel ilişkilerin mikroskopik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler ile araştırılması amaçlandı.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Kord Histolojisi

Spinal kord, direkt olarak beyin sapı ile devam eden silindirik şekilli bir organdır. Omurga kanalı içinde, foramen magnumdan ikinci bel omuru hizasına kadar uzanır. Enine kesitte spinal kordun oval bir şekle sahip olduğu görülür. Posteriyorda, dorsal median septum vasıtası ile spinal kord iki eşit parçaya ayrılır, anterior (ventral) median fissur adında, derin longitudinal bir yarık bulunur. Spinal kord tümüyle pia mater ile sarılmıştır. Pia mater anterior median fissuradan içeri doğru girer¹⁷.

Spinal kord, 31 segmente bölünmüştür (8 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral, ve 1 koksigeal) ve her segment 1 çift spinal sinir ile bağlantılıdır. Her spinal sinir, korddaki segmentine dorsal ve ventral kökler halinde gruplanmış birkaç kökçük ile bağlanmıştır¹⁸.

Spinal kord'un uzunluğu boyunca çapı hafifçe değişir ancak enine kesitlerde her zaman merkezi kanal etrafında iki taraflı simetri gösterir. Spinal kordda gri madde iç kısımda yer alır ve merkezi kanal çevresindeki gri birleşme yeri ile birbirine bağlanan, iki arka boynuz (duyusal) ve iki ön boynuzdan (motor) meydana gelmiş, H şeklinli bir yapıdır¹⁹.

Gri madde içerisinde çok sayıda astrosit ile özellikle ön boynuzlarda motor nöronların büyük hücre gövdelerini (perikaryonlar) içerir. Sinir hücre perikaryonları gruplar halinde gri cevherde bulunurlar. Büyük motor nöronlar (Golgi tip I) anterior boynuzda yerleşmişlerdir ve rutin histolojik preparatlarda kolaylıkla izlenen büyük bazofilik hücrelerdir. Belirli bir düzen göstermeksizin ön boynuzda oldukça yoğun kümeler oluştururlar. Nöroplazmadaki Nissl cisimcikleri kaba ve çok sayıdadır¹⁷. Efferent nöronlar olan motor nöronların aksonları spinal kordı terk ederek ventral kökün içinden geçer, o segmentin spinal sinirinin bir komponenti olarak kaslara gider. Akson başlangıç ve sonlanma kısmı haricinde miyelin kılıfa sahiptir. Kas hücresinin yakınında akson kas hücresi ile nöromüsküler bağlantılar oluşturan çok sayıda terminal dallara ayrılmaktadır¹⁸.

Dorsal kök gangliyonlarındaki duyusal nöronlar psödonipolar tiptedir. Psödonipolar nöronun tek bir uzantısı vardır ve bu uzantı periferden hücre gövdesine

bilgi getiren bir periferik segmente ve hücre gövdesinden spinal kordun gri cevherine bilgi götüren bir merkezi segmente bölünür. Duyusal nöron MSS'ye impulsı taşıdığı için afferent nöronudur. İmpulslar periferik segmentin terminal reseptör dallanmalarında oluşturulurlar¹⁸.

Sinir liflerinden oluşan beyaz cevher, gri maddeyi çevreler ve ağırlıklı olarak oligodendrositleri ve omurilik boyunca uzanan miyelinli akson demetlerini içerir. Gri cevherin posterior boynuzu ile dorsal median septum arasında posterior ya da dorsal funikulus uzanır. Beyaz cevherin geri kalan kısmı ise ventral boynuz ve sinir kökleri vasıtası ile lateral sütunlara, anterior median fissur ile de ventral sütunlara ayrılmıştır. Posterior boynuzların uç kısmı ile spinal kord yüzeyinin arasında ince sinir liflerinin bulunduğu beyaz cevher bölgesine Lissauer hattı (Lissauer zone), gri madde uzantılarının beyaz maddeye karıştığı bölgeye Formasyo retikülaris adı verilmektedir¹⁷.

2.2. Spinal Kord Yaralanmaları

Spinal kord hasarı dünyada her yıl 180.000'den fazla insanda kalıcı sakatlıklara neden olmaktadır¹⁰. SKH gibi kompleks patolojik doku hasarları için tam olarak etkin bir tedavi yöntemi bulunmamasından dolayı morbidite ve mortalite oranı oldukça yüksektir²⁰. Günümüzde SKH klinikte hala önemli bir sağlık sorunu olmaya devam etmektedir ve bu yaralanmalara bağlı tedavi giderleri de tüm dünyada ekonomik olarak ağır bir yüke neden olmaktadır²¹. Kaza ve şiddet kaynaklı mekanik etkenlere bağlı oluşan spinal kord yaralanmaları daha çok travmatiktir, bununla birlikte diskopati ve tümör kaynaklı çok sayıda travmatik olmayan spinal kord hasarları da vardır²². Travmatik spinal kord hasarında, mekanik travmaya bağlı olarak spinal kordda transeksiyon, yırtılma, gerilme ve baskı meydana gelmektedir¹⁰. Spinal kord yaralanmasının tam veya kısmi olmasına bakılmaksızın parestezi, disestezi ve kronik nöropatik ağrı da dahil olmak üzere, anormal duyular yaralanmadan sonra bir kaç ay içerisinde gelişmektedir²³. Bu duyular, kortikal uyarılmayı etkileyebilir ve daha sonra da bilişsel yetersizlik ve psikolojik problemleri başlatabilir^{24,25}.

Akut SKH, primer ve sekonder hasar olmak üzere birbirini takip eden iki aşamaya ayrılır²⁶. Primer hasar, doğrudan mekanik travmanın neden olduğu nöral dokunun hasarını kapsar¹. İlk mekanik hasar, spinal kord fonksiyonunu büyük ölçüde etkileyen nöral, vasküler ve bağışıklık sistemlerini içeren karmaşık bir dizi sekonder

reaksiyonları tetikler¹⁰. Hasarın yayılmasının (eksitator aminoasit kaynaklı intraselüler Ca^{+2} artışı, proteoliz, serbest radikaller ve NO oluşumu gibi) nedeninin, hücresel fonksiyon bozukluğu ve hücresel ölümle sonuçlanan biyokimyasal reaksiyonlar zincirinin aktivasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir^{27,28,29,30}. Yaralanmaya bağlı oluşan bu kademeli yıkıcı olaylar sekonder yaralanma olarak tanımlanır⁹. İnsanda SKH'na yol açan mekanik olayları taklit etmek üzere çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir³¹. SKH patofizyolojisini hücre ve moleküler seviyede inceleyebilmek üzere geliştirilen hayvan modelleri güvenilir, tutarlı ve tekrarlanabilir olmalıdır. Çoğu araştırma laboratuvarlarında, sıçanlar veya fareler gibi memelilerde en yaygın kullanılan modeller kontüzyon hasarı veya transeksiyon modelleridir⁹. SKH araştırmalarında kullanılan bir diğer model ise kompresyon (sıkıştırma) modelidir; bu modelde, spinal korda anevrizma klipsi uygulanarak yaralama meydana getirilir³². Primer hasar bölgesinde uygulanan mekanik kuvvetler, nöronal ve endotel hücre membranlarında önemli hasarlara neden olmaktadır. Bu da hasar bölgesinin yumuşak kıvamı ve zengin vasküler yapısı nedeniyle, ağırlıklı olarak gri maddede yerleşen hemorajik nekroza sebep olmaktadır³³. SKH sonrası aksonal dayanıklılık miyelin kılıf varlığına bağlıdır¹. Geçici klip ile sıkıştırma modeli kullanarak oluşturulan SKH'nda, yaralama derecesi arttıkça, gri cevher yıkımına kıyasla mm^2 başına daha fazla miktarda miyelin kılıf yıkımı gözlenmiştir. Diğer taraftan, kompresyon yaralanması sonucunda büyük çaplı miyelinli liflerin belirgin bir şekilde korunduğu, küçük miyelinsiz liflerin daha savunmasız olabileceği rapor edilmiştir³⁴. Spinal kordda kompresyonun sürekliliği ile sekonder hasar mekanizmalarına dönüşen hücresel reaksiyonlar ve spesifik moleküller ortaya çıkmaktadır¹. Gri cevher hemorajisi ile lezyon bölgesinde meydana gelen direkt hücre ölümüne rağmen, primer hasar spinal kordda büyük bir yıkıma neden olmamaktadır³¹. Bununla birlikte, sekonder hasar mekanizmalarının ortaya çıkmasıyla beraber, klinik ve hücresel tablo olumsuz yönde değişmektedir. Sekonder hasar; vasküler değişiklikler, biyokimyasal bozukluklar ve hücre ölümüne yol açan hücresel cevapları içeren, birbiriyle ilişkili süreçleri kapsamaktadır³⁵. Spinal kord hasarından sonra gros değişikliğin en erken belirtisi, ilk 2 saat içerisinde, travma bölgesinde hemorajik alanın genişlemesi ve sayısız yaygın mikro kanamaların ortaya çıkmasıdır^{26,33}. Kısa bir süre sonra (6 saat) beyaz cevherde ödem oluşmaktadır³⁶. Travma sonrası ilk gün (12-24 saat), hemorajik alanlar büyümeye ve daha fazla

konfluent (mukozit) hale gelmeye devam eder. Ayrıca yaralanma bölgesinde gri ve beyaz cevher sınırları kaybolur ve ödem artar, doku yumuşar ve şişer³³. Kanama üçüncü güne kadar devam eder; sekizinci günde ise tamamen durur. Yaralanmadan 21 gün sonra, spinal kordda açık bir şekilde görülebilen ve on dört hafta boyunca geniş kistik bölgeleri oluşturmak üzere birleşen kavitasyonlar oluşur. Bu bölgeler çoğunlukla gliyal hücrelerden oluşan yara dokusu ile çevrilidir³¹. SKH'nın kronik evrelerinde, patofizyolojik olayların gelişimi primer yaralanma alanında spinal kordun atrofisine yol açar¹. Sekonder hasarın vasküler süreçleri, ödem oluşumu ile yakından ilişkilidir ve kan-spinal kord bariyerinin bozulmasını içerir. Kan-spinal kord bariyerinin bozulması, nötrofillerin ve makrofajların istilasıyla birlikte post-travmatik enflamatuvar yanıtı da tetikler. Ayrıca, astrositlerin de bu süreçlerde önemli rolleri bulunmaktadır. SKH sonrası astrositlerin, astrogliyozis olarak bilinen hiperplazi ve hipertrofi olmak üzere iki cevabı ortaya çıkmaktadır³⁷. Hipertrofi, hasar görmüş kan- beyin bariyerinin onarımını kolaylaştırırken, hiperplazi ise gliyozis gelişimine neden olmaktadır. Astrositlerdeki ileri morfolojik, moleküler ve işlevsel değişikliklerle karakterize olan bu iki süreç, primer yaralanmadan sonra spinal kord hasarına da katkıda bulunmaktadır⁶. Travma ile aktive olan endotel hücreleri ve gliyal hücreler, spinal kord perfüzyonunu etkileyen ve plazmadan köken alan moleküllerin, kordun içine geçmesini kolaylaştıran, vazoaaktif maddeleri (ör: reaktif O₂ molekülleri, NO ve histaminler gibi) serbest bırakırlar³⁸. Kan-spinal kord bariyerinin bozulması, hem endotelial glikokaliks üzerindeki bölgelerde anyonik yükün geçici olarak kaybedilmesi hem de sitokinleri de içeren plazma proteinlerinin ekstrasvazasyonu ile karakterizedir³⁹. Tator ve Koyanagi⁴⁰, insan SKH'ndaki vasküler etkiler üzerine yaptıkları çalışmada, yaralanma alanında hemorajinin gri cevherde daha belirgin olduğunu bildirmişlerdir. Bunun aksine, beyaz cevherde akut evrede miyelin kılıf bozulması ve aksonal şişme dahil non-hemorojik dejeneratif değişikliklerin meydana geldiğini göstermişlerdir⁴⁰.

SKH'nı takiben sekonder doku kaybının bir göstergesi de, hücre içi enerji substratlarının kaybedilmesidir^{41,42,43}. Bu enerji kaybı, vasküler hasar ve ardından da reperfüzyona bağlı endotel hasarından kaynaklanmaktadır^{40,44}. Aynı zamanda mitokondrial disfonksiyon, iskemik ve mekanik yaralanmalarda hücre hasarına neden olmaktadır⁹. Primer yaralanmanın başlangıcından itibaren venül, kapiller ve arteriollerin vasküler hasarı kord dokusuna kan akışını sınırlar⁴⁵. Kısa süre sonra vazospazm⁴⁶,

trombozis⁴⁷ ve kardiyak verimin azalmasına neden olan nörojenik şok gibi sekonder hasar mekanizmaları oluşur⁴⁸. Bu süreç hücresele seviyede, hem oksidatif fosforilasyon hem de glikolitik yolun kaybı olarak kendini gösterir. Sonuçta hücresele enerji metabolizması zayıflar ve ATP yokluğuna yol açar. ATP yokluğu da; hücre zar geçirgenliğinin kaybedilmesi, lizozomal içeriklerin salınması ve kalsiyuma bağlı yıkıcı enzimlerin aktivasyonu gibi nekrotik mekanizmaları tetiklemektedir. Bu enzimlerin arasında sitoskelet bileşenlerini, çekirdeği ve plazma membranını parçalayan proteaz, fosfolipaz, ATPaz ve endonükleazlar bulunmaktadır^{33,49}.

Süperoksit (O_2^-) ve hidroksil (OH^-) gibi serbest radikaller mitokondriyal elektron taşıma zinciri ve mikrozomal sitokrom P-450 sisteminin bir parçası olarak, normal hücresele metabolizma sırasında küçük miktarlarda üretilmektedir. Serbest radikaller yetersiz oksijenasyonun etkisiyle, travmatik yaralanmalar sonucu da oluşmaktadır. Serbest radikaller, proteinler, lipidler, nükleik asitler ve glikozaminoglikanlar gibi hücre dışı matriks proteinleri ile reaksiyona girerek, bu moleküllere zararlı yönde etki ederler. NO, vasküler endotel hücreler ve nöronlar tarafından MSS'nde fizyolojik olarak da az miktarda üretilen, yayılabilir reaktif bir gazdır. Nitrik oksit, hücrede lipidleri, DNA'yı ve proteinleri doğrudan okside edebilen güçlü oksidan olan peroksinitriti ($ONOO^-$) oluşturmak üzere O_2^- ile reaksiyona girer⁵⁰. Sıçanlarda yapılan deneysel bir çalışmada, peroksinitrit'in, spinal kord yaralanmaları sonrasında aşırı artış gösterdiği ve nöronal kayıplara ve lokomotor fonksiyonel bozukluklara neden olduğu gösterilmiştir⁵¹. Diğer taraftan aşırı NO üretiminin de nörotoksititeye sebep olabileceği öne sürülmüştür⁵².

SKH ekstraselüler eksitator aminoasit (EAA) konsantrasyonunda artışa yol açan biyokimyasal basamakları başlatmakta ve glutamat reseptör aracılı eksitotoksik olaylara neden olmaktadır⁵³. Glutamat, sinir sisteminde görev yapan önemli bir nörotransmitterdir. Salındıktan sonra, spesifik taşıyıcı proteinler, sinaptik aralıktan ekstraselüler glutamati hızla uzaklaştırmaktadır. Fazla glutamatın temizlenmesi normal şartlar altında bu maddenin birikimi önlemektedir. Ancak, SKH hücre dışı glutamat konsantrasyonunu nörotoksik seviyelere yükseltir. Ekstraselüler glutamatın aşırı yükselmesi, glutamat hücre membran reseptörleri olan; iyonotropik N-metil-d-aspartat (NMDA), AMPA/kainat reseptörleri ve metabotropik glutamat reseptörlerinin aşırı stimülasyonuna neden olur. Gerçekten de, NMDA glutamat reseptörünün SKH'nda glutamat eksitotoksitesinin belirli yönlerine aracılık etmede anahtar konumda rol

oynadığı konusunda genel bir görüş birliği bulunmaktadır⁹. Bu eksitotoksisite, Ca^{+2} bağımlı mekanizmalar aracılığıyla nöronların ölümüne neden olmaktadır¹. NMDA reseptörlerinin glutamat aktivasyonu ile Ca^{+2} iyonlarının nöronlara akışı, çeşitli sekonder süreçlerin aktivasyonuna da yol açar. Aşırı Ca^{+2} 'a bağlı nörotoksisite, serbest radikaller ve NO oluşumu, proteazların ve endonükleazların aktivasyonu, mitokondriyal hasar ve apoptozun indüksiyonu gibi birçok spesifik süreçlerden de sorumludur⁹.

2.3. Metilprednizolon Tedavisi

SKH'nda sekonder yaralanma kritik öneme sahiptir. Bu süreçte; apoptoz, oksidatif stres ve enflamatuvar immün reaksiyonlar yer almaktadır. Sekonder hasar yolları, fonksiyonel iyileşmenin etkinliğini arttırmak için SKH tedavisinde potansiyel terapötik hedefler sunmaktadır⁵⁴. Enflamatuvar hastalıkları tedavi etmek için kullanılan sentetik bir glukokortikoid olan metilprednizolon (MP), SKH için nöroprotektif bir tedavi ajanı olarak klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır^{54,55}. 1990'da Bracken ve arkadaşları⁵⁶, SKH tedavisinde metilprednizolon etkinliğini ilk kez bildirmişlerdir. Bu çalışmadan sonra akut SKH'nda intravenöz yüksek doz MP kullanımı bu hastalarda standart bir tedavi haline gelmiştir. Geçtiğimiz 10 yılda literatürde SKH'nda steroidlerin kullanılıp kullanılmaması gerektiğine ilişkin ciddi tartışmalar yapılmıştır. Amerikan Beyin Cerrahi Birliği, MP'nin standart olarak değil, bir seçenek olarak kullanılmasını önermektedir⁵⁷. Metilprednizolon, antienflamatuvar sitokin salınımını uyaran ve nöral hücrelerin hayatta kalmasını sağlamak üzere oksidatif stresi azaltan güçlü bir glukokortikoiddir⁵⁸. Metilprednizolon aynı zamanda, primer ve sekonder adrenokortikal yetmezlik, romatizmal bozukluklar, şiddetli alerjik reaksiyonların kontrolü ile dermatolojik hastalıkların da tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır⁵⁹. Etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, kortikosteroidlerin, hücrede membran yapılarını stabilize ettiği, kan-spinal kord bariyerini koruduğu, endorfin salınımını önlediği ve SKH sonrası vazojenik ödem ve enflamatuvar cevabı azaltma gibi potansiyeline sahip olduğu rapor edilmiştir⁵⁷. Amerikan ulusal akut spinal kord hasarları çalışma grubu (NASCIS), SKH sonrası ilk 8 saat içinde yüksek doz intravenöz MP tedavisini tavsiye etmektedir⁶⁰. Son 30 yılda tamamlanan bir dizi klinik çalışma ve meta-analizlerde, yaralanmadan 8 saat sonra SKH'lı hastalara MP verildiğinde motor fonksiyonlarda iyileşme olduğunu bildirmişlerdir⁵⁵. Birçok çalışmada, MP'nin iltihabi

reaksiyonları azalttığı, oksidatif stres ve nöronal apoptozu inhibe ettiği ve SKH sonrasında da fonksiyonel iyileşme üzerine nöroprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir⁶¹. Bunların dışında, hasarlı spinal kordda MP tedavisinin lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve oligodendrositleri apoptozdan koruduğu kaydedilmiştir⁵⁵. Lu ve arkadaşları, sıçanlarda yaptıkları deneysel SKH sonrası MP tedavisinin, spinal kord ön boynuzunda hayatta kalan nöron sayısını artırdığını, lezyon boyutunu azalttığını, nöronal apoptozu baskıladığını ve lokomotor fonksiyonel iyileşmeyi de artırdığını bildirmişlerdir⁵⁴. MP'un apoptoz üzerindeki inhibe edici etkisini ve SKH sonrası nörolojik fonksiyonun restorasyonunu Wnt/ β -katenin sinyal yolağı üzerinden gerçekleştirildiği düşünülmektedir. Akut SKH tedavisinde metilprednizolon uygulama sırasında ortaya çıkan yan etkilere ve sınırlı etkinliğe sahip olmasına rağmen, günümüzde hala önemli bir tedavi edici ajan olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle SKH için daha güvenli ve etkin bir tedavi sağlanıncaya kadar, MP tedavisi uygulamasının süreceği öngörülmektedir⁶⁰.

2.4. Enflamatuvar Cevaplar ve Sitokinlerin Rolü

SKH, kan-spinal kord bariyerinin bozulması, bunun ardından periferik immün hücrelerin ardışık infiltrasyonu, mikrogliyaların aktivasyonu ve enflamatuvar sinyal yollarının indüksiyonu ile başlatılan enflamatuvar süreçleri aktive etmektedir¹⁰. Enflamasyon cevapları, SKH'nın akut ve kronik fazlarının patogeneğinde hayati öneme sahiptir. Bu fazlar boyunca, MSS hem doğuştan hem de sonradan kazanılan immünite ile iyileşebilmektedir¹.

Nötrofiller, non-nöronal ve nöronal dokuda yaralanma yerine ulaşan ilk enflamatuvar hücrelerdir. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi ile ölçülen nötrofillerin travma sonrası birikimi, ilk üç saat içinde belirgin olarak artar ve SKH sonrası üçüncü güne kadar yüksek seviyede kalır⁹. Spinal kordda nötrofil dolaşımının yüksek olması, hücreler arası adezyon molekülleri (ICAM-1) ve trombosit-endotel hücre adezyon molekülünün (PECAM) upregülasyonundan kaynaklanabilir. Bu iki molekül endotel hücrelerinde eksprese edilir. Nötrofiller, nötrofil proteazların ve reaktif O₂ türlerinin salınması ile sekonder hasarın modülasyonunda rol alır⁶². Nötrofiller ayrıca makrofajları bölgeye çeken sinyal proteinlerini de salgılamaktadırlar¹⁰.

Spinal kordda mikrogliyaların aktivasyonu ile kan monositlerinden kaynaklanan makrofajlar, yaralanmadan sonraki ilk günlerde yaralanma bölgesine sızar ve ilk hafta boyunca pik yaparlar ve aylarca da yüksek seviyede kalırlar⁶³. Makrofajlar hücrel artıkları ve ölü hücreleri yok ederler, ayrıca antijen sunarlar ve proenflamatuvar sitokinleri, ROS, NO ve proteazları salgırlar¹⁰. Mikrogliya, spesifik hücre yüzey moleküllerinin ekspresyonu ve IL-1, TNF- α gibi sitokinler ile lökotrienler ve prostaglandinleri salgılayarak, mikro çevredeki bozukluklara hızla tepki verirler. SKH sonrası 1. günde post-travmatik mikrogliya aktivitesi belirgindir, bununla birlikte aktif mikrogliya sayısı ilk yedi günde artar ve 2-4. haftalarda stabilleşir⁶². Mikrogliya hücrelerinin lezyon merkezindeki başlıca rolleri hücrel artıkların hızla fagositozudur⁹.

SKH, antienflamatuvar bir sitokin olan transforming büyüme faktörü- β (TGF- β)'nin ekspresyonunu uyarmaktadır. Proenflamatuvar sitokinlerin aksine, TGF'nin ekspresyonu oldukça gecikmektedir. Lezyon yerinde 24 saat içinde bulunmasına rağmen, mRNA seviyeleri 7 gün sonraya kadar pik yapmaz. TGF- β , proenflamatuvar sitokinler üzerine etkilerini, iNOS'ı downregüle ederek ve endotel CAM'lerini azaltarak göstermektedir¹.

T-lenfositler sağlıklı spinal kordda az sayıda bulunurlar, buna karşın, yaralanmadan sonra birinci haftada mikrogliya ve makrofajların göçüne paralel olarak kademeli bir şekilde bu hücrelerin sayıları artar. T-lenfositler, aktive olduklarında hedef hücreleri öldürebildikleri ve sitokin üretebildikleri için, MSS bağışıklık sisteminde önemli rollere sahiptirler. Schwartz ve arkadaşları, hem doğal hem de edinilmiş immün cevapların, MSS'nde akson yaralanmasından sonra iyileşme sürecinde gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Yaralanmadan sonra MSS'ne otoimmün T hücrelerinin enjeksiyonunun sıçanlarda hasarın yayılmasını azalttığı ve SKH'nı takiben iyileşmeyi sağladığı rapor edilmiştir⁹.

SKH'ndan sonra, reaktif astrositler olarak bilinen astrosit popülasyonu, yaralı spinal korddaki inhibitör ortama katkıda bulunur. Hasardan sonra, reaktif astrositler hasar gören bölgenin etrafında proliferer olurlar ve hipertrofiye uğrarlar. Reaktif astrositler aksonal rejenerasyonda fiziksel ve kimyasal bir bariyer görevi gören astroglial skar oluştururlar. Gliyal skar oluşumunun işlevsel rolü tam olarak anlaşılamasa da, MSS tarafından hasar gören bölgenin izolasyonu yoluyla, homeostazı korumaya yönelik bir cevap olduğu ileri sürülmektedir. Aktive olan astrositler, hücre

adezyon molekülleri ve hücre dışı matris proteinleri de dahil olmak üzere çeşitli hücre yüzey moleküllerinin ekspresyonunu da upregüle etmektedir⁹.

2.5. Spinal Kord Hasarından Sonra Gen Ekspresyon Değişimi

Hücre fonksiyonlarının düzenlenmesi, hücrel cevaplar ve hücrelerdeki fenotipik değişiklikler, çok sayıda transkripsiyonel yolağın aktivasyonuna veya baskılanmasına bağlıdır⁶⁴. SKH sonrası meydana gelen dejeneratif ve rejeneratif süreçler gen ekspresyon değişimiyle ilişkilidir⁵. SKH modellerinde mikroarray analizleri sonucu farklı çalışmalarda ve hatta farklı türler veya suşlar arasında bile görülebilen gen ekspresyonu değişiklikleri tespit edilmiştir⁶⁴. Yaralanmayı takiben spinal kordda meydana gelen belirgin değişiklikler, aşağıda belirtilen genlerde kümelenmiş ifade değişikliklerini içermektedir:

Transkripsiyon ve Stres Yanıtı: NF- κ B, c-fos, HSP-70 (70 kD ısı şok proteini) gibi faktörler SKH'ndan sonra erken dönemde upregüle olur ve en az 24 saat boyunca yüksek seviye kalırlar. NF- κ B ve/veya interferon düzenleyici faktör (IRF)-1 gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, proenflamatuvar genlerin artmış ekspresyonuna aracılık eder ve apoptoz veya rejenerasyon gibi temel süreçleri modüle eder⁶⁵. Diğer taraftan, protein hasarına veya oksidatif strese karşı hücreleri koruyabilen metalloprotein 1 ve 2 ile birlikte şaperon ekspresyonunda erken bir artış vardır. Ayrıca SKH sonrası geç dönemde, antioksidan stres genleri, süperoksit dismutazlar (SOD 1 ve SOD 2), katalaz ve glutatyon peroksidaz (GPX) da upregüle olur⁶⁶.

Enflamatuvar cevap: Hasarı takiben erken dönemde COX-2 ile IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi proenflamatuvar genlerin upregülasyonu gözlenir ve 14 gün içinde normal seviyelere geri döner^{64,65}. Hücre infiltrasyonuna katılan adhezyon molekülleri (integrinler, interselüler ve vasküler CAMs, kadherin ve selektinler), immün hücre yanıtında rol alan kemokinler (monosit kemotaktik protein (MCP-1) ve makrofaj enflamatuvar protein (MIP-1 β)) yaralanmadan sonraki ilk saat boyunca upregüle olur⁶⁶. Enflamatuvar genlerin ekspresyonundaki değişiklikler en çok mikroglialarda çalışılmakla birlikte, farklı spinal kord hücrelerinde de gözlenmektedir. Byrnes ve arkadaşları⁶⁷, aktive edilmiş mikrogliaların ilk olarak IL-1 β , IL-6, CCL2/MCP-1 ve CXCL2/MIP2 α gibi proenflamatuvar molekülleri eksprese ettiklerini ve bu moleküllerin bağışıklık hücrelerinin hasar gören bölgeye geçişinde rol aldıklarını rapor

etmişlerdir. Mikroglial gen ekspresyonunda ikinci bir değişim de daha geç dönemde ortaya çıkar ve fagositoz, ROS üretimi, proliferasyon ve hücre ölümünün düzenlenmesine katılan sitokrom b-245 hafif zincir proteini (CYBa), katepsin Y, Galektin-3, mikroglial yanıt faktörü (MRF-1), P38, siklin D1, kaspaz 1 ve lökosit yüzey antijeni CD53 / OX44 kodlayan genleri içerir¹⁰.

Nöron-İlişkili Genler: SKH sonrası, ilk hafta boyunca, potasyum, kalsiyum ve sodyum pompalarındaki proteinleri kodlayan gen ekspresyonlarında azalmanın yanı sıra, sinaps, hücre uyarılabilirliği ve nörotransmisyonunda da önemli bir düşüş meydana gelmektedir^{63,68,69}. Bu azalma, nöronların gen profillerindeki değişiklikleri yansıtabileceği gibi, yaralanmadan sonra gerçekleşen nöronal hücre ölümünün ilerlemesini de yansıtabilir^{68,69}. Hasardan sonraki haftalarda da aksonal rejenerasyon, plastisite ve rejenerasyona bağlı proteinlerin aşırı ekspresyonunu içeren geniş bir gen grubunda (Ninjurin, Coronin 1b, Rab13, Büyüme İlişkili Protein-43, Neuritin, Ankyrin, Miyelin Oligodendrosit Glikoprotein ve cAMP-ilişkili gen) ekspresyon değişikliklerinin olduğu rapor edilmiştir^{64,65,68}.

2.6. MikroRNA

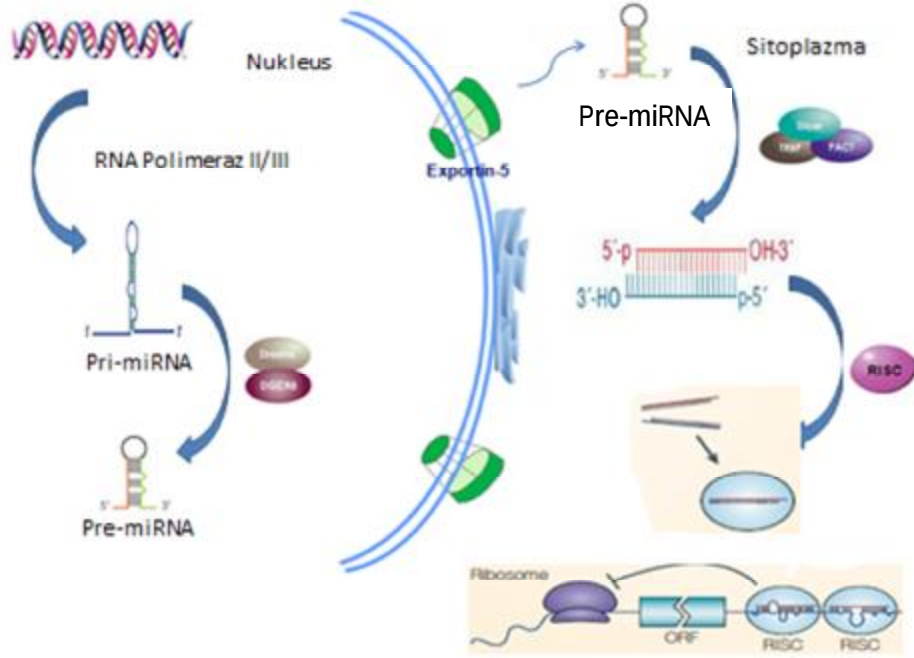
MikroRNA'lar post transkripsiyonel gen ekspresyonunun düzenleyicisi olarak fonksiyon gören, 18-25 nükleotid uzunluğunda, protein kodlamayan küçük RNA'lardır^{70,71}. İlk kez 1993 yılında Ambros ve arkadaşları protein kodlayan genlerin negatif regülatörü olarak miRNA'ları keşfetmişlerdir⁷². 1993 yılında Lee ve arkadaşları, yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans* (C.elegans)'da yaptıkları araştırmalarda, endojen küçük bir RNA'nın (lin-4) post-embriyonik gelişim için gerekli bir protein olan lin-14 translasyonunu, lin-14'ün 3'-UTR'ye bağlanarak, RNA-RNA etkileşimi yoluyla düzenlenebileceğini göstermişlerdir⁷³. 2000 yılında Reinhart ve arkadaşları tarafından C.elegans'ta let-7 adı verilen bir başka miRNA daha bulunmuştur. Let-7'nin larva döneminden erişkin döneme geçişi kontrol ettiği ortaya çıkarılmıştır⁷⁴. Yabanıl tip lin-4 ve let-7'nin klonlanması ve analizi sonucunda, bunların protein ürünleri olmasından daha çok, 21 ve 22 nükleotid uzunluğundaki RNA'ları kodladığı ortaya konulmuştur⁷. Daha sonraki çalışmalar, endojen küçük RNA'ların mRNA translasyonunu düzenleyebileceği hipotezini desteklemiştir ve "mikroRNA" terimi *Science* dergisinde bir dizi makalede tanıtılmıştır⁷¹.

2.6.1. MikroRNA Biyogenezi

MikroRNA'lar, genomik DNA'dan, RNA polimeraz II veya III tarafından 1000'den fazla nükleotid uzunluğunda primer transkriptler (pri-miRNA) şeklinde kopyalanır. Pri-miRNA'lar bir veya daha fazla miRNA dizisini içerebilir. Pri-miRNA'lar kendi üzerinde kıvrılarak saç tokası yapısını alır ve fonksiyonel sekonder yapıları oluşturur. Pri-miRNA'nın saç tokası yapısı RNAaz III *Drosha* enzimi ve RNA-bağlayıcı protein *DGCR8* tarafından oluşturulan kompleks tarafından tanınır ve parçalanır, böylece 70-100 nükleotid uzunluğunda öncül (prekürsör) mikroRNA (pre-miRNA) oluşur. Daha sonra çekirdek-por kompleksinin iç kanalı vasıtasıyla nukleopporinlerin FG-domainleri ile etkileşen spesifik bir çekirdek taşıyıcı olan *Eksportin 5* tarafından tanınır ve bağlanır. Böylece pre-miRNA sitoplazmaya taşınır. Sitoplazmaya girer girmez pre-miRNA'nın çift zincirli olgun bir miRNA'ya dönüşümünü sağlayan *Dicer* enzimi ve RNAaz sitoplazmik çift zincir bağlama proteini olan ve insanda *TRBP* (Tar Binding Protein) olarak adlandırılan sitoplazmik çift zincirli bir RNA bağlama proteini, pre-miRNA'ya bağlanır ve pre-miRNA'yı keser. Bu ileri işlem çift zincirli, yaklaşık 21-23 nükleotid uzunluğunda olgun miRNA oluşumuyla sonuçlanır. Çift zincirli miRNA'nın, 21-23 nükleotid uzunluğunda zincirleri ve her iki uçta iki adet eşleşmemiş 3' nükleotid bulunur ve uzunluğu boyunca bir A formu RNA sarmalının yaklaşık iki dönüşüne denk gelir. Olgun çift iplikli miRNA'nın bir iplikçiği parçalanır ve diğer iplikçik, hedef RNA'ya mikroRNA'ların bağlanmasını kolaylaştıran RNA ile indüklenen bir sessizleştirme kompleksine (RISC= RNA-induced silencing complex) entegre edilir. Bu kompleks (RISC), çok domainli, tanınabilir korunmuş diziye sahip bir protein ailesinin üyesi olan *Argonaute* proteini tarafından bağlanmış tek zincirli olgun bir miRNA'yı içerir^{7,10}(Şekil 1).

Olgun mRNA'larda translasyonun başlatılması, ökaryotik başlatma faktörü 4E ile 7-metilguanozin dizisi arasında doğrudan etkileşimi gerektirmektedir⁷¹. MikroRNA'lar, mRNA 3'-UTR'ye bağlandığında, RISC'deki Argonaute proteinleri, ökaryotik başlatma faktörü 4E'yi bağlayan ve translasyonun başlamasını engelleyen mRNA'nın 7-metilguanozin başlığı ile etkileşime girer⁷¹. RISC komplekslerinin bağlanması, sitoplazmik RNA işleme cisimcikleri ya da kısaca P cisimcikleri olarak adlandırılan, ribozomların bir kaç katı büyüklüğündeki yoğun sitoplazmik domainlerle ilişkili, bağlı mRNP'lere neden olur. P cisimcikleri, potansiyel olarak translasyonun baskılanmasını

açıklayan ve ribozomlar ile translasyon faktörleri içermeyen RNA'ların parçalanma yerleridir⁷.



Şekil 1. MikroRNA yolu^{7,10}

RISC'lerdeki mikroRNA'ların en önemli rolü, transkripsiyon sonrası translasyonu baskılamak veya mRNA parçalanması ile hedef genlerin ekspresyonunu düzenlemektir. Kullanılan mekanizma, mikroRNA'lar ve hedef mRNA'lar arasındaki tamamlayıcılık derecesine bağlıdır. MikroRNA'lar, hedeflenen mRNA'lar ile tam bir şekilde eşleştiğinde, mRNA'nın parçalanması gerçekleşir. Aksine, mikroRNA'lar, hedef mRNA'lar ile tam olmayan bir baz eşleşmesi yaparsa, translasyonel baskılanma, gen düzenlemesine aracılık eden mekanizmalar haline gelir. Son yıllarda yapılan bir araştırmada, hedef mRNA'ların parçalanmasının, memelilerde miRNA'ların gen baskılamasının ana mekanizması olduğu gösterilmesine rağmen⁷⁵, hayvanlarda gen ekspresyonun, çoğunlukla translasyonel baskılanmayla (mRNA susturulmasıyla) olduğu bilinmektedir⁷⁶. PicTar, miRanda ve TargetScan gibi biyoinformatik algoritmalarla, miRNA'ların mRNA hedefleri tahmin edilebilmektedir²⁰. MiRNA'lar, farklı orijine sahip yüzlerce aileye bölünebilir. Aynı miRNA ailelerinin farklı üyelerinin aynı anda bir kaç gen grubunu hedefleyebileceği ve belirli fizyolojik süreçleri düzenlemek için birlikte hareket edebilecekleri bilinmektedir. Örneğin, let-7 ailesi üyelerinin, spinal kord

yaralanmasından sonra sıçan spinal kordunda oldukça yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir⁷⁰. MikroRNA'lar, hayvanlarda hedef tanıma için tam bir baz eşleşmesi gerektirmediğinden, tek bir mikroRNA, çoklu, hatta yüzlerce mRNA'yı düzenleyebilmektedir. Aynı zamanda, her bir mRNA birçok mikroRNA tarafından düzenlenebilir ve belirli bir mikroRNA aynı mRNA'da birden fazla bağlanma bölgesine bağlanabilir, böylece miRNA'lar genel etkilerini arttırabilmektedir⁷¹. mRNA üzerindeki miRNA bağlanma alanları türler arasında genellikle korunur ve diğer bağlanma yerleri korunmuş olsa da, miRNA'lar genellikle mRNA'nın 3'-UTR'ne bağlanırlar⁷⁷. Sayed ve arkadaşları⁷⁸ ve Friedman ve arkadaşlarına⁷⁹ göre halen insanda bilinen 2000'den fazla mikroRNA olduğu ve bu yapıların tüm protein kodlayan genlerin en az % 20-60'ının⁷⁶ ekspresyonlarının düzenlenmesinde rol oynadıkları düşünülmektedir. MikroRNA'lar, düzenleyici yolların ortak bileşenleri olup, fizyolojik ve patolojik koşullar altında, hücre ölümü ve hücre kimliğinin belirlenmesinde, moleküler açma-kapama anahtarlarını oluşturmaktadırlar.

2.7. Spinal Kord Hasarında MikroRNA'lar

Serebral iskemi, travmatik beyin hasarı ve spinal kord hasarı gibi merkezi sinir sistemi yaralanmaları, yetişkin populasyonlarda ölüm ve sakatlığın başlıca nedenlerindendir⁸. MikroRNA'lar, spinal kord da içeren memeli MSS'nde yüksek oranda eksprese edilir¹⁰. Diğer MSS patolojileri ile karşılaştırıldığında, MSS yaralanmasında görülen miRNA ekspresyon değişiklikleri hakkında çok az şey bilinmektedir⁸. MiRNA'lar, SKH'ndan sonra gen ekspresyonunu düzenlediklerinden, nöronal hücre ölümünün ve hayatta kalmanın yollarını düzenlemek için potansiyel terapötik ajanlar olmanın yanı sıra, yeni moleküler yaklaşımlar da sağlayabilirler⁶. MikroRNA'lar, nörogenesis, nöronal gelişim ve sinaptik plastisitede değişikliklere yol açan hücresel yanıtları içeren MSS fonksiyonlarının neredeyse her alanında önemli rollere sahiptirler⁷¹. MikroRNA'ların, MSS'nin normal gelişim ve fonksiyonlarındaki rollerine ilaveten, mikroRNA düzensizliğinin, pek çok nörolojik hastalıkta etken olarak yer aldığı gösterilmiştir¹⁰. MikroRNA düzensizliğinin araştırıldığı çalışmalarda, *Drosophila melanogaster*'da Argonate 1 proteinini kodlayan gendeki mutasyonların, nöron ve gliyal hücrelerde şiddetli kayba neden olduğu, dicer protein eksikliği olan farelerde gelişmekte olan merkezi sinir sisteminde anormal nörogenesis ve gliogenesis

oluştugu görülmüştür⁸⁰. Ayrıca, MSS yaralanmasından sonra miRNA'ların ifadesi geçici olarak değişir; farklı SKH evrelerinde miRNA ekspresyonunda zamansal farklılıklar da görülebilmektedir. Deneysel SKH kontüzyon modelinde, spinal kordda ifade edilen miRNA'ların % 35'inden fazlasının ekspresyonlarının, hasardan sonraki ilk 7 gün içinde önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir⁸¹. SKH'ndan sonra miRNA ekspresyonlarında meydana gelen değişiklikler ve bunlara karşılık gelen klinik bulgular, gelecekteki klinik araştırmalar için iyi bir referans olabilir⁷⁰.

Hasardan sonra miRNA'lar ifade şekillerine göre, upregüle olan miRNA'lar, downregüle olan miRNA'lar ve SKH sonrası ifadelerinde çift yönlü değişiklikler olan miRNA'lar olmak üzere üç kategoriye ayrılır⁷⁰. Hedef tahmin algoritması olan miRanda'ya göre, SKH sonrası upregüle olan miRNA'lar (örneğin miR-1 ve miR-206) antienflamatuvar ve antioksidan mRNA'ları hedef almaktadır. Buna karşın, downregüle olan miRNA'ların (örneğin; miR-34a ve miR-181a), TNF ve IL-1 β gibi proenflamatuvar mRNA'ları hedef alacakları öngörülmüştür. Ayrıca, antiapoptotik ve proapoptotik mRNA'lar da, sırasıyla artan ve azalan ekspresyon gösteren miRNA'ların hedefi olarak tanımlanmıştır²⁰.

Yapılan araştırmaların çoğunda SKH'nda, mikroRNA'ların potansiyel hedefleri arasında, enflamasyon, apoptoz ve oksidasyon gibi patofizyolojik süreçlerde yer alan genlerin bulunduğu gösterilmiştir⁷⁰. SKH'nın akut evresindeki travmatik ortamda IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar sitokinlerin seviyeleri oldukça yüksektir. Bununla birlikte, hasar bölgesinde antienflamatuvar sitokinler de sentezlenmektedir⁸². Yapılan araştırmalarda, interelüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1), interlökin-1 β (IL-1 β) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi enflamatuvar mediyatörlerin mRNA'larının, SKH sonrası downregüle olan; miR-181a, miR-411, miR-99a, miR-34a, miR-30c, miR-384-5p ve miR-30b-5p¹⁴, miR-486⁸³ ile upregüle olan; miR-17, miR-20⁵, miR124a⁸⁴,nın potansiyel hedefleri olduğu ortaya çıkarılmıştır. Diğer taraftan, TRAF6, annexin A1 ve A2 gibi antienflamatuvar mediyatörlerin mRNA'ları, SKH sonrası upregüle olan miR-146a^{2,5}, miR-223^{5,84}, miR-221¹⁴ ve SKH sonrası 3. günde downregüle olan miR-1^{5,84},in potansiyel hedefleri oldukları rapor edilmiştir. SKH sonrası upregüle olan bazı miRNA'lar (örneğin; miR-1, miR-206, miR-152 ve miR-214), süperoksit dismutaz 1 (SOD-1) ve katalaz genleri de dahil olmak üzere anti-oksidan genleri hedefleyebilir¹⁴.

Apoptoz son yıllarda, SKH da dahil birçok nörolojik hastalıkta önemli bir hücre ölüm mekanizması olarak tanımlanmıştır⁷⁰. Apoptoz, nöronal atrofi, post-yaralanma demiyelinizasyonu ve mikrogliyal infiltrasyonu ile sonuçlanan, MSS hasarını takiben; nöronlar, oligodendrositler ve mikrogliyal hücrelerde meydana gelen aktif bir hücre ölüm şeklidir. Birkaç miRNA, proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla apoptozda rol oynamaktadır. SKH'ndan sonra, proapoptotik genleri hedefleyen çoklu miRNA'lar downregüle olur; ancak antiapoptotik genleri hedefleyen miRNA'lar upregüle olmaktadır⁶. Kaspaz-3, kalpain 1, kalpain 2, Bcl2, c-Myc ve apoptozu indükleyici faktör (AIF) gibi, apoptoz ilişkili genler, SKH sonrası downregüle olan miR-138⁵, miR-124^{2,14}, miR-235-3p, miR-137 ve SKH sonrası upregüle olan miR-1^{2,5}, miR-15b, miR-34 ve miR-145'in potansiyel hedefleridirler. Ancak, Bcl2-1 ve Bcl2-2 genleri gibi antiapoptoz ilişkili genler, SKH sonrası upregüle olan miR-21, miR-146a^{2,5}, miR-20a^{14,85}, miR-145, miR-214, miR-674-5p, miR-15b, miR-17, miR206 ve miR-672¹⁴'in hedefleridir. Hem miR-133b hem de miR-15b, kaspaz 3, 8 ve 9'un ekspresyonunu artırmakta, buna karşın antiapoptotik faktör Bcl-2'nin ekspresyonunu azaltarak, proapoptotik araçlar olarak fonksiyon yapmaktadırlar^{13,86}.

SKH'ndan sonra miRNA'ların ekspresyon değişikliklerinin yanı sıra, SKH'nı takiben miRNA'lar prognoza göre, koruyucu, zararlı ve değişken etkili miRNA'lar olmak üzere üç ana gruba ayrılabilir.

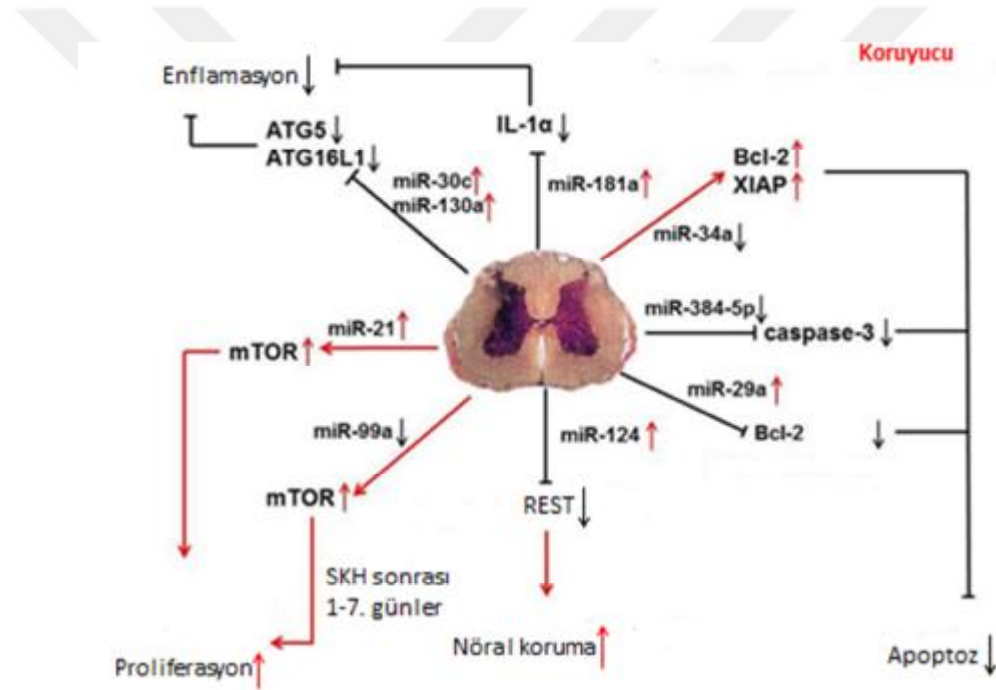
A) SKH'nda Koruyucu miRNA'lar:

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, miR-34a'nın doğrudan antiapoptotik protein Bcl-2 ve XIAP'nin ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. MiR-34a'nın aşırı ekspresyonunu takip eden kaspaz-11'deki artış, miR-34a'nın antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltarak apoptoz ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir⁸⁷. Bununla birlikte, SKH'nda, antiapoptotik protein ekspresyonunun yüksek düzeyde kalması nedeniyle miR-34a'nın ekspresyonu önemli ölçüde downregüle olmaktadır.

MiR-384-5p ekspresyonu SKH sonrası sürekli downregüle edilir. Aktif kaspaz-3 ifadesi, miR-384-5p tarafından upregüle edilir ve miR-384-5p inhibitörü tarafından downregüle olur; bu da, miR-384-5p'nin, apoptotik yol gibi sinyal yollarını düzenlemede rol oynadığını düşündürmektedir⁸⁸. Tanımlanan yollar ne olursa olsun, miR-384-5p downregülasyonunun SKH üzerinde koruyucu olduğu görülmektedir.

Nöronlarda yüksek oranda ifade edilen miR-29a, özellikle postnatal evrelerde beyin gelişimi sırasında korteks ve hipokampusta upregüle edilir. Glutamat reseptörlerinin aktivasyonu, primer nöronlarda miR-29a'nın artışına katkıda bulunur, bu da sinirsel aktiviteye neden olur. Ayrıca, akson dallanmasını etkilediği bildirilen protein DCX'ın, miR-29a'nın hedefi olduğu ortaya çıkarılmıştır⁸⁰.

Diğer bir araştırmada miR-181a'nın enflamatuvar yolların modülasyonu ile ilişkili olduğunu ve SKH sonrası upregüle edilen miR-181a'nın, IL-1 α 'yı downregüle ederek antienflamatuvar etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. İlâveten IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi enflamatuvar faktörlerin baskılanmış ifadelerinin, miR-181a'nın artan ekspresyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür⁸⁹ (Şekil 2).

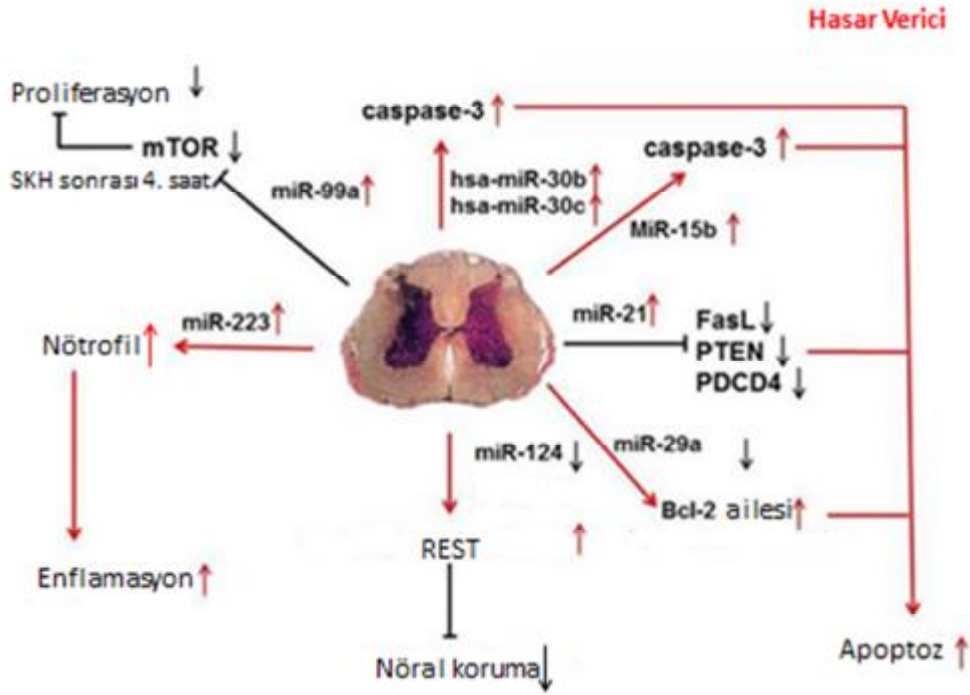


Şekil 2. SKH'nda antienflamatuvar ve antiapoptotik etkili miRNA'lar⁷⁰

B) SKH'nda zararlı olan miRNA'lar

Izumi ve arkadaşları, SKH'ndan 12 saat sonra miR-223'ün yüksek seviyede eksprese edildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, sekonder hasar meydana geldiğinde, miR-223'ün SKH'nın erken evresinde nötrofil lökosit fonksiyonlarını düzenleyebileceğini ve SKH sonrasında nötrofil aracılı enflamasyonu arttırdığını göstermişlerdir⁹⁰. SKH'ndan sonra ekspresyonları artan hsa-miR-30b ve hsa-miR-30c, kaspaz-3 ekspresyonunu indükleyerek apoptozu arttırmaktadır⁷⁰. MiR-15b, apoptozun

mitokondriyal yolağı üzerinden, kaspaz-3 ekspresyonunu indükleyerek apoptozu arttırmaktadır. MiR-15b'nin inhibisyonu, Bcl-2 mRNA ekspresyonunu etkilemeksizin Bcl-2'nin protein ekspresyonunu arttırmakta ve mitokondriyal sitokromun sitoplazmada serbest bırakılmasını inhibe ederek, kaspaz-3 aktivitesini azaltmaktadır⁹¹ (Şekil 3).



Şekil 3. SKH'nda proenflamatuvar ve proapoptotik etkili miRNA'lar⁷⁰

C) SKH'nda Değişken Etkili miRNA'lar

MiRNA'ların çeşitli yolları etkiledikleri ve farklı bölgelerde eksprese edildikleri ve SKH sonrası da farklı zamanlarda eksprese oldukları bilinmektedir. Bu miRNA'lar farklı koşullar altında farklı etkiler de gösterebilmektedir.

1. Farklı yollarda fonksiyon: MiR-21 hem proliferasyon hem de apoptoz yollarında yer alır. SKH'nda, artan miR-21 ekspresyonu ve azalan miR-199a-3p ekspresyonu, hedef genlerinin ekspresyonunda önemli değişiklikler ile korelasyon göstermektedir. Örneğin; hasardan sonra miR21 ekspresyonunun artışı, mTOR mRNA ekspresyonu artışı ile birlikte seyretmekte, bu durum, SKH'nda dejenere olan nöronların rejeneratif potansiyelinin artmasına neden olmaktadır⁹². Ayrıca, Fas ligand (FasL), fosfataz ve tensin homologu (PTEN) ve

programlanmış hücre ölüm proteini 4 (PDCD4) gibi proapoptotik genlerin, farklı hücre tiplerinde miR-21'in direkt hedefi olduğu da gösterilmiştir⁹³.

2. Farklı bölgelerde fonksiyon: Çalışmalar, bazı mikroRNA'ların, farklı nöroanatomik bölgelerdeki hücresel fenotiplerin altında yatan protein ekspresyon profillerini oluşturmak ve sürdürmek için hizmet ettiğini desteklemektedir. Örneğin, sıçan hipokampusunda miR-92b, miR-146b, let-7g, miR-551b, miR-330 ve miR-384 ifadesi, kortekse göre belirgin olarak daha yüksektir⁹⁴. Yetişkin beyinde en fazla ifade edilen mikroRNA'lar olan miR-124 ve miR-128 nöronlarda eksprese olurken, miR-26 ve miR-29'un nöronlardan daha güçlü bir şekilde astrositlerde ifade edildiği rapor edilmiştir⁹⁵. Sıçan serebral korteksinde yapılan mikroarray analizleri, birçok miRNA seviyesinin travmatik beyin hasarından sonra değiştiğini ve miR-21'in upregüle olduğunu göstermiştir⁹⁶. Benzer şekilde, Redell ve arkadaşları birçok miRNA ifadesinin travmatik beyin hasarından sonra hipokampusta değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, miR-21 ifadesinin yaralanmadan 3 gün sonra en yüksek seviyede hipokampusta eksprese olduğunu ve yaralanmadan 15 gün sonra normal seviyelere yaklaştığını rapor etmişlerdir⁹⁷.
3. Farklı zamanlarda fonksiyon: miR-124'ün fokal serebral iskemiye karşı koruyucu olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte miR-124 ekspresyonun SKH'nda ilk aşamada arttığı ve daha sonra azaldığı, bu nedenle miR-124 tarafından sağlanan nöronal korumanın geçici olabileceğini göstermektedir⁹⁸. SKH sonrası 4. saatte upregüle olan ve bunu takiben SKH sonrası 1 ve 7. günlerde downregüle olan, miR-99a'nın başlangıçtaki aşırı ekspresyonu, mTOR'un ekspresyonunu inhibe etmekte, bu durumda, hücre proliferasyonu baskılanmaktadır. SKH'nın daha geç safhalarında, miR-99a ekspresyonunda görülen azalma, aktif mTOR yolağının inhibisyonunu ortadan kaldırarak spinal kordun iyileşmesini destekleyecektir⁹⁹.

MikroRNA'lar, SKH'ndan sonra tetiklenen ve sekonder hücre ölümüne katkıda bulunan oksidatif stres yolakları ve/veya kalsiyum sinyalizasyonunun bozulmasına da katılmaktadır. Ca^{+2} pompası, voltaj kapılı Ca^{+2} kanalları veya Ca^{+2} geçirgen iyonotropik glutamat kanalları gibi, Ca^{+2} ilişkili genlerin ifadesi, yaralanma ve post-transkripsiyonel

olarak miRNA'lar tarafından düzenlenmektedir. Yapılan araştırmalarda, upregüle edilmiş miR-223'ün sırasıyla NMDA ve AMPA reseptörlerinin NR2B ve GluR2 alt birimlerinin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Benzer şekilde, voltaj kapılı Ca^{+2} kanallarının azalan ekspresyonu, upregüle edilen miR-21'in bir sonucu olarak değerlendirilmiştir. Bu değeriklikler travmatik SKH'na eşlik eden hücre iči Ca^{+2} konsantrasyon seviyesinin yükselmesine ayrıca hücre ölüm mekanizmalarının tetiklenmesine neden olmaktadır¹⁰.

2.7.1. MiR-20a ve miR-125b

MikroRNA'lar, nöronal oluşum, nöronal gelişim ve sinaptik plastisitede görev alan, hücresel cevaplar da dahil olmak üzere, MSS fonksiyonlarının neredeyse her alanında, önemli rollere sahip yapılarıdır¹⁰. MikroRNA'ların aynı zamanda normal MSS gelişiminde ve işlevlerinde de önemli rolleri bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda, MSS'de miRNA regülasyonunun bozulmasının, travmatik yaralanmalar da dahil olmak üzere, nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olabileceğini göstermektedir⁶. MiRNA'ların değerlen ekspresyonları, SKH patofizyolojisinin kritik süreçlerinde oldukça etkilidir. MiRNA'lar hasar gören MSS'de ortaya çıkan enflamasyon, apoptoz, hücre çoğalması ve farklılaşma gibi süreçlerin düzenlenmesinde aktif olarak rol oynayan moleküllerdir¹⁰. Bu nedenle, SKH'nda miRNA fonksiyonlarının araştırılması yaralanmanın moleküler mekanizmasının anlaşılmasını sađlayacaktır⁶. Spinal kord hasarını takiben ortaya çıkan miRNA değeriklikleri ve miRNA ekspresyon profil ıalışmaları birçok mikroarray ıalışmasında araştırılmıştır. Bununla birlikte, SKH ile ilişkili bireysel olarak mikroRNA'ların ıalışıldığı sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır³⁵. Liu ve arkadaşları sııanlarda yaptıkları araştırmalarında, SKH'ndan sonra yaklaşık 300 miRNA'nın ekspresyonunun değerittiğini, ancak bunlardan 97 miRNA'da anlamlı bir değerimin meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyonunun arttığını buna karşın miR-125b ifadesinin ise azaldığını rapor etmiřlerdir¹⁴. Bununla birlikte bu miRNA'ların SKH'ndan sonra ekspresyon profillerinin belirlenmesi ve hasardan sonra gelişen patofizyolojik süreçlerde nasıl rol oynadıklarının anlaşılması için kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile araştırılması da gerekmektedir.

SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyon değişimini araştıran bir çalışmada, hasardan sonra miR-20a ekspresyonunun upregüle olduğu ve bunun da bir hafta boyunca sürdüğü gösterilmiřtir¹⁴. Hücrenin hayatta kalmasını ve nörogenezini sürdürebilen anahtar bir protein olan NGN-1'in (Neurogenin-1), miR-20a tarafından inhibe edildiği bu nedenle, SKH'nı takiben, miR-20a ekspresyonunu inhibe edilmesinin, nöronal canlılığı ve nörogenezi etkili bir şekilde uyurabileceği ileri sürülmüřtür⁸⁵. Xue-Jun Liu ve arkadaşları da, SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyonunun arttığını, bu durumun antiapoptotik protein olan miyeloid hücre miyeloid hücre lösemi proteini (Mcl-1) üzerinde baskıya neden olduğunu, böylece miR-20a'nın SKH'na bağlı nöronal apoptoza yol açtığı kaydedilmiřtir³⁵.

MiR-125b ailesi, hsa-miR-125b-1 ve hsa-miR-125b-2 olmak üzere iki üyeden oluşur. Bunlar da sırasıyla 11q24 ve 21q21 kromozomlarından kopyalanırlar. MiR-125b'nin spinal kord hasarı üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu daha önce bireysel olarak çalışılmamıştır. Ancak farklı doku ve hastalıklarda çalışılan miR-125b'nin hücre invazyonu, tümör metastazı, anjiyogenez, enflamasyon ve apoptozla ilişkili olabileceği tespit edilmiřtir¹⁰⁰.

Deneyssel olarak yapılan bir araştırmada, lipopolisakkarit (LPS) verilen sıçanlarda, TNF- α ekspresyonunun arttığı, bu ifade değişikliğinde miR-155 ve miR-125b'nin etkili olduğu gösterilmiştir. LPS'ye yanıt olarak, miR-155, TNF- α ekspresyonunu upregüle ederken; miR-125b'nin downregüle ettiği belirtilmiřtir¹⁰¹.

2.8. Tümör Nekroz Faktör Alfa ve İnterlökin-6

TNF- α , IL-1 β ve IL-6, proenflamatuvar sitokinler olarak kabul edilir ve travma sonrası enflamatuvar reaksiyonların kritik aracılarıdır⁹. Spinal kordda yaralanmadan sonra 15 dakika içinde TNF- α ve IL-6 mRNA seviyeleri önemli ölçüde artar. IL-1 ve TNF- α birbirlerinin ekspresyon seviyelerini stimüle etmelerinin yanı sıra, IL-6'nın ekspresyon seviyesini de birlikte uyurabildiklerinden, üç sitokinin de seviyeleri hızla artmaktadır⁴. Bu sitokinlerin seviyeleri yaralanmadan birkaç saat sonra pik yapar, ancak 24. saatte nadiren tespit edilmektedir. Bu düşüşe rağmen, TNF- α 'nın protein seviyeleri SKH'nı takip eden ilk hafta boyunca artmaya devam etmektedir. Bu da, lökosit infiltrasyonuna (SKH'ndan 24 saat sonra) ve primer yaralanma bölgesinde proenflamatuvar sitokinlerin salınmasına yol açar¹.

IL-10, mikrogliyal/makrofaj yanıtlarının çoğunluğunu baskı altına alan güçlü bir antienflamatuvar sitokindir⁹. MSS'nde IL-10, astrositler tarafından sentezlenen TNF- α üretimini azaltmaktadır. TNF- α reseptörlerinden yoksun farelerde, travmatik beyin hasarından sonra azalmış mikrogliya aktivasyonu gösterilmiştir; bu sonuç TNF- α 'nın mikrogliya aktivasyonunda rol oynadığını düşündürmektedir¹⁰².

Aksotomi, motor nöronlarda kuvvetli IL-6 immünoreaktivitesi ile yaralanmadan iki gün sonra da IL-6 mRNA'nın upregülasyonuna yol açar. Bu durumun mikrogliya aktivasyonunu tetikleyebileceği, dolayısıyla da nöroprotektif bir işleve sahip olabileceği ileri sürülmüştür. Buna karşın spinal korda hiperinterlökin-6 salgılayan fibroblastların enjeksiyonu, nötrofil sayısında ve lezyon boyutunda artışa sebep olmuş, buna paralel olarak da aktive edilmiş mikrogliya ve makrofaj sayıları yükselmiştir⁹. Dolayısıyla enflamasyonun yararlı olup olmadığının yalnızca hücresel ve çözünebilir bileşenlere değil, aynı zamanda akut enflamasyon sürecinin zamanlamasına da bağlı olduğu gerçeği göz ardı edilmemelidir.

Klusman ve Schwab¹⁰³ SKH'nı takiben, spinal kordda iyi zamanlanmış bir sitokine özgü enflamatuvar cevabın indüklenmesinin nöron koruyucu olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yaralanmadan 4 gün sonra spinal kord içerisine sitokin kokteyli (TNF- α , IL-1 ve IL-6) enjekte ettikten sonra, mikrogliyal aktivasyon azalırken periferik makrofaj alımında bir miktar artış olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın, yaralanmadan sonraki 1. günde yapılan enjeksiyon sonucunda, makrofaj sayısı ve mikrogliyal aktivasyonda artış meydana gelmiştir. IL-6, büyümeye bağlı protein 43'ün (GAP-43) aktivasyonu yoluyla akson büyümesini uyarmakta, artmış interlökin-6 seviyesi, STAT3 vasıtasıyla, rejenerasyona bağlı genlerin ekspresyonunu yükseltmektedir¹⁰⁴.

Spinal kord yaralanması, kan-spinal kord bariyerinin bozulması, bunu takiben periferik immün hücrelerin ortama infiltrasyonu, mikrogliyaların aktivasyonu ve enflamatuvar sinyal yollarının indüksiyonu ile başlatılan bir enflamatuvar cevabı aktive etmektedir. MikroRNA'lar sinyal yollarının kontrolü ile patojenik immünolojik koşullardaki enflamatuvar yanıtın dinamiklerinde önemli rollere sahiptirler. SKH'nı takiben farklı mikroRNA türleri, bağışıklık yanıtı ile ilişkili olabilen ifade değişikliklerine uğramaktadır. Özellikle, SKH'nda enflamatuvar cevabı modüle eden üç önemli enflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-1 β ve IL-6) aşırı ekspresyonu, yaralanmadan sonra ifadeleri değişen mikroRNA'lar tarafından düzenlenmektedir¹⁰. Farklı SKH

çalışmaları¹⁰, yaralanmadan sonra proenflamatuvar ve proapoptotik faktör TNF- α seviyelerinin artmasının, miR-181⁶⁹ ve miR-125b'nin⁶³ downregülasyonundan kaynaklanabileceğini ileri sürmektedir. Biyoinformatik analizler, SKH'ndan sonra downregüle olan miR-99a ve miR-411 gibi, diğer mikroRNA'ların TNF- α 'yı hedef alabileceğini göstermektedir¹⁰.

IL-6 ve Cox-2'nin, çeşitli patolojik koşullar altında doğal immün yanıtın aktivasyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Iyer ve arkadaşları, miR-146a'nın yüksek seviyesinin IL-6 ve siklooksijenaz-2 (COX-2) ekspresyonlarını inhibe ettiğini, miR-146a'nın inhibisyonunun ise, IL-6 ve COX-2 ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. Dolayısıyla, miR-146a, kronik enflamasyon boyunca bu iki sitokinin enflamatuvar cevabını düzenleyebilmektedir¹⁰⁵. Yapılan çalışmalar, miR-146a'nın SKH sırasında, astrositlerde aşırı derecede eksprese edildiğini göstermiştir. SKH sonrasında miR-146a'nın manipülasyonunun, antienflamatuvar ve antihiperplastik etkilerin ideal dengesini sağlayabileceğini düşündürmektedir.

MiR-223, spinal kord yaralanmasından sonra erken evrede nötrofil lökositlerin düzenlenmesini sağlamaktadır⁹⁰. MiR-223 ekspresyonunun zamana bağlı değişim gösterdiği dolayısıyla, SKH'ndan 12 saat ve 3 gün sonra ekspresyonda pik yaptığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, miR-223 ekspresyonu SKH sonrası 1. günden 7. güne kadar önemli ölçüde azalmaktadır¹⁰⁶. Nötrofiller primer lezyon bölgesinde yaralanmadan 4-6 saat sonra ortaya çıkarlar, sayıları 12-24. saatte pik yapar ve 5 gün içinde kaybolurlar¹. MiR-223 ekspresyonundaki değişim, enflamatuvar cevap ile ilişkili olabilir ve hücre ölümünün de göstergesi olarak kabul edilebilir. Yaralanmadan sonraki ilk günlerde artmış IL-6 seviyesi, let-7a⁶⁸ ve miR-181a'nın¹⁰⁷ azalan ekspresyonu ile korelasyon göstermektedir. Hasardan sonra ilk hafta boyunca, miR-30b-5p ve miR-30c'nin downregülasyonunun^{68,107}, IL-1 β 'nin aşırı ekspresyonuyla ilişkili olabileceği tespit edilmiştir¹.

MiR-181, makrofajlar, monositler ve astrositler tarafından eksprese edilmektedir. miR-181'in aşırı ekspresyonu, IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna yol açması, onun iyi bilinen antienflamatuvar bir ajan olarak değerlendirilmesini sağlamıştır. miR-181, COX2 ve STAT3 tarafından düzenlenen, proenflamatuvar faktör olan HMGA-1'i inhibe

etmektedir. SKH'nda miR-181 ekspresyonunun azaldığı, dolayısıyla da hasar sonrası artmış bir enflamatuvar cevabın ortaya çıktığı rapor edilmiştir¹⁰⁸.

Yapılan diğer bir çalışmada, miR-126 ekspresyonunun SKH'ndan sonra downregüle olduğu gösterilmiştir. Hu ve arkadaşları da, miR-126'nın, anjiyogenezis ve fonksiyonel iyileşmenin yanı sıra enflamasyonu azaltmada oldukça etkin olduğunu göstermişlerdir. Eksojen miR-126 ile tedavi edilen farelerde, ekstrasvazasyon gösteren lökositler ve makrofajlar için biyolojik belirteçlerin (CD45 ve CD68) ifadesinin downregüle olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu, miR-126'nın SKH için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğın düşündürmektedir¹⁰⁹.

2.9. Apoptoz

Programlı hücre ölümü, SKH sonrası sekonder hasarda oldukça önemlidir¹⁰. Programlanmış hücre ölüm şekli olan apoptoz, diğer yandan vücudun işleyiş ve gelişimi için de çok önemlidir. Apoptozun, evrim boyunca oldukça korunmuş olduğu ve sayısız gen tarafından düzenlendiğı bilinmektedir. Programlı hücre ölümünde dokuda bir enflamatuvar cevap meydana gelmez. Dolayısıyla apoptoz, patolojik hücre ölümü olan nekrozdan farklı olarak, hücre yüzeyinde çok sayıda membran katlantıları, hücrenin büzülmesi, genomik parçalanma ile kromatin agregasyonu ve nüklear piknoz ile karakterizedir²⁸. Bunun tersine nekrozda hücre şişer, mitokondriyal hasar enerji kaybına neden olur, homeostaz bozulur ve hücre parçalanır⁹. Memeli hücrelerinde iki farklı apoptoz sinyal yolağı tarif edilmiştir. İlki intrinsik yol mitokondriyal disfonksiyon ile başlatılır. Mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyondan sitokrom c salınımı ve kaspaz-9 aktivasyonunun indüklenmesi ile sonuçlanan hipoksi veya ATP tükenmesi gibi çeşitli tetikleyicilerden kaynaklanabilmektedir. İntrinsik yol esas olarak anti ve proapoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bax tarafından modüle edilir⁵³. İkinci apoptoz yolu, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri ile sinyalizasyonu içerir. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptör (TNFR) ailesinin üyeleridir ve bunlara Fas, p75 ve DR3 dahildir. Bu reseptörler, kaspaz-8 ve kaspaz-10'u aktifleştirirler⁹. Kronolojik olarak, SKH'nda apoptoz başlangıçta lezyon merkezindeki yaralanmadan 6 saat sonra ortaya çıkar ve bundan birkaç gün sonra bu bölgedeki apoptotik hücrelerin sayısı sabit bir şekilde artar. Ancak birinci haftaya geldiğinde apoptoz azalır ve primer yaralanma bölgesinden uzakta apoptotik hücre ölümünde artış olur. Bu yeni apoptotik dalga

çoğunlukla beyaz cevherde lokalizedir ve lezyon merkezinden uzak mesafelerde ortaya çıkabilir¹. Hasar sonrası oligodendrositlerin apoptozu da gerçekleşir. Oligodendrositlerin ölümü, miyelin kılıfının kaybedilmesiyle yaygın demiyelinizasyona neden olur¹⁰. Sıçanlarda SKH'nın ardından, oligodendrositlerin apoptozunun, yaralanmadan sonra maksimum sekiz gün sürdüğü belirtilmiştir⁹.

SKH'nda sekonder hasarı karakterize eden programlanmış hücre ölümü, çeşitli miRNA'lar da dahil olmak üzere, çeşitli düzenleyici faktörler tarafından uyarılan veya inhibe edilen, genler tarafından kontrol edilen bir süreçtir. Pek çok mikroRNA, SKH boyunca hücre ölümünü teşvik etmek veya inhibe etmek için önerilmiş olmakla birlikte, günümüzde mikroRNA ekspresyon profillemesi sonuçları arasında bazı tutarsızlıklar bulunmaktadır. Bu alanda yer alan bilgi farklılığının, miRNA'ların hücresel süreçlerin düzenlenmesinde oynadığı karmaşık roller ve düzensiz mikroRNA'ların kesin aktivitesini belirleme zorluğundan kaynaklandığı düşünülmektedir¹⁰. SKH'ndan sonra belirli hücre tiplerinin ölümü, nöronlarla ilişkili miRNA'ların; miR-124 ve miR-128'in⁹⁵ ile oligodendrositlerle ilişkili miRNA'ların; miR-219, miR-138 ve miR-338'in downregülasyonlarını açıklayabilir^{110,111}. Bazı çalışmalar, miR-21'in, travmatik beyin hasarı gibi MSS yaralanmaları sonrasında upregüle olduğunu desteklemektedir⁹³. Çok sayıda çalışma, miR21'in güçlü antiapoptotik faktör olduğunu desteklemektedir¹¹². MiR-21, proapoptotik genleri hedefleyerek antiapoptotik etki göstermektedir. Buller ve arkadaşları, SKH sonrası miR-21'in aşırı ifadesinin, hücre ölümünü indükleyen ligand olan TNF- α ailesinin üyesi Fas ligand genini (FasL) hedefleyerek, nöronları ölümünden koruduğunu rapor etmişlerdir¹¹³. Glioblastoma hücrelerinde miR-21'in inhibisyonu, kaspazların aktivasyonunu tetiklemekte ve artmış apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır¹¹⁴. miR-21, apoptozu teşvik eden Fas ligand geni ile fosfataz ve tensin homolog geninin (PTEN) her ikisinin de downregulatörüdür¹⁰⁸. Strickland ve arkadaşları, miR-21'in SKH'ndan 4 gün sonra upregüle olduğunu ve 14. günde ise downregüle olarak düzenlendiğini göstermişlerdir². Her ne kadar miR-21'in susturulması, astrogliosisde yararlı etkiye sahip olsa da nöronal hücre ölümü üzerine zararlı olduğu ileri sürülmüştür. Antagomir-21'i kullanarak miR-21'in bastırılması, SKH'ndan 28 gün sonra, spinal kordda nöronal yapısal bozuklukları ve lezyon boyutunu arttırmaktadır⁹³. Diğer bir çalışmada da miR-21'in, PTEN/mTOR yolağını hedef alarak, akson rejenerasyonunu indüklediği ve FasL hedef alarak, antiapoptik etkiye sahip

olduğu gösterilmiştir¹¹². MiR-29b'nin iskemik inme gibi, beyin hasarlarında, nöronal apoptozu düzenlediği bildirilmiştir³⁵.

2.9.1. Kaspaz-3

Memelilerde apoptoz, kaspaz ailesi tarafından düzenlenmektedir⁹. Apoptotik yoldaki efektör proteinler olan kaspazlara bu ismin verilmesinin nedeni, bunların katalitik bölgede anahtar bir sistein aminoasidini barındırmaları ve seçici olarak C-terminal bölgelerindeki aspartatlardan proteinleri kesmeleridir. Kaspaz-3 efektör tipidir, bundan dolayı kaspaz-3 aktivasyonu ölmekte olan hücredeki total kaspaz aktivitesini hızla çoğaltmaktadır⁷. Kaspaz-3'ün aktivasyonunun, in vivo ve in vitro şartlarda, nükleer DNA parçalanmasına yol açtığı, böylece nöronal gelişim bozukluğu ve MSS hasarına neden olduğu belirtilmiştir⁹. Hücre ölümü ve sağ kalımı için ilave kontrol, memeli antiapoptotik proteinler olan Bcl-XL ve Bcl-2 tarafından sağlanır. Emergency ve arkadaşları, yaralanmadan 3 saat ile 2. ay arasında, spinal kordda kaspaz-3 aktivasyonu ile birlikte apoptotik hücrelerin varlığını göstermişlerdir¹¹⁵. Nöronal apoptoza, başta proapoptotik BH3 ailesi üyeleri ile Mcl-1 gibi antiapoptotik üyeleri içeren Bcl-2 ailesi aracılık etmektedir³⁵.

MikroRNA'lar kaspaz ailesi üyelerini hedef alarak da apoptozu düzenleyebilmektedirler. Nitekim, Satoshi Ujigo ve arkadaşları, miR-210'un, SKH oluşturulan farelerin spinal kordlarına enjekte edildiğinde, anjiyonezi, astrogliozisi, miyelinizasyonu arttırdığı ayrıca fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını ve apoptozu da engellediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, insanlarda spinal kord yaralanmalarında, miR-210'un yeni bir tedavi ajanı olabileceğini ileri sürmüşlerdir¹¹⁶. Ming Bai ve arkadaşları da insan melanoma hücrelerinde miR-194'ün aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu indükleyerek kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir¹¹⁷.

Da Liu ve arkadaşları araştırmalarında, deneysel SKH ile indüklenen apoptotik hücreler ve apoptozla ilişkili belirteçler olan Bcl-2, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonlarını değerlendirmişler ve yaralanmanın spinal kord dokusunda apoptotik hücrelerin sayısında belirgin bir artışa neden olduğunu, bunun aksine, antagomir-223 tedavisi uygulanan grupta, travmadan 3 gün sonra daha az TUNEL pozitif hücre sayısının elde edildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, antagomir-223'ün, proapoptotik Bax'ı ve

kaspaz-3 seviyelerini önemli ölçüde inhibe ettiğini, antiapoptotik Bcl-2 seviyelerinin ise yükseldiğini böylece miR-223 inhibisyonunun, SKH'nda antiapoptotik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. SKH sonrası antagomir-223 uygulanmasının apoptozu engellediği, anjiyogenezi uyardığı ve fonksiyonel iyileşmeyi sağladığını, bu nedenle de, miR-223'ün, SKH için gelecekte umut vadeden bir tedavi ajanı olabileceğini vurgulamışlardır³.



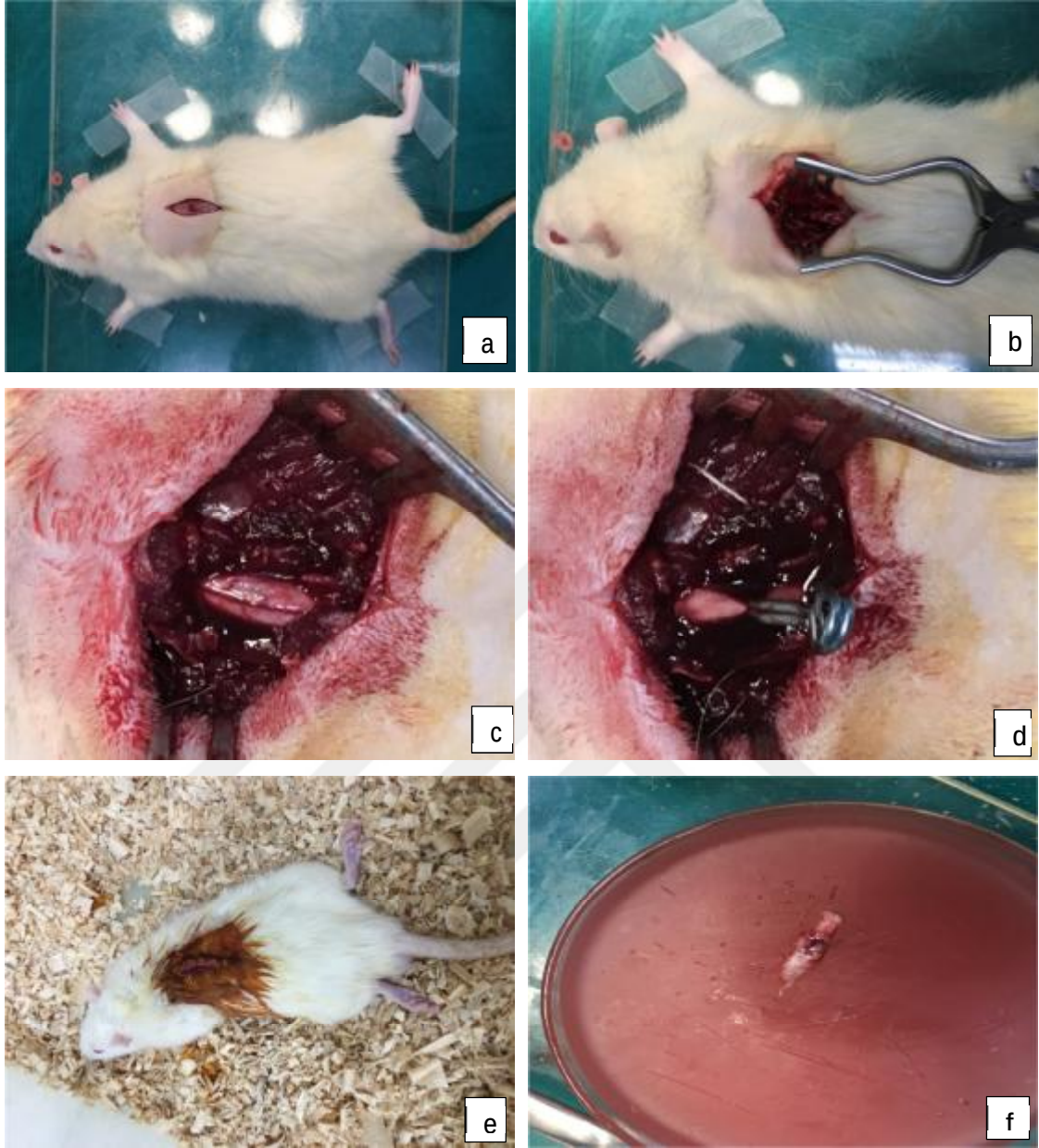
3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney hayvanlarının elde edilmesi ve gruplara ayrılması

Deneyssel akut spinal kord yaralanması sonrasında miR-20a ve miR-125b ekspresyonlarının apoptoz ve enflamasyon ile olan ilişkilerinin mikroskopik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler ile araştırılması amacıyla Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneyssel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden (DETAUM) 250-300 gr ağırlığında 42 erkek Wistar cinsi sıçan temin edildi. Bu denekler herhangi bir cerrahi işlem yapılmayan ve sağlam bırakılan kontrol grubu (n=8), spinal kord T2-T7 segmentleri arasında yalnızca laminektomi oluşturulan sham operasyon grubu (n=8) ve T2-T7 segmentleri arasında klip kompresyon yöntemi ile spinal kord hasarı (SKH) oluşturulan deney grubu (n=24) olmak üzere 3 gruba ayrıldı. SKH'nı takiben deney grubunda yer alan hayvanlar da kendi aralarında; spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra yalnızca serum fizyolojik verilen grup (grup 3A, n=12); spinal kord hasarını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan grup (grup 3B, n=12); olmak üzere 2 alt gruba ayrıldı. Grup 2 (sham grubu) ile 3A ve 3B gruplarında yer alan hayvanlardan travmayı takiben 1, 3, 7 ve 14. günlerde spinal kord doku örnekleri alındı.

3.2. Operasyon

Bütün cerrahi işlemler 150 mg/kg intramusküler ketamin anestezisi altında gerçekleştirildi. Klip kompresyon yöntemi Rivlin ve Tator⁴⁸ modeline göre yapıldı. Spinal kord yaralanması Torakal 2-7 (T2-7) segmentleri arasında, ekstradural klip kompresyon uygulaması ile gerçekleştirildi. Kapanma gücü 50 g olan anevrizma klibi (Yaşargil, FE 691K, Aesculap AG, Germany) ekstradural olarak uygulanarak deneklerde SKH yapıldı. Klip uygulama süresi 1 dakika olarak ayarlandı ve süre bitiminde klip hemen kaldırıldı.



Şekil 4. Operasyon. A-B) Deri ve kas tabakaları ensizyonla açıldı. C) Laminektomi yapılarak spinal korda ulaşıldı. D) Torakal 2-7 segmentleri arasında, ekstradural klip kompresyon uygulaması ile spinal kord hasarı oluşturuldu. E) Operasyon bölgesi kapatılarak, sıçanın anesteziden kontrollü olarak uyanması sağlandı. F) Sakrifiye edilen sıçanlardan hasarlı spinal kord dokuları kontrollü bir şekilde alındı.

3.3. Tedavinin Uygulanması

Deney kontrol grubundaki (Grup 3A) deneklere SKH'nı takiben yalnızca serum fizyolojik enjekte edildi. Metilprednizolon tedavisi alan gruba (Grup 3B), yaralanmadan hemen sonra, başlangıç dozu olarak 30 mg/kg metilprednizolon intravenöz olarak uygulandı. Daha sonraki 24. saat (1. gün sonu)'ten 14. güne kadar dozlar 10 mg/kg/gün intravenöz olarak verildi.

3.4. Dokuların Alınması

Grup 2, 3A ve 3B'den SKH'ndan 1 gün, 3 gün, 7 gün ve 14 gün sonra spinal kord doku örnekleri alındı. Elde edilen spinal kord dokuları, ışık ve elektron mikroskopik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik incelemeler için uygun yöntemler ile hazırlandı.

3.5. Işık Mikroskopi Yöntemleri

Işık mikroskopik incelemeler için bütün gruplardan elde edilen spinal kord doku örnekleri, %4'lük paraformaldehit içerisine alındı ve oda ısısında 48-72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra paraformaldehitin uzaklaştırılması için dokular su ile yıkandı ve Leica TP 1020 Ototeknikon Cihazı ile Çizelge 1'de belirtilen doku takip yöntemi uygulandı.

Çizelge 1. Işık mikroskopik doku takip işlemi:

Oda sıcaklığında	Paraformaldehit	30 dakika
Oda sıcaklığında	%70'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%80'lik etil alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Bloklama işlemini takiben mikrotom ile 5 µm kalınlığında alınan histolojik kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Olympus BX53 ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları alındı. Bloklardan ayrıca immünohistokimyasal incelemeler için de doku kesitleri alındı ve uygun yöntemlerle hazırlandı.

3.6. İmmünohistokimya Yöntemleri

Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6) ve Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi amacı ile elde edilen histolojik kesitler, polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. Buzdolabında bekletilen kesitler işaretleme işlemine geçilmeden önce kurutulularak, tekrar buzdolabına alındı ve 15 dakika kadar bekletildi. Buzdolabından çıkarıldıktan sonra tekrar kurutulan kesitler, 60 °C’de etüvde ksilol içerisinde 15 dakika deparafinize edildi. Daha sonra doku kesitleri, oda ısısında ksilol serilerinden geçirildi ve derecesi giderek azalan alkol serileri içerisinde hidrate edildi ve distile su içerisine alındı. Kesitler daha sonra, sitrat solüsyonu (pH:6) içerisine alınıp 95°C’lik su banyosunda, 30 dakika süreyle tutularak antijenlerin açığa çıkarılması işlemi gerçekleştirildi. Oda ısısında 45 dk soğutulan kesitler, distile suda yıkandı ve %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) içerisine alındı. H₂O₂’te yaklaşık 10 dk kadar bekletildikten sonra, kesitler, saf su ve fosfat tamponundan (PBS, pH: 7,2-7,4) geçirildi. Her bir kesitin etrafı dikkatlice silinip, kurulandıktan sonra, üzerine nonspesifik bağlanmayı engellemek amacıyla blocking (ab93705, Abcam, USA.) damlatıldı ve oda ısısında 15 dakika bekletildikten sonra kesitler, saf su ve fosfat tamponundan geçirildi ve dokuların etrafı kurulandı. Daha sonra 1/400 oranında sulandırılan, anti-IL-6 (IL-6; anti-rat rabbit polyclonal antibody, ab6672, Abcam, USA), 1/500 oranında dilüe edilen anti-TNF- α (TNF- α ; anti-rat rabbit polyclonal antibody, ab6671, Abcam, USA) ve 1/500 oranında dilüe edilen (kaspaz-3; anti-rat rabbit polyclonal antibody, ab4051, Abcam, USA) primer antikörleri damlatıldı. Primer antikör damlatılan tüm kesitler +4°C’de, nemli ortamda bir gece bekletildi. Negatif kontrol için alınan kesitlere primer antikör yerine, tampon solüsyonu damlatıldı. Primer antikörle muamele edilip 1 gece +4°C’de ve ardından 1 saat oda bekletilen kesitler, daha sonra distile su ve PBS’den geçirildi ve üzerlerine Biotin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılarak 15 dk süreyle oda ısısında tutuldu. 15 dk sonra distile su ve PBS’de yıkanan kesitlerin etrafı kurulanıp Avidin (ab93705, Abcam, USA.) damlatılarak, 20 dakika süreyle oda ısısında bekletildi. Distile su ve PBS’den geçirilen kesitler üzerine, aminoetilkarbozol (AEC) solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi, çeşme suyu içerisinde yıkandı ve doku kesitleri, zıt boyama için hematoxilen ile boyandı. Boyama işleminden sonra kesitler, çeşme suyunda yıkanarak kurumaya bırakıldı. Su bazlı kapama maddesi damlatılarak dokular

lamel ile kapatıldı, Olympus BX53 ışık mikroskobu (Japan) ile incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.6.1. İmmünohistokimyasal Skorlama Yöntemi

TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immunohistokimyasal skorlama yöntemi uygulandı. İmmünohistokimyasal skorlama için 40'lık objektifte rastgele seçilen 5 alanda H Skorlama sistemi kullanıldı. H skoru, pozitif hücre yüzdesiyle birlikte dört farklı boyama yoğunluğunun çarpımı toplanarak hesaplandı. Bu sisteme göre;

Boyanma derecesi = 0 (Hiç boyanma yok)
= 1 (Zayıf derecede boyanma)
= 2 (Orta derecede boyanma)
= 3 (Güçlü derecede boyanma) şeklinde değerlendirildi.

H Skor değerini hesaplamak için 'I x PC' formülü kullanıldı.

I: Intensity (Yoğunluk)

PC: Percentage of positive cells (Her derecede boyanan hücre yüzdesi)

Gruplar arasındaki ekspresyon farklılıkları 'Mann Whitney U' testi kullanılarak değerlendirildi. 0,05'ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

3.7. Elektron Mikroskopi Yöntemleri

Elektron mikroskobik değerlendirme için alınan spinal kord doku parçaları, Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış % 5 lik glutaraldehit solüsyonunda 1 saat bekletildikten sonra üzerinde birkaç damla glutaraldehit olan dişçi mumuyla kaplı petri üzerinde jilet yardımıyla 1 mm³ lük parçalara ayrıldı. Doku parçaları tekrar glutaraldehit solüsyonuna alınarak 3 saat kadar tespit edildi. Böylece dokular glutaraldehit ile toplam 4 saat tespit edilmiş oldu. Daha sonra dokular Millonig fosfat tamponunda iki defa 10'ar dk çalkalandı ve ardından Millonig fosfat tamponu ile hazırlanmış %1 lik osmium tetraoksit (OsO₄) solüsyonu ile ikinci defa tespit edildi. İki saatlik osmium tetraoksit tespitinden sonra dokular fosfat tamponu ile iki kez 10'ar dakika yıkandı. Daha sonra

dokular, Çizelge 2'de belirtilen sıraya göre derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

Çizelge 2. Elektron mikroskopik doku takibinde dehidratasyon işlemi

%50'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%70'lik etil alkol	+4°C	15 dakika
%86'luk etil alkol	+4°C	15 dakika
%96'luk etil alkol	+4°C	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C	15 dakika
%100'lük etil alkol	+4°C	15 dakika

Buraya kadar olan işlemler +4°C' de gerçekleştirildi. Daha sonra Çizelge 3'te belirtilen işlemler oda ısısında gerçekleştirildi.

Çizelge 3. Elektron mikroskopik doku takibinde şeffaflandırma işlemi

%100 Etil alkolde	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen oksitte	Oda sıcaklığında	15 dakika
Propilen oksitte	Oda sıcaklığında	15 dakika

Dehidratasyon ve şeffaflandırma işlemleri tamamlandıktan sonra, doku parçaları 1 hacim propilen oksit ve 1 hacim rezin'den (gömme materyali) oluşturulan karışım içerisinde 2'şer defa 30'ar dakika süreyle bekletildi. Bu işlemlerden sonra doku parçaları taze hazırlanmış rezin içerisine alınarak 1 gece boyunca rotatorda döndürülerek karıştırıldı ve rezinin doku parçaları içerisine daha iyi nüfuz etmesi sağlandı. Taze rezin (gömme materyali) Çizelge 4'te belirtildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 4. Gömme materyalinin hazırlanışı

Araldehit (CY 212)	20 ml
Sertleştirici (HY 964)	20 ml
Hızlandırıcı (DY 064)	0,6 ml
Plastikleştirici-Dibütil Fitalat	1ml

Ertesi gün rotatordan alınan doku parçaları taze hazırlanmış gömme materyali kullanılarak Beem kapsüllere gömüldü ve 60 °C etüvde 48 saat polimerize edildi. Daha sonra bloklar etüvden çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Bloklardan Ultracut S ultramikrotomu ile 1 µm kalınlığında yarı ince kesitler alınarak toluidin mavisi ile boyandı ve doku bloklarında uygun alanların seçimi yapıldı. Belirlenen alanlardan ultramikrotom ile 50 nm kalınlığında ince kesitler alındı. Kesitler 200-300 gözenekli bakır gridlere alınarak %70'lik etil alkolde hazırlanan doymuş uranil asetat ile Reynolds'un kurşun sitrat solüsyonları ile boyandı. Boyanan kesitler JEOL-JEM 1400 Transmisyon Elektron Mikroskobu (Japan) ile incelendi ve mikrograflar elde edildi.

3.8. Kantitatif Reverse Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Moleküler biyolojik değerlendirmeler için bütün gruplardan elde edilen spinal kord doku örnekleri, kriyo tüplerin içerisinde sıvı azota alındı ve -80 °C'de saklandı. Alınan spinal kord doku parçalarına QIAZOL Lysis Reagent (79306, Qiagen, Almanya) eklenerek Qiagen- TissueLyser II homojenizatöründe parçalandı. Elde edilen homojenat üzerine kloroform (Merck, Türkiye) eklendi ve +4 °C'de 12,000 x g'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz alındı ve elde edilen süpernatanttan ticari kitler (miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen RNA'ların, A280 / A260 oranı (oran> 1.5) ve konsantrasyonu spektrofotometre ile ölçüldü. RNA konsantrasyonları RNase free water ile aynı düzeye (100 ng) getirildi. Elde edilen total RNA reverse transkripsiyon kiti (miScript II RT Kit, Qiagen, Almanya) kullanılarak cDNA (complementary DNA)'ya dönüştürüldü. Reverse transkripsiyon miksi çizelge 5'te belirtildiği gibi hazırlandı. Hazırlanan miks 37 °C'de 60 dakika, ardından 95 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve elde edilen cDNA'lar -20 °C'de saklandı.

Çizelge 5. Reverse-transkripsiyon reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Volüm/reaksiyon
5x miScript HiFlex Buffer	4 µl
10x miScript Nucleics Mix	2 µl
RNase-free water	2 µl
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Örnek RNA	10 µl
Total volüm	20 µl

Araştırılan gen ekspresyon düzeyleri real time PCR yöntemiyle Applied Biosystems 7300 (ThermoFisher, Amerika) cihazı kullanılarak kuantifiye edildi. MiR-20a ve miR-125b genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Gen ekspresyonunun normalizasyonu için SNORD87 (U87) ev (house keeping) geni kullanıldı. Real time miksi çizelge 6’da belirtildiği gibi hazırlandı.

Çizelge 6. Real time PCR reaksiyon bileşenleri

Bileşen	96-kuyucuk
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	1375 µl
10x miScript Universal Primer	275 µl
RNase-free water	1000 µl
Örnek cDNA	100 µl
Total volüm	2750 µl

Real time PCR döngüsü miR-20a ve miR-125b için optimize edildi ve çizelge 7’deki koşullara göre yapıldı.

Çizelge 7. Real time PCR döngü koşulları

Adım	Zaman	Sıcaklık
İlk aktivasyon basamağı	15 dakika	95 °C
Denatürasyon	15 saniye	94 °C
Bağlanma (annealing)	30 saniye	55 °C
Uzama (extension)	34 saniye	70 °C
Döngü	50 döngü	

3.9. İstatistiksel Analiz

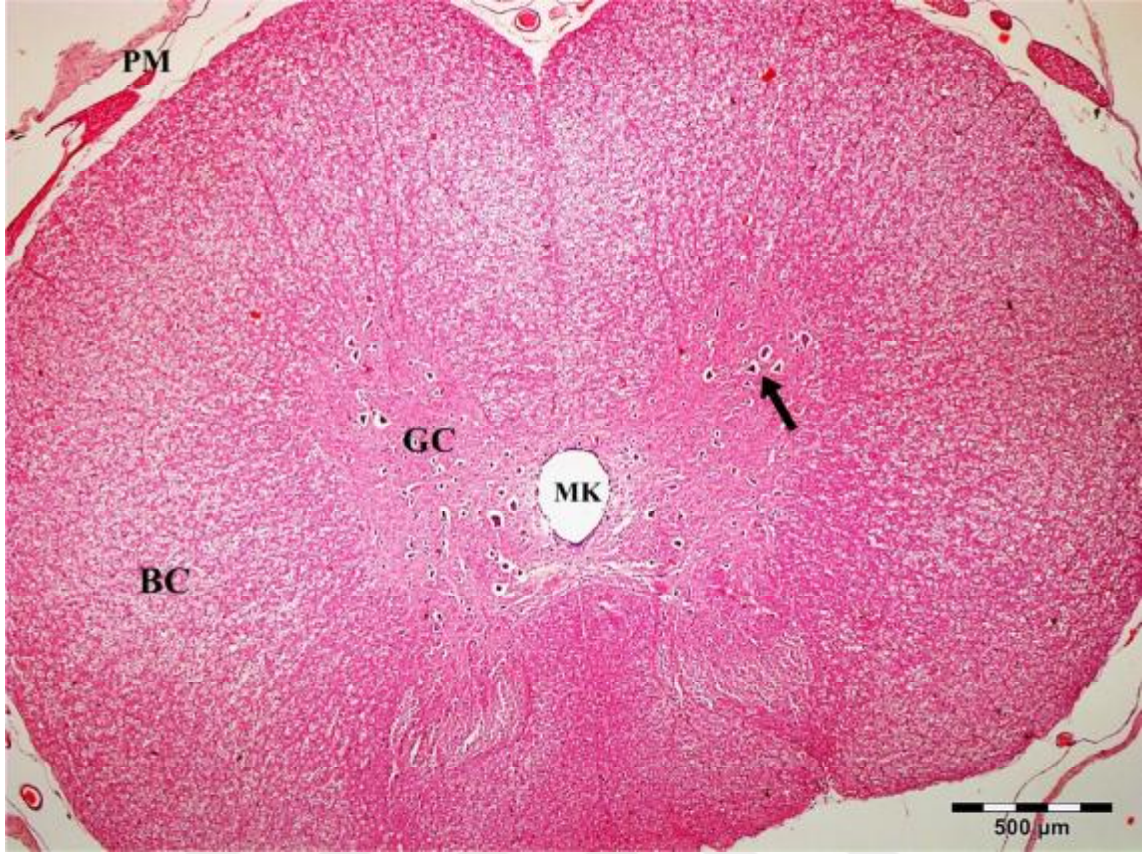
Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanıldı. Verilerin normal dağılımlı olup olmadıkları değerlendirilmesinde “D’Agostino & Pearson omnibus normality test” kullanıldı. Sonuca göre; gen ekspresyon analizinde GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc. USA) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizinin (One-way analysis of variance, 31 ANOVA) Dunnett’s çoklu karşılaştırma testi (Dunnett’s Multiple Comparison Test) yapıldı. Gen ekspresyon miktarlarının analizi fold regulation ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) yöntemine göre hesaplandı. Böylelikle ilgili genlerin ekspresyon miktarlarının kaç kat arttığı/azaldığı belirlendi. Gen ekspresyonunda istatistiki değerlendirme deney, tedavi ve kontrol gruplarının $2^{-\Delta C_t}$ değerlerinin Student t-test ile kıyaslanması ile yapıldı. 0,05’ten küçük p değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Kontrol Grubu

Spinal kord hasarı oluşturulmayan ve herhangi bir işlem yapılmayan bu gruba ait hayvanların spinal kord doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, spinal kordu dıştan çevreleyen bağ dokusu yapısında olan pia mater görüldü. Pia mater'in, spinal kordun yüzeyini yakından takip ederek büyük ventral fissurun içine kadar sokulduğu gözlemlendi. Spinal kordun dış kısmını oluşturan beyaz cevher yoğun olarak miyelinli sinir lifleri, gliya hücreleri ve kan damarlarından oluşmaktaydı. Spinal kordun iç kısmını oluşturan gri cevher, sinir lifleri ile birlikte sinir hücre gövdelerini (perikaryon) içermektedir. Gri cevher merkezi kanal çevresinde H harfi şeklinde bir görünüm oluşturmaktaydı. Gri cevherin orta bölgesinde yer alan merkezi kanal ise silyalı kübik hücreler olan ependim hücreleri ile döşenmişti. Gri cevherde yer alan nöron perikaryonları veziküler tip, büyük, yuvarlak şekilli bir çekirdek ve geniş bir sitoplazmaya sahipti. Veziküler tipte hücre çekirdeğinin orta kısmında belirgin bir çekirdekçiğe sıklıkla rastlandı. Nöronların sitoplazmasında Nissl cisimcikleri belirgin olarak izlendi. Gri ve beyaz cevherde yer alan nöroglia hücreleri belirgin hiperkromatik boyanmış çekirdekleri ile ayırt edildi (Şekil 5).

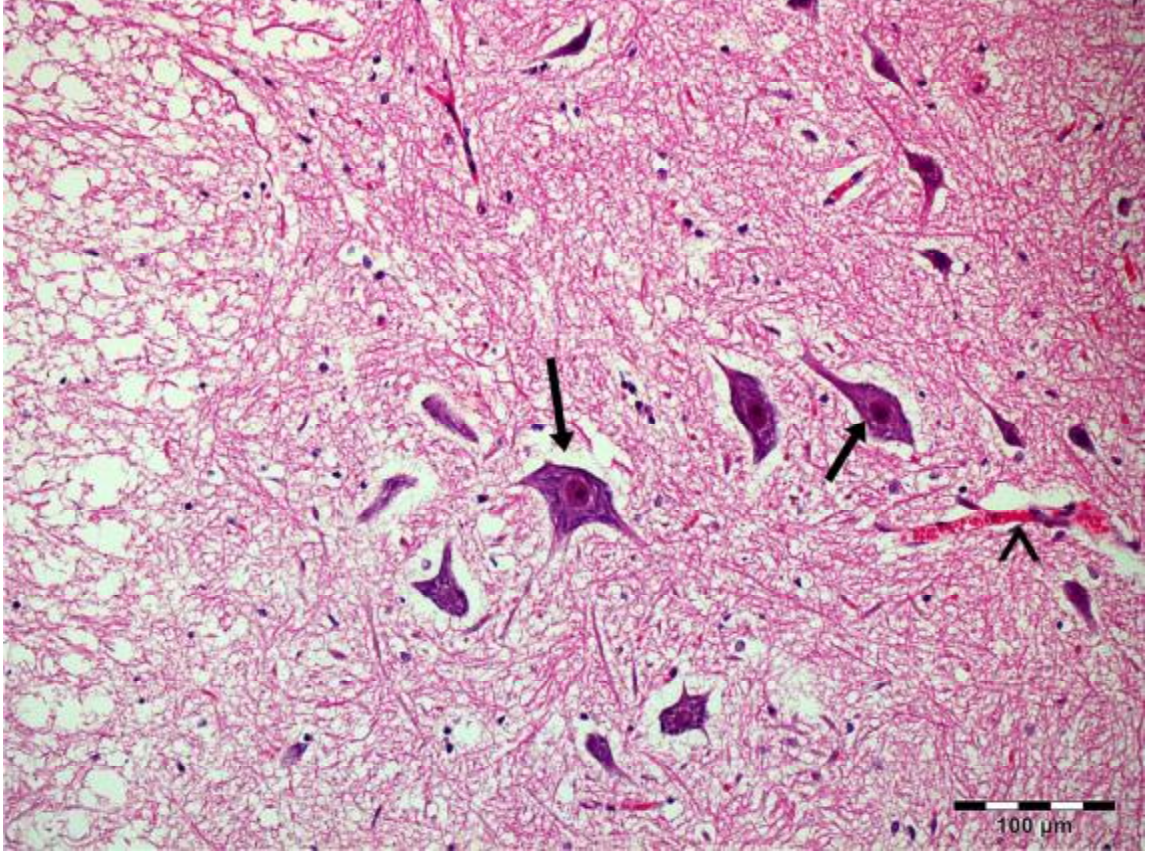


Şekil 5. Kontrol grubu. Spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Spinal kord dıştan pia mater (PM) ile çevrilidir. Merkezde H harfi şeklinde gri cevher (GC), bunun da ortasında ependim hücreleri ile döşeli merkezi kanal (MK), dışta da beyaz cevher izlenmektedir (BC). Gri cevherin ön boynuzunda yer alan motor nöronlar (ok) belirgin olarak görülmektedir. Gri cevher etrafında miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri ve gliya hücrelerini içeren beyaz cevher yer almaktadır. H&E, Bar = 500μm.

4.1.2. Sham operasyon grubu

Spinal kord yaralanmasına maruz bırakılmayıp yalnızca Torakal 2-7 segmentleri arasında laminektomi yapılan bu gruptaki sıçanlardan 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınan doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde spinal kord yapısı normal kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi. Gri ve beyaz cevherden oluşan spinal kordun dıştan ince bağ dokusu yapısında pia materle çevrili olduğu görüldü. Spinal kordun merkezinde yer alan gri cevherde nöron perikaryonları, nöroglialar, sinir lifleri ve kan damarları ayırt edildi. Nöron perikaryonları, akson ve gliya hücrelerinin histolojik yapılarının normal olduğu gözlemlendi. Nöron perikaryonları, tipik büyük, yuvarlak, açık renkte boyanan bir çekirdek, belirgin çekirdekçik ve sinir hücre gövdesinin sitoplazmasındaki bol miktarda Nissl cisimciği ile ayırt edildi. Beyaz cevherde yer alan

gliya hücreleri ve miyelinli sinir liflerinin de normal yapılarını korudukları görüldü (Şekil 6).



Şekil 6. Sham operasyon grubu. Spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Gri cevherdeki sinir hücre gövdeleri (oklar) koyu mor renkte boyanmıştır. Hücre çekirdekleri veziküler tipte olup açık pembe renkte boyanmış ve merkezi bölgesinde çekirdekçik içermektedir. Kapiller damar ok başı ile gösterilmiştir. Gliya hücreleri hem gri hem de beyaz cevherde koyu mor renkte boyanmış küçük çekirdekleri ile ayırt edilmektedir. H&E, Bar= 100µm.

4.1.3. Deney Kontrol Grubu

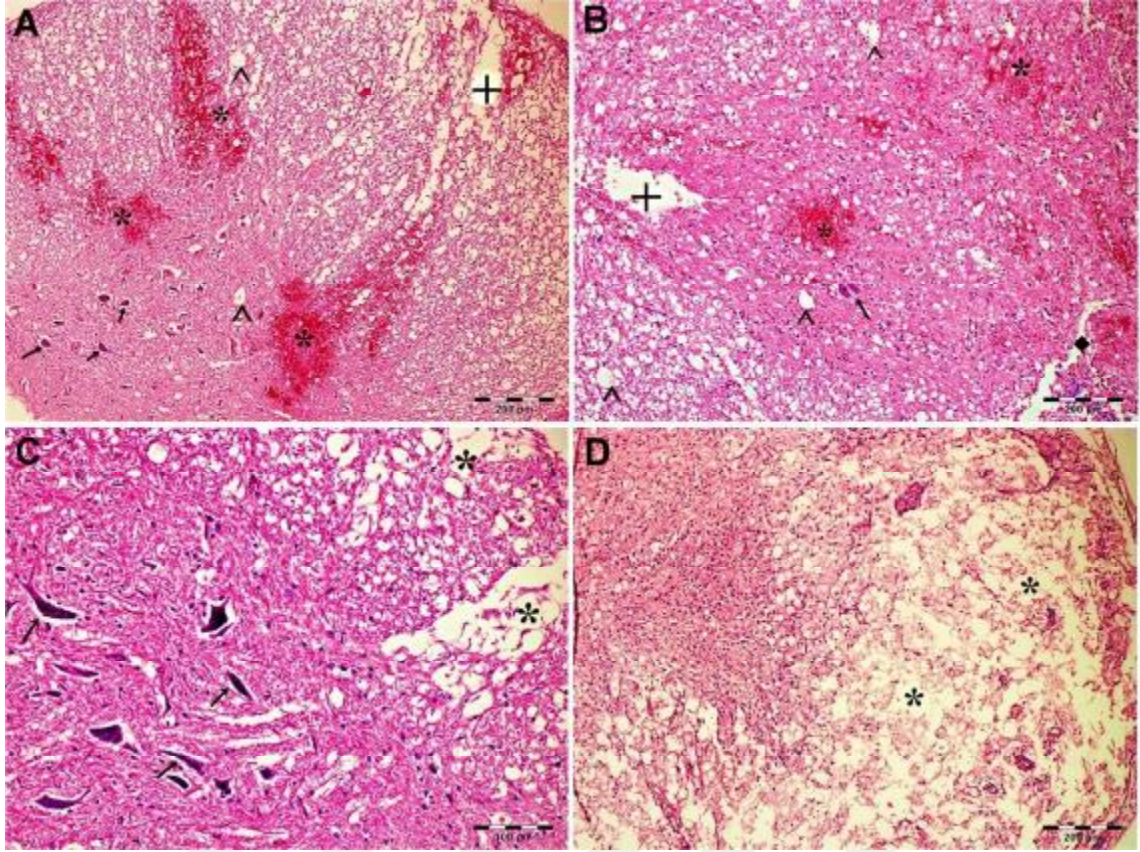
Torakal 2-7 segmentleri arasında klip kompresyon yöntemi ile spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra, hiç bir tedavi yöntemi uygulanmayıp yalnızca serum fizyolojik verilen gruba ait, spinal kord doku örnekleri yaralanmadan sonra 1, 3, 7 ve 14. günlerde ışık mikroskopik değerlendirmeler için elde edildi. Yaralanma sonrası 1. gün elde edilen deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularının ışık mikroskopik incelemelerinde gri ve beyaz cevherin genel histolojik yapıları, nöronlar, gliya hücreleri, sinir lifleri ve miyelin kılıf yapılarındaki değişiklikler dikkate alındı. Bu gruba ait hayvanlarda, spinal kord gri cevherinde hücresel hasarın nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde belirgin olduğu ve önemli boyutta kavitasyon alanları dikkati çekti. Nöron

perikaryonlarının çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmada büzüşmenin olduğu görüldü. Bunun yanı sıra hem gri cevherde hem de beyaz cevherde ödem ve hemorajik alanların varlığı izlendi. Özellikle beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde önemli miktarda miyelin kayıplarına rastlandı (Şekil 7A).

Deney kontrol grubuna ait hayvanlardan yaralanma sonrası 3. günde elde edilen doku örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, gri ve beyaz cevherde ödematöz ve hemorajik alanların varlığı 1 günlük gruba benzer şekilde bu grupta da izlendi. Nöronlarda oluşan dejeneratif değişiklikler bu grupta da belirgindi. Nöronlarda özellikle çekirdekte kromatin yoğunlaşması belirgindi. Gri cevherde ve özellikle de beyaz cevherde aksonlarda oluşan yapısal bozukluklar dikkat çekiciydi. Miyelinli aksonlarda, miyelin kılıfta yapısal bozukluklar ve miyelin kılıf kayıpları yaygın olarak izlendi (Şekil 7B).

Deney kontrol grubuna ait hayvanlardan yaralanma sonrası 7. günde elde edilen doku örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, gri ve beyaz cevherde ödematöz ve kavitasyon alanlarının önemli ölçüde azaldığı görüldü. Diğer taraftan hemorajik alanların genellikle kaybolduğu tespit edildi. Ancak gri cevherde nöron gövdelerinde belirgin bir bozulmanın varlığı tespit edildi. Beyaz cevherde miyelin kılıf kaybı ve miyelin kılıfta yapısal bozukluklar bu grupta da izlendi (Şekil 7C).

Deney kontrol grubuna ait hayvanlardan yaralanma sonrası 14. günde elde edilen doku örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, deney kontrol grubu 7. güne benzer yapısal özellikler tespit edildi. Ancak bu grupta farklı olarak, kavitasyon alanlarının yerini hücresel atıklara bıraktığı görüldü. Beyaz cevherde miyelin kılıfta yapısal bozukluklar ve gri cevherde nöron perikaryonlarındaki bozukluklar bu grupta da tespit edildi. Miyelin kayıplarının yoğun olduğu alanlarda dejenere olan akson ve miyelin kılıf artıklarını fagosite etmek üzere makrofajların ve mikrogliyal hücrelerinin artmış oldukları dikkati çekti. Bu grupta hemorajik alanlar belirgin değildi ve ödem alanları da azalmıştı (Şekil 7D).



Şekil 7. Deney kontrol grubu ışık mikroskopik görünümü. A) 1.günde alınan spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Spinal kordda şiddetli hemorajik alanlar (*) izlenmektedir. Nöron gövdelerinde dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Ödematöz alanlar (okbaşı) ve kavitasyon alanları (+) görülmektedir. Bar= 200 µm. B) 3. günde alınan spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Spinal kordda hemorajik alanlar (*) izlenmektedir. Nöron gövdelerinde dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Ödematöz alanlar (okbaşı) ile kavitasyon alanları (+) gösterilmiştir. Bar= 200 µm. C) 7. günde alınan spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Nöron gövdelerinde dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Ödematöz alanlar (*) izlenmektedir. H&E, Bar= 100 µm. D) 14. günde alınan spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Özellikle gri cevherde ödem (*) ve sinir lifi kaybıyla birlikte hücresel atıklar dikkati çekmektedir. H&E, Bar= 200 µm.

4.1.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup

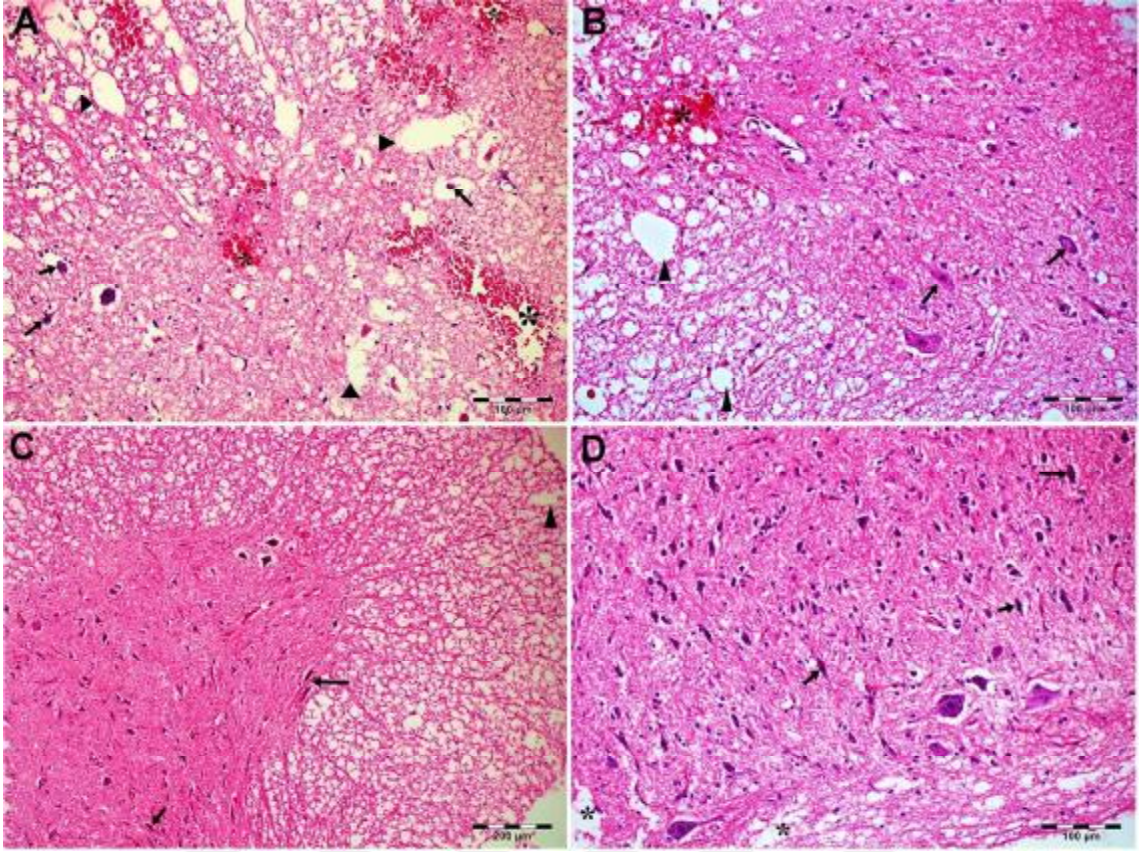
Spinal kord yaralanmasını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan gruba ait spinal kord doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme amacıyla 1, 3, 7 ve 14. günlerde elde edildi. 1 günlük metilprednizolon tedavi grubunda spinal kordda yaralanma ile birlikte meydana gelen dejeneratif değişikliklerin, deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, nisbeten azalmış olduğu görüldü. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde kavitasyon, ödematöz alanlar ve hemoraji görülmekle birlikte, dejeneratif değişikliklerin özellikle hiçbir tedavi uygulanmayan deney kontrol grubuna kıyasla daha sınırlı olduğu görüldü. Nöron perikaryonları ve sinir liflerinde dejeneratif değişiklikler

yer almaktaydı. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf bozuklukları ve aksonal harabiyet bu grupta da belirgindi (Şekil 8A).

Metilprednizolon tedavisini takiben 3. günde alınan doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmelerinde de 1 günlük gruba yakın bulguların varlığı görüldü. Bu grupta da kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarında deney kontrol grubuna göre belirgin bir azalmanın olduğu, nöron ve sinir liflerinde yapısal değişiklikler görülmesine rağmen, tedavi edilmeyen gruba oranla, bu değişikliklerin daha hafif seyrettiği dikkati çekti. Beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf kaybı, 1 günlük gruba benzer şekilde, bu grupta da belirgindi (Şekil 8B).

Metilprednizolon tedavisini takiben 7. günde alınan doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmelerinde, hemorajik alanların tamamen kaybolduğu ve kavitasyon alanlarının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi. Nöron perikaryonları ve sinir lifleri bazı bölgelerde dejeneratif değişiklikler göstermekle birlikte bu değişiklikler deney kontrol grubu 7.gün bulgularına oranla anlamlı derecede azalmıştı (Şekil 8C).

Metilprednizolon tedavisini takiben 14. günde alınan doku örneklerinin ışık mikroskopik incelenmelerinde, spinal kord gri ve beyaz cevherinde histolojik yapının genellikle korunmuş olduğu dikkati çekti. Nöron gövdeleri, gliya hücreleri ve sinir lifleri fokal yapısal değişiklikler göstermekle birlikte normal yapıda olanların sıklığı da dikkat çekti. Kavitasyon ve ödem alanları diğer gruplara oranla önemli ölçüde azalmıştı ve hemorajik alanlara rastlanılmadı. Deney kontrol grubu 14. güne oranla hücre atıklarının belirgin derecede azaldığı görüldü (Şekil 8D).



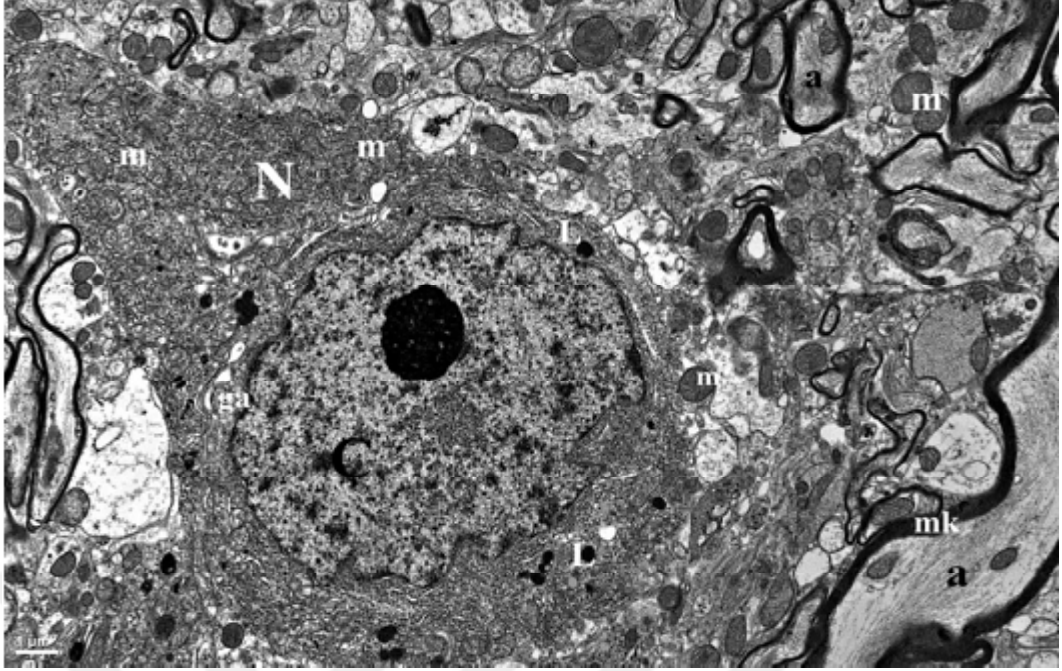
Şekil 8. Metilprednizolon grubu ışık mikroskopik görünümü. A) 1. günde spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Hemorajik alanlar (*) ile işaretli bölgelerde izlenmektedir. Sinir hücresi perikaryonlarında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Ödematöz alanlar (ok başı) gösterilmiştir. Bar= 100µm. B) 3. günde spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Sinir hücre perikaryonlarında dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Hemorajik alanlar (*) ile işaretli bölgelerde izlenmektedir. Ödematöz alanlar (ok başı) gösterilmiştir. Bar= 100µm. C) 7. günde spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Sinir hücre perikaryonları çoğunlukla normal yapılarını korumakla birlikte, bazı nöronlarda dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Miyelinli ve miyelinsiz sinir lifleri genel olarak normal yapıda izlenmektedir. Ödematöz alanlar (ok başı) işaretlenmiştir. Bar= 200µm. D) 14. günde spinal kordun ışık mikroskopik görünümü. Sinir hücreleri çoğunlukla normal yapıda izlenmekle birlikte bazı nöronlarda dejeneratif değişiklikler (oklar) görülmektedir. Sinir liflerinin normal histolojik yapılarını korudukları gözlenmektedir. Kavitasyon alanları (*) önemli ölçüde azalmıştır. H&E, Bar= 100µm.

4.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

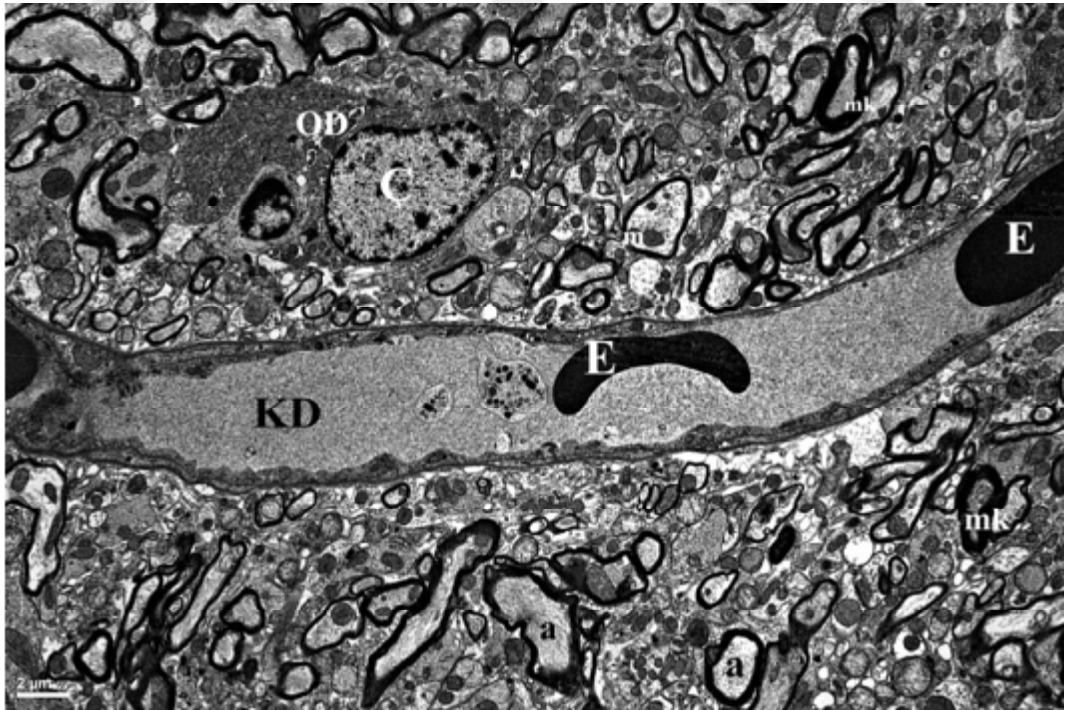
4.2.1. Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanması oluşturulmayan ve herhangi bir müdahale yapılmayan bu gruba ait spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde gri cevherdeki sinir hücre gövdeleri, miyelinsiz sinir lifleri ve gliya hücreleri ile birlikte, beyaz cevherdeki miyelinli aksonlar ve gliya hücrelerinin ince yapıları değerlendirildi. Gri cevherde yer alan sinir hücre perikaryonunun merkezi yerleşimli bir çekirdek ve bunun etrafını çevreleyen perinükleer sitoplazmadan oluştuğu görüldü. Sferikal olan

hücre çekirdeği hücrenin merkezinde yerleşmişti. Veziküler tipteki çekirdek içerisinde iyi ayırt edilebilen çekirdekçiğin varlığı izlenmekteydi. Nöron sitoplazmasında bulunan mitokondriyonların genellikle ovoid veya yuvarlak şekilli oldukları, hem transvers hem de longitudinal tipte kristalara sahip oldukları ayırt edildi. Perinüklear yerleşim gösteren Golgi kompleksi oldukça fazla sayıda, bütün perikaryona dağılmış halde izlendi. Nöronun hücre gövdesi Nissl cisimcikleri olarak bilinen çok sayıda kaba kütleler içerir. Nissl cisimcikleri nöronların granüler endoplazmik retikülömlardan oluşan topluluklar olduğu görüldü. Nöron sitoplazması içerisinde ayrıca lizozomlar da bulunmaktaydı. Bunların yanında, sitoplazmasında ayrıca yaygın olarak nörotübül ve nörofilamanlar bulunmaktaydı. Nörotübül ve nörofilamanların akson ve dendritler içerisine doğru uzandıkları görülmekteydi (Şekil 9). Spinal kord gri ve beyaz cevherinde yerleşen nöroglia hücrelerinin genellikle sferikal veya ovoid bir çekirdeğe ve çekirdeği çevreleyen perinüklear ince bir sitoplazmik halkaya sahip oldukları görüldü. Miyelinli sinir liflerinde oligodendrositlerce yapılan miyelin kılıfın düzenli bir lamellar yapıya sahip olduğu izlendi. Akson sitoplazmalarında, mitokondriyonlar, bir kaç nörotübül ve nörofilamanlar dikkati çekti. Kan damarları hem gri hem de beyaz cevherde yaygın bir şekilde bulunmaktaydı (Şekil 10).



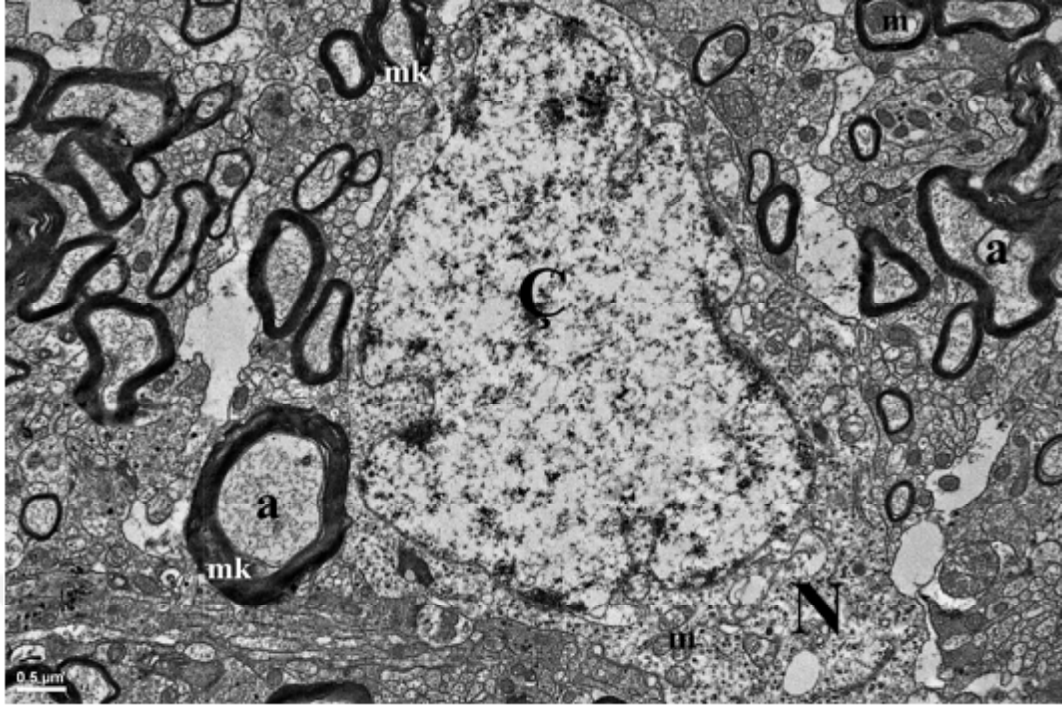
Şekil 9. Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Nöron perikaryonunun çekirdek (Ç) ve sitoplazmasıyla tamamen normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Sitoplazmada normal yapıda endoplazmik retikülüm, golgi apparatus (ga), mitokondriyonlar (m) ve lizozomlar (L) izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Bar= 1 µm.



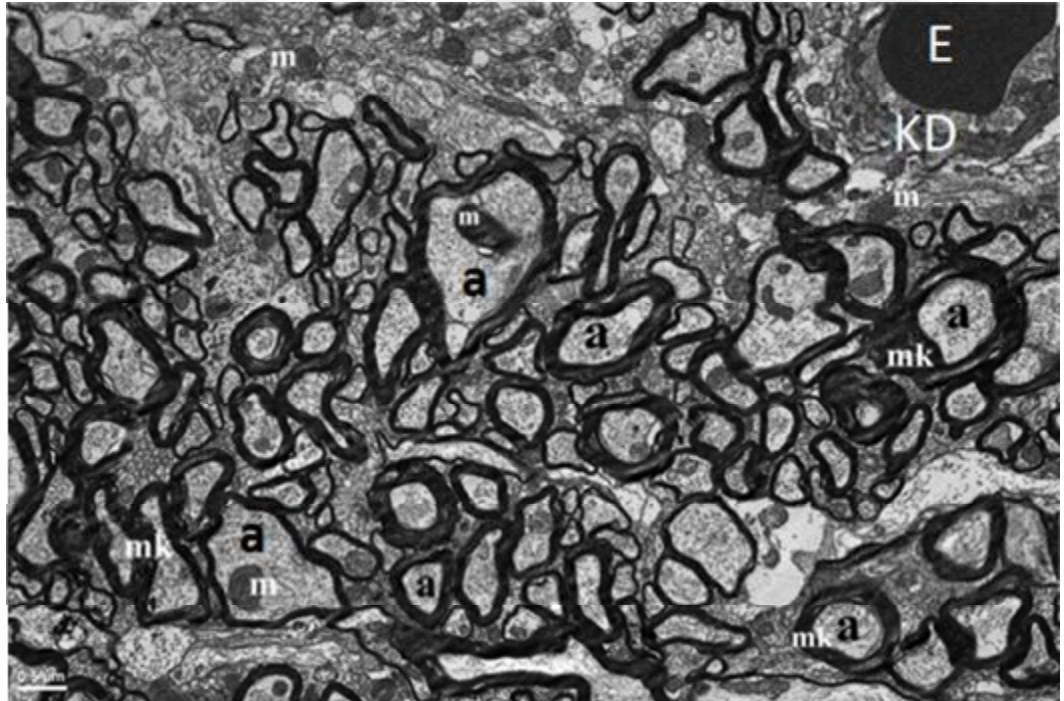
Şekil 10. Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan oligodendrositte (OD), çekirdek (Ç) ve sitoplazmanın normal olduğu, miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfın (mk) normal histolojik yapıda olduğu izlenmektedir. Kapiller damar (KD) ve eritrositler (E) gösterilmiştir. Bar= 2 µm.

4.2.2. Sham operasyon grubu

Spinal kord yaralanması oluşturulmayan, yalnızca laminektomi oluşturulan bu gruba ait deneklerde, spinal kord doku örnekleri 1, 3, 7 ve 14. günlerde elde edilerek, elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu grupta spinal kord ince yapısının kontrol grubuna benzer şekilde, normal yapıda olduğu dikkati çekti. Spinal kord gri cevherindeki nöron perikaryonlarının sferikal, merkezi yerleşimli veziküler bir çekirdek ve çekirdeğin ortasında çekirdekçiğe sahip olduğu görüldü. Çekirdek etrafında bulunan sitoplazmada iyi gelişmiş GER, transvers ve longitudinal tipte kristallara sahip mitokondriyonlar, nörotübüller ve nörofilamanların bulunduğu görüldü. Nöroglia hücrelerinin de ovoid veya sferikal bir çekirdeğe ve çekirdek etrafında ince bir sitoplazmaya sahip oldukları izlendi. Sitoplazmada mitokondriyonlar, GER ve mikrotübüllerin varlığına rastlandı (Şekil 11). Miyelinli akson sitoplazması ve miyelin kılıf, lameller yapı ve konsantrik düzenlenmesi intakt görünümdeydi. Laminektomi oluşturulan ve spinal kord doku örneklerinin 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınan gruplarda benzer elektron mikroskopik bulgular elde edildi. Bu grupta da gri cevherde yer alan nöronların, gliya hücrelerin ve sinir liflerinin normal yapıda oldukları, beyaz cevherde bulunan gliya hücreleri ile miyelinli ve miyelinsiz sinir liflerinin ince yapılarının korunduğu gözlemlendi (Şekil 12).



Şekil 11. Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Sinir hücresi perikaryonunun çekirdek (Ç) ve sitoplazmasının normal histolojik yapıda olduğu görülmektedir. Miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfı (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Bar= 0,5 µm.

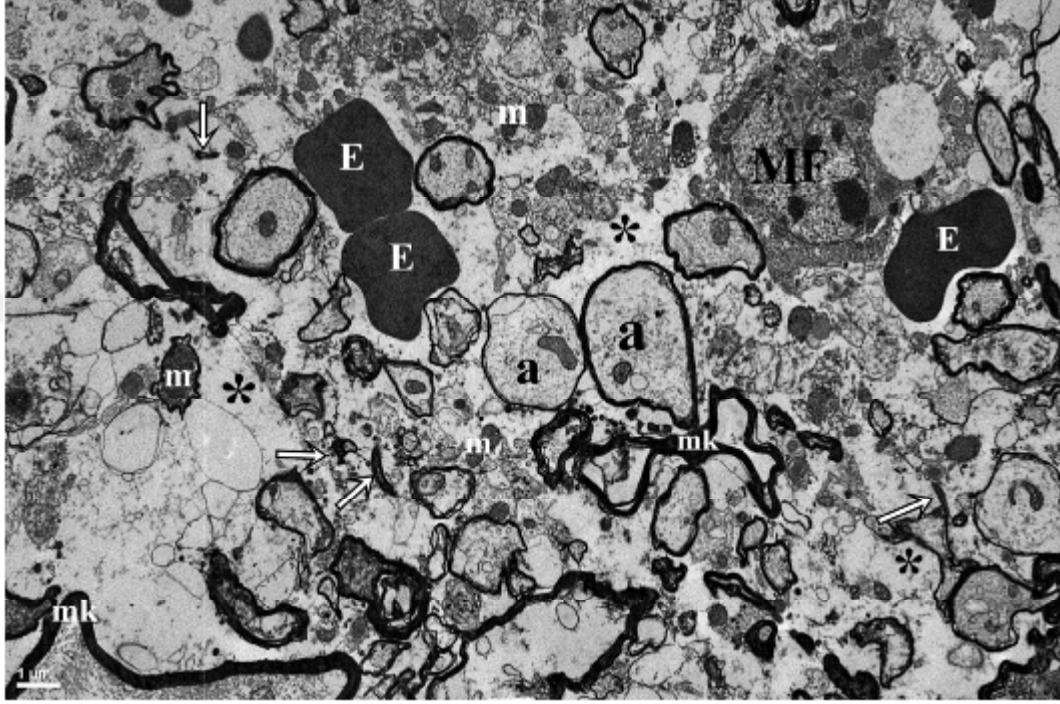


Şekil 12. Sham operasyon grubundan alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde akson (a) ve miyelin kılıfı (mk) normal yapıda olduğu görülmektedir. Kapiller damar (KD) ve içerisinde eritrosit (E) izlenmektedir Bar= 0,5 µm.

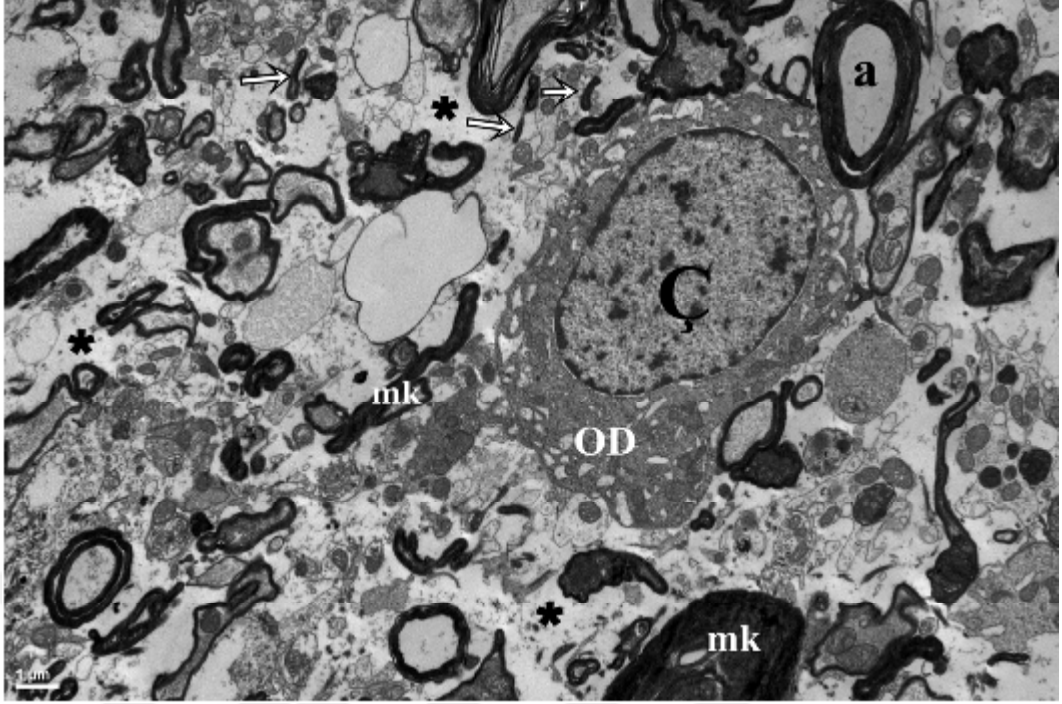
4.2.3. Deney Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanması sonrasında tedavi uygulanmayan deney kontrol grubundaki deneklerden 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınan spinal kord doku örnekleri elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. 1 gün sonra alınan doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde spinal kordda gri ve beyaz cevherde yaygın ödem ve hemorajik alanların varlığı gözlemlendi. Beyaz cevherde yaygın ödematöz alanların yanında özellikle kan damarlarının yakın çevresinde hemorajik alanların varlığı dikkati çekti. Nöron perikaryonlarında çekirdekte heterokromatin artışı, sitoplazmada granüler endoplazmik retikülüm sisternalarında genişleme ve vakuolizasyon, mitokondriyonlarda genişleme, kristalarında bozulma ve düzensizlikler, lizozomlarda artış tespit edildi. Bunların yanında gliya hücrelerinde de çekirdek ve sitoplazmik organellerde ultrastrüktürel değişiklikler görüldü. Bu grupta özellikle beyaz cevherde meydana gelen dejeneratif değişiklikler belirgindi. Miyelinli sinir liflerinde miyelin lamellerinin normal organizasyonunda bozulma, miyelin kılıf lamellerin aksonal zon içerisine invagine olduğu, bazı sinir liflerinde ise sinir yüzeyine doğru evagine olduğu, akson içerisinde mitokondriyonlarda belirgin olmak üzere organel harabiyetinin olduğu belirlendi. Hem gri cevherde hem de beyaz cevherde özellikle oligodendrositlerde çekirdekte kromatin kümelenmesi, sitoplazmada vakuolizasyon ve organel harabiyetlerinin olduğu dikkati çekti. Spinal kord travmasından sonra yaralanma alanına hızla gelen enflamatuvar hücrelerin miktarında artış olduğu, bu kapsamda makrofajlar, lökositler ve mikrogliaların yaygın olarak bulunduğu dikkati çekti (Şekil 13). Yaralanma sonrası 3. günde alınan doku örneklerinin elektron mikroskopisinde de 1 günlük deney kontrol grubunda olduğu gibi spinal kordda yaygın ultrastrüktürel değişikliklere rastlandı. Bu grupta da çoğu alanda ödem ve hemorajinin varlığı dikkati çekti. Gri cevherde bulunan nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde çekirdekte kromatin artışı, sitoplazmada organel harabiyeti, miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf harabiyeti ile aksoplazmada organellerde yapısal bozukluklar gözlenen bulguları (Şekil 14). Yaralanma sonrası 7. günde alınan doku örneklerinin elektron mikroskop incelemelerinde nöronlarda yapısal değişiklikler, aksonlarda büzüşme, organel harabiyeti ile miyelin kılıf lamellerinde ayrılımlar görüldü (Şekil 15 ve 16). Yaralanma sonrası 14. günde alınan doku örneklerinin elektron mikroskop incelemelerinde diğer gruplara göre, ödem ve hemorajik alanların azalmış olduğu görüldü. Bunun yanında nöron hücre

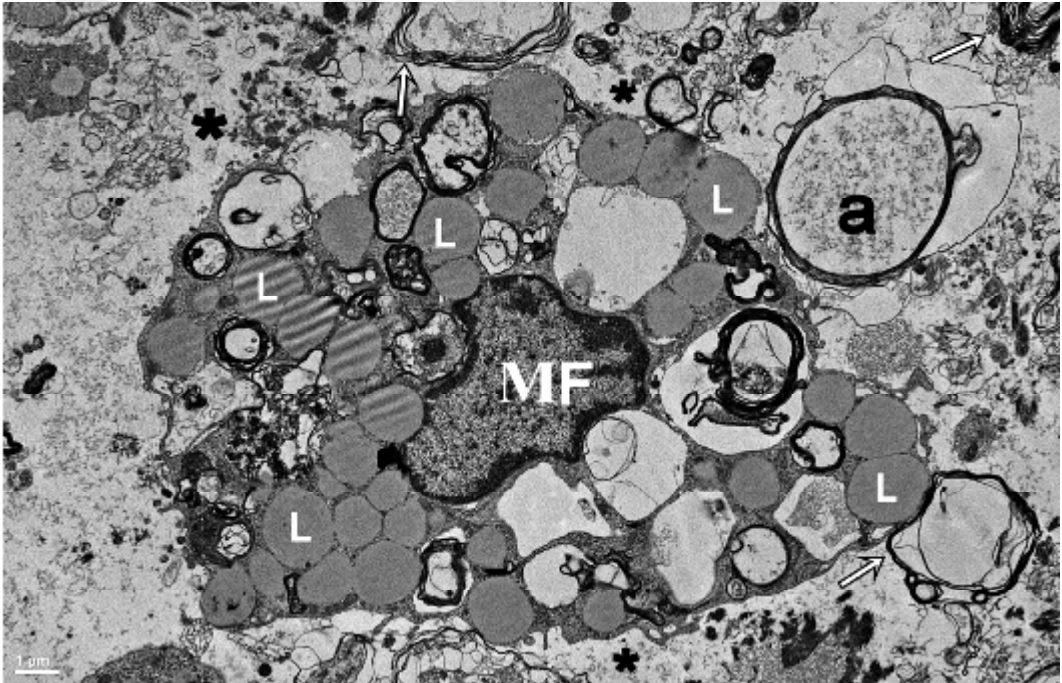
perikaryonlarında çekirdekte heterokromatin miktarı artışı ve sitoplazmik vakuolizasyon izlendi. Gliya hücrelerinde de çekirdek ve sitoplazmik organellerde ultrastrüktürel değişiklikler görüldü. Beyaz cevherde bulunan miyelinli sinir liflerinde akson ve miyelin kılıfı içeren yapısal değişiklikler izlendi (Şekil 17).



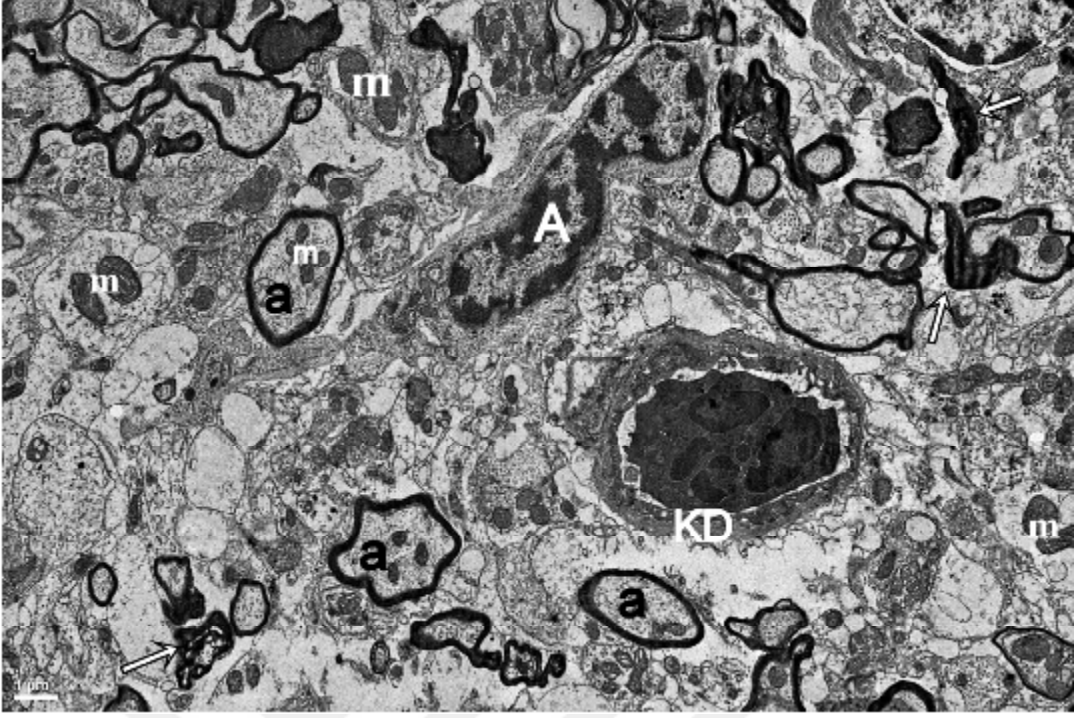
Şekil 13. Deney kontrol grubundan 1. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Yaralanma alanında yaygın ödem (*) ve hemorajik alanların varlığı izlenmektedir. Ortamda eritrositler (E) ile enflamatuvar hücrelerden makrofajların (MF) bulunduğu dikkati çekmektedir. Ayrıca bu alanda ileri derecede dejenere olan sinir liflerine ait miyelin kılıf artıklarının varlığı da (oklar) dikkati çekmektedir. Bar= 1 µm.



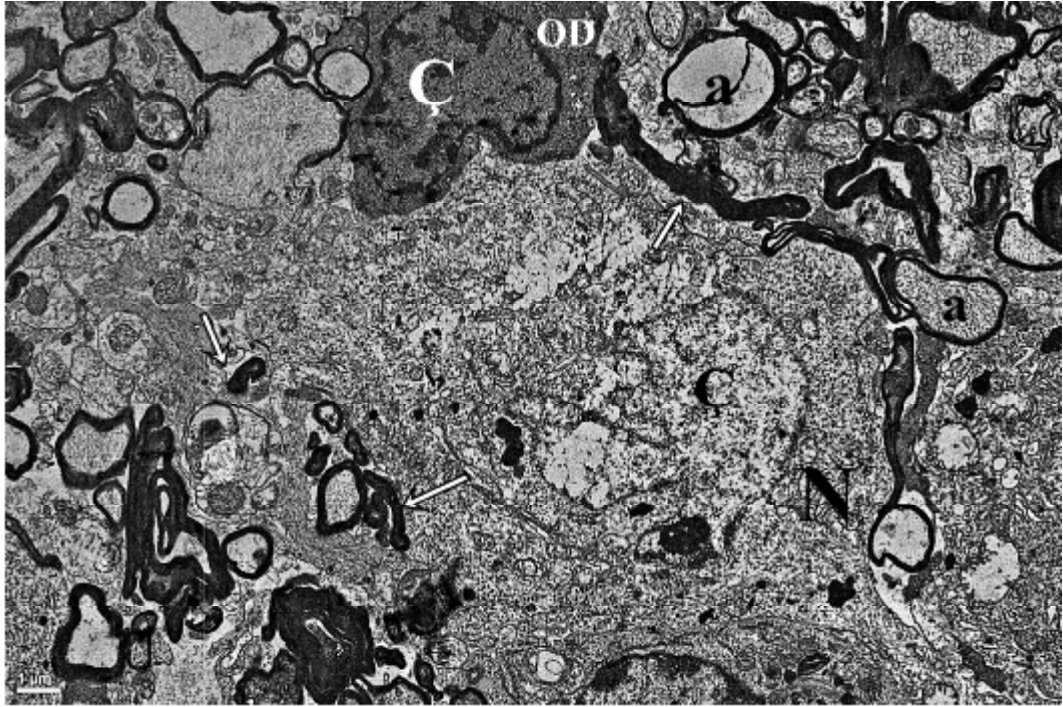
Şekil 14. Deney kontrol grubundan 3. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan oligodendrosit (OD) çekirdeğinde kromatin artışı ve organel harabiyetlerinin varlığı dikkati çekmektedir. Miyelinli sinir liflerinde şiddetli akson (a) ve miyelin kılıf (mk) harabiyetlerinin (oklar) varlığı görülmektedir. Ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 1µm



Şekil 15. Deney kontrol grubundan 7. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde ileri derecede sinir lifi harabiyetinin (oklar) varlığı dikkati çekmektedir. Dejenerasyona uğrayan sinir liflerini fagosite eden enflamatuvar hücrelerden makrofajların (MF) varlığı ve lipid damlacıkları (L) dikkati çekmektedir. Ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 1 µm.



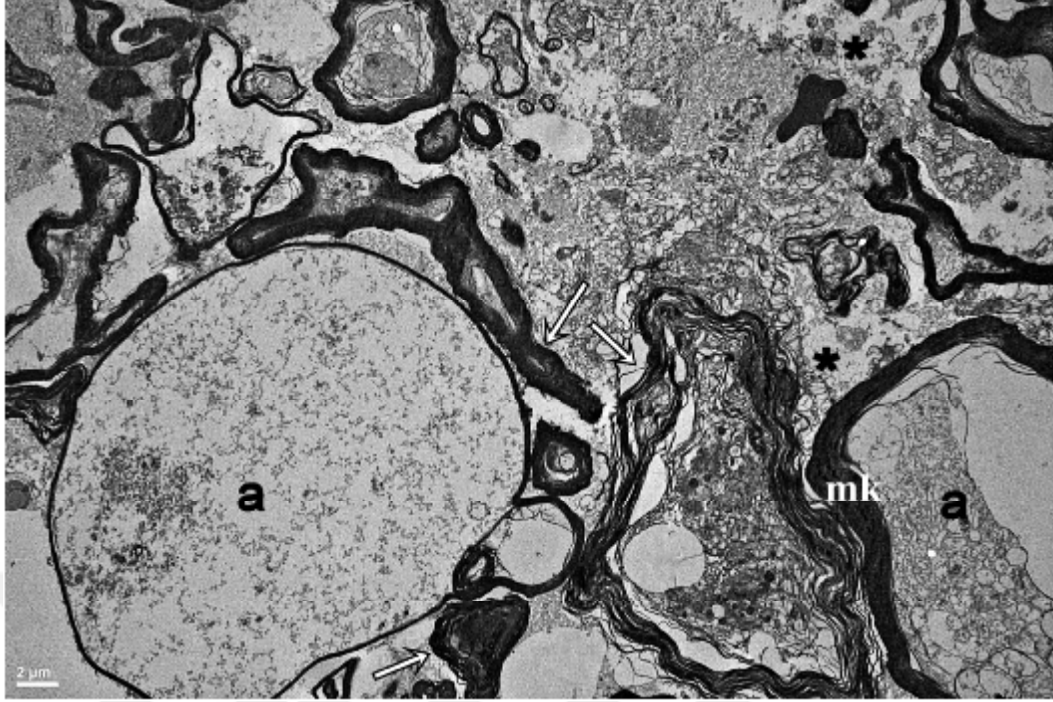
Şekil 16. Deney kontrol grubundan 7. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan astrositte (A) çekirdekte kromatin artışı, miyelinli sinir liflerinde aksonlarda büzüşme, miyelin lamellerinde ayrışmaların (oklar) olduğu görülmektedir. Ödem alanları (*) ve kapiller damar (KD) gösterilmiştir. Bar= 1 μ m.



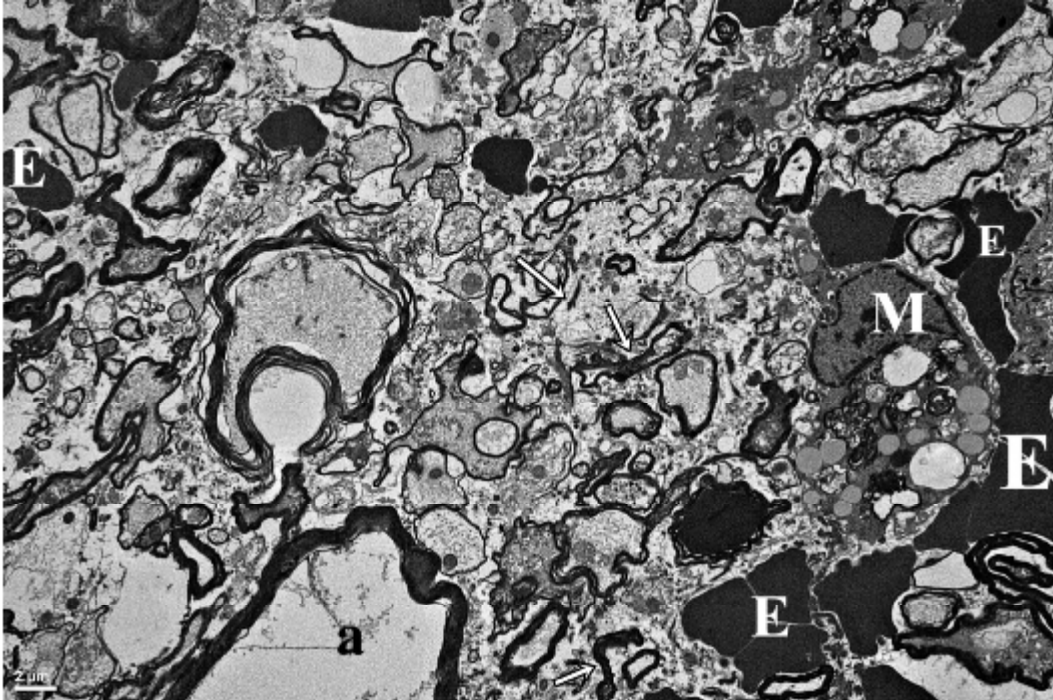
Şekil 17. Deney kontrol grubundan 14. gün alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde aksonlarda (a) büzüşme, miyelin kılıfta (mk), miyelin lamellerinde ayrışma ve dejenerasyon (oklar) dikkati çekmektedir. Nöron perkaryonunda (N) dejenerasyon ve organel harabiyeti görülmektedir. Oligodendrosit (OD) çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı izlenmektedir. Bar= 1 μ m.

4.2.4. Metilprednizolon tedavisi uygulanan grup

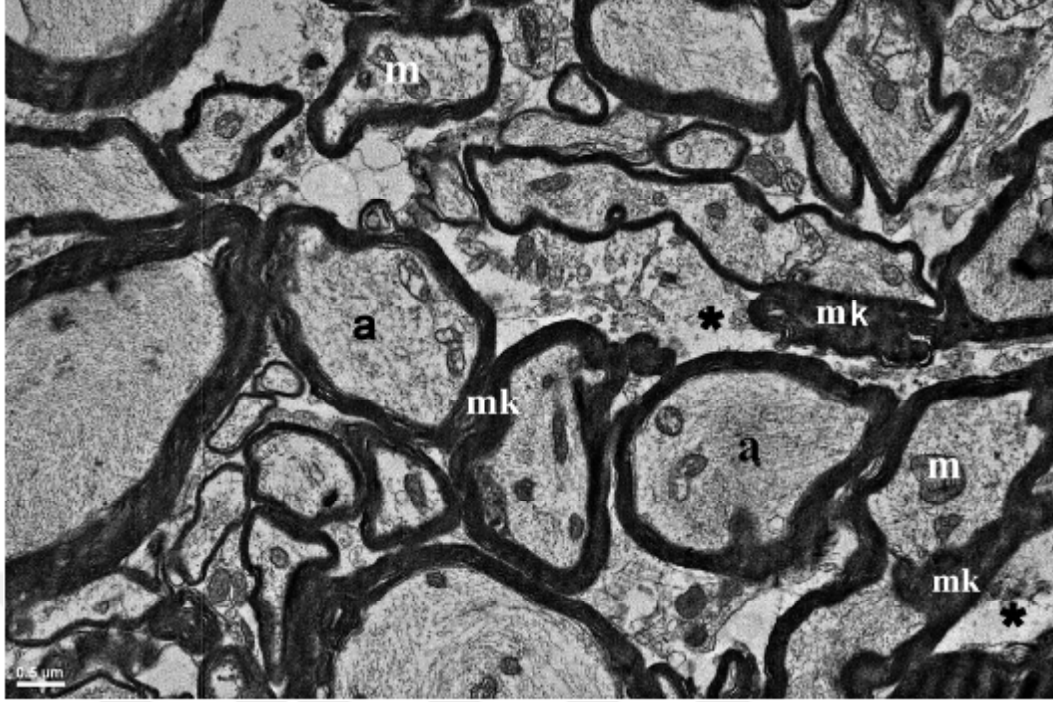
Deneyssel spinal kord yaralanmasından sonra metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan doku örnekleri 1, 3, 7 ve 14. günlerde elektron mikroskopik olarak incelenmeleri amacıyla elde edilmiştir. 1. günde alınan spinal kord dokularının incelenmesinde, ultrastrüktürel değişikliklerin deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta nispeten azalmış olduğu dikkati çekti. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde ödem ve hemorajik alanlar bu grupta da görülmesine rağmen, bu alanların tedavi uygulanmayan gruba göre daha sınırlı olduğu görüldü. Gri cevherde bulunan nöronlarda görülen dejeneratif değişikliklerin olduğu ancak hücresel bütünlüğün daha iyi korunduğu dikkati çekti. Nöron çekirdeğinde kromatin kümelenmelerinin varlığı ve sitoplazmik organellerin yapılarında dejenerasyonlar izlendi. Nöron sitoplazmalarında mitokondriyonlarında genişleme ve kristallerinde kısmen parçalanma ile lizozomlarda artış dikkat çekmekteydi. Hem gri hem de beyaz cevherde yer alan nöroglia hücrelerinde yapısal değişiklikler izlendi. Beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde dejenerasyon ve miyelin kılıf harabiyeti görülmesine rağmen, dejeneratif değişikliklerin daha sınırlı olduğu dikkati çekti (Şekil 18). Tedaviden 3 gün sonra alınan spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde de 1 günlük gruba benzer yapısal değişikliklerin varlığı izlendi. Nöron perikaryonlarında ödem, büzüşme gibi dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte, deney kontrol grubuna oranla ultrastrüktürel değişikliklerin nispeten azaldığı dikkati çekti. Miyelinli sinir liflerinde, miyelin kılıfın tipik konsantrik lamellar yapısının bozulduğu ve akson içerisine doğru miyelin kılıf invajinasyonlarının olduğu görüldü (Şekil 19). Tedaviden 7 gün sonra alınan spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde yapısal bütünlük bu grupta 3 günlük gruba göre daha belirgindi. Ödematöz ve hemorajik alanlar çok daha sınırlı olarak izlendi. Nöronlarda bazı alanlarda yapısal değişiklikler görülsede çoğu alanda hücrelerde çekirdek ve sitoplazmik yapıların korunduğu görüldü (Şekil 20). Tedaviden 14 gün sonra alınan spinal kord doku örneklerinin elektron mikroskopik incelenmesinde miyelin kılıf lamelleri arasında travmaya bağlı açılmalar ve kopma bölgeleri yanında miyelinli sinir liflerinde düzenli miyelin kılıf yapısı da görüldü. Deney kontrol 14. günle kıyaslandığında özellikle nöronlarda ve gliya hücrelerinde çekirdek ve sitoplazmik organellerin ince yapısının korunduğu görüldü. Metilprednizolon tedavisinin aynı zamanda yaralanma bölgesinde makrofajlar, mikrogialar ve lökositlerin proliferasyon ve infiltrasyonunu azalttığı da dikkati çekti (Şekil 21 ve 22).



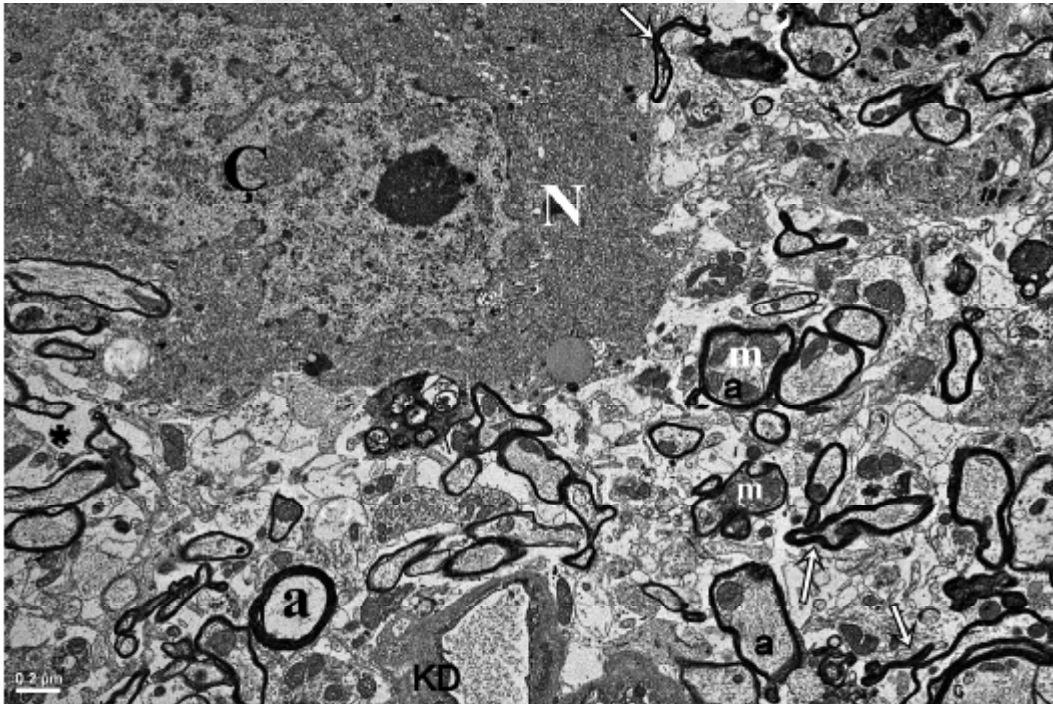
Şekil 18. Metilprednizolon grubundan 1. günde alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan aksonlarda (a) büzüşme ve miyelin kılıf (mk) harabiyetlerinin varlığı izlenmektedir. Ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 2 µm.



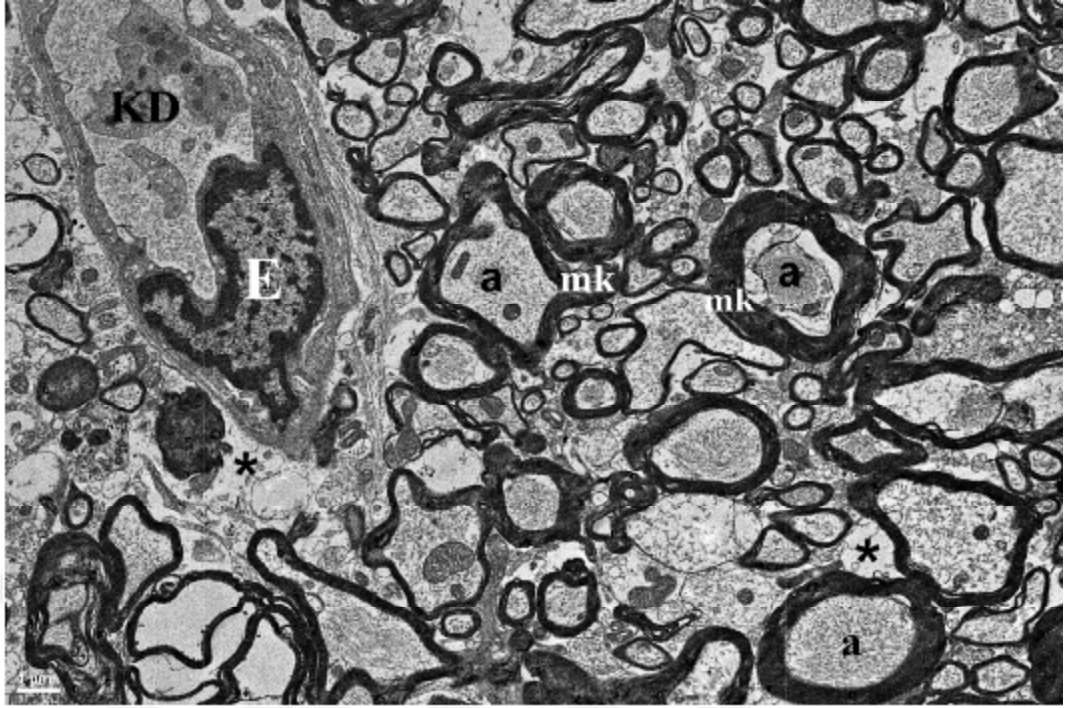
Şekil 19. Metilprednizolon grubundan 3. günde alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde ileri derecede sinir lifi harabiyetinin (oklar) varlığı dikkati çekmektedir. Dejenerasyona uğrayan sinir liflerini fagosite eden enflamatuvar hücrelerden makrofajların (M) varlığı dikkati çekmektedir. Eritrosit (E) ve ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 2 µm.



Şekil 20. Metilprednizolon grubundan 7. günde alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Beyaz cevherde yer alan aksonlarda (a) büzüşme ve miyelin kılıf (mk) harabiyetlerinin varlığı izlenmektedir. Ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 0,5 µm.



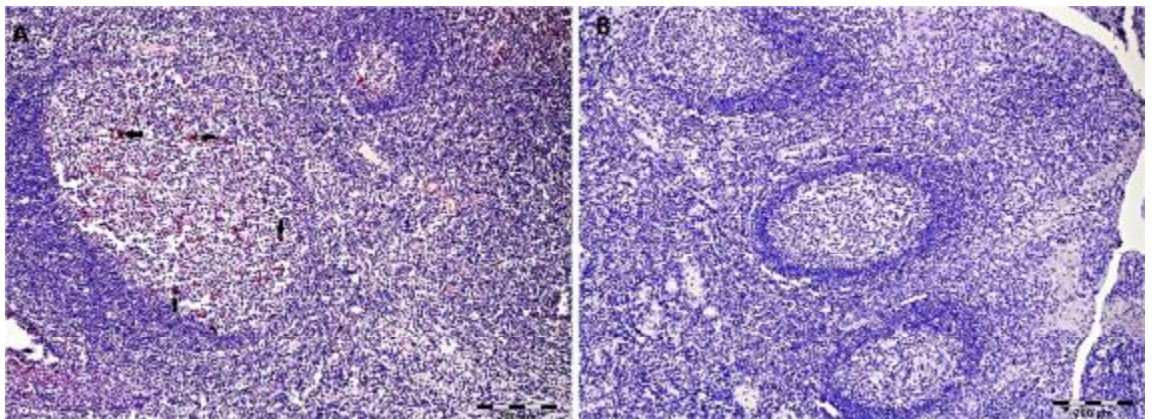
Şekil 21. Metilprednizolon grubundan 14. günde alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Gri cevherde yer alan nöron çekirdeğinde (Ç) kromatin artışı izlenmektedir. Miyelinli sinir liflerinde hafiften orta dereceye kadar değişen akson (a) ve miyelin kılıf (mk) değişiklikleri görülmektedir. Sinir liflerinin bazılarında miyelin kılıf lamellerinde dejenerasyon (oklar) izlenmektedir. Ortamda hafif ödem alanları (*) ve kapiller damar (KD) gösterilmiştir. Bar= 0,2 µm.



Şekil 22. Metilprednizolon grubundan 14. günde alınan spinal kord dokusunun elektron mikroskopik görünümü. Miyelinli sinir liflerinin bazılarında miyelin kılıfta değişiklikler (oklar) gözlenmektedir. Kapiller damar (KD), endotel hücre çekirdeği (E) ve ödem alanları (*) gösterilmiştir. Bar= 1 μ m.

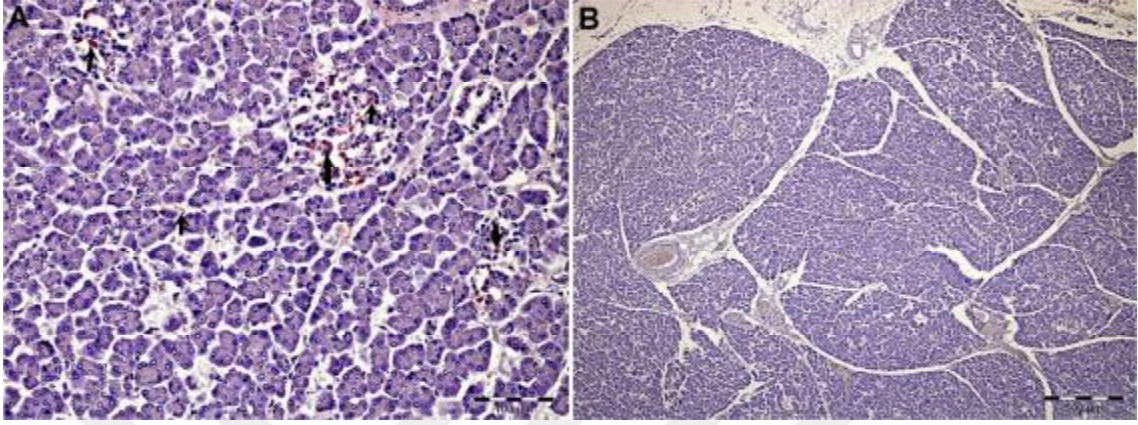
4.3. İmmunohistokimya Bulguları

Tonsilla palatinadan elde edilen biyopsi örnekleri TNF- α immünoaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak (Şekil 23A), primer antikor damlatılmayan doku kesitleri ise negatif kontrol amacıyla boyandı (Şekil 23B).



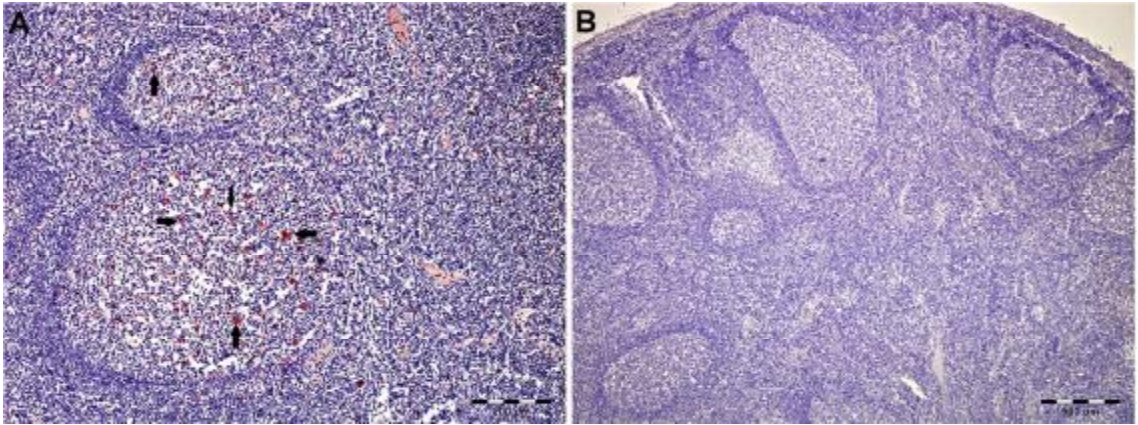
Şekil 23. TNF- α immünoaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Tonsilla palatinada lenf foliküllerinde özellikle germinal merkezde belirgin olmak üzere TNF- α immünoaktivitesi görülmektedir (Oklar). Bar= 200 μ m. B) Negatif kontrol. Tonsilla palatinada TNF- α immünoaktivitesi görülmemektedir. Bar= 200 μ m

İnsan pankreas bezinden alınan biyopsi örnekleri IL-6 immünoaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak (Şekil 24A), primer antikor damlatılmayan doku kesiti de negatif kontrol amacıyla boyandı (Şekil 24B).



Şekil 24. IL-6 immünoaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Pankreas dokusunda özellikle adacıklarda ve ekzokrin pankreas asinuslar çevresinde IL-6 immünoaktivitesi izlenmektedir (Oklar). Bar= 100 µm. B) Negatif kontrol. IL-6 için, primer antikor damlatılmamış pankreas doku kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar= 500 µm.

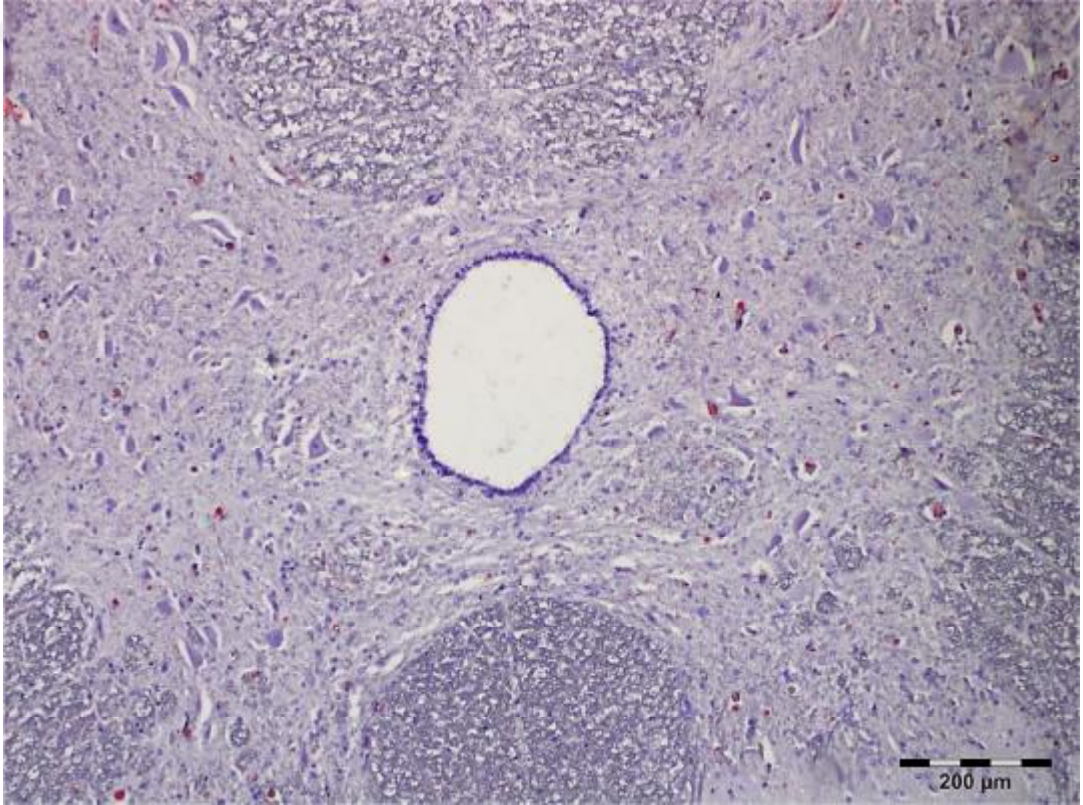
Kaspaz-3 immünoaktivitesinin gösterilmesi amacıyla pozitif kontrol olarak lenf düğümü dokusu kullanılmıştır (Şekil 25A). Ayrıca primer antikor damlatılmayan lenf düğümü kesiti negatif kontrol amacıyla boyanmıştır (Şekil 25B).



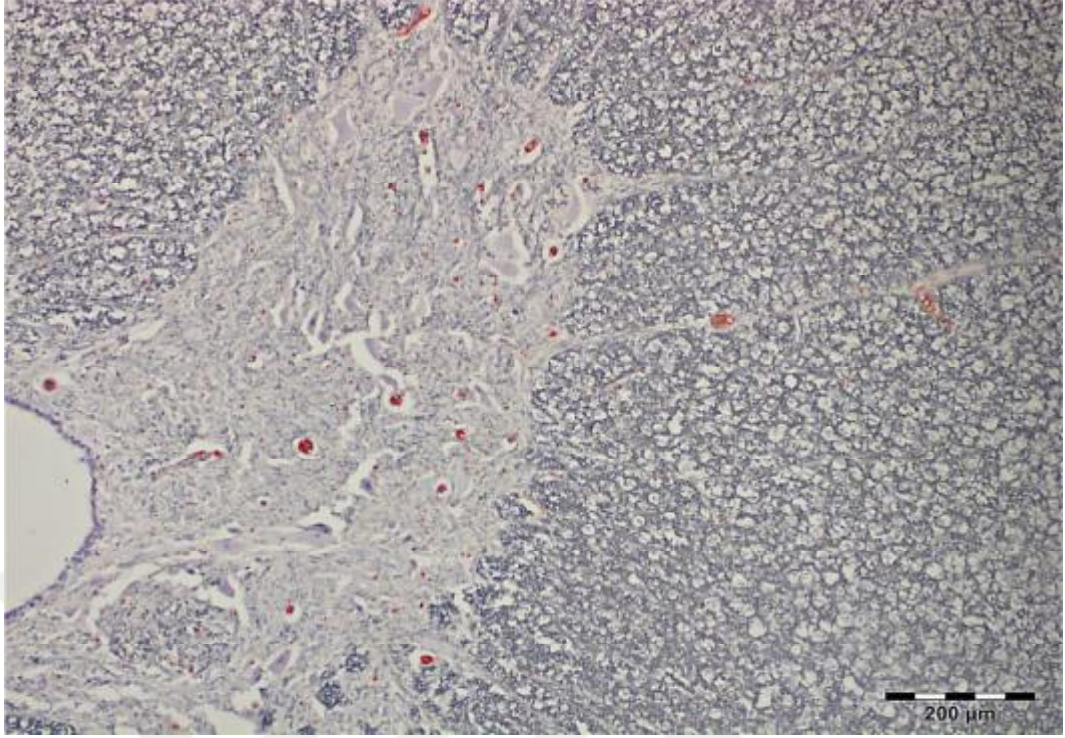
Şekil 25. Kaspaz-3 immünoaktivitesi. A) Pozitif kontrol. Lenf düğümünde lenf nodülleri germinal merkezinde belirgin kaspaz-3 immünoaktivitesi görülmektedir (Oklar). Bar= 200 µm. B) Negatif kontrol. Kaspaz-3 için, primer antikor damlatılmamış lenf düğümü doku kesitinde herhangi bir işaretlemenin olmadığı görülmektedir. Bar= 200 µm

4.3.1. Kontrol grubu

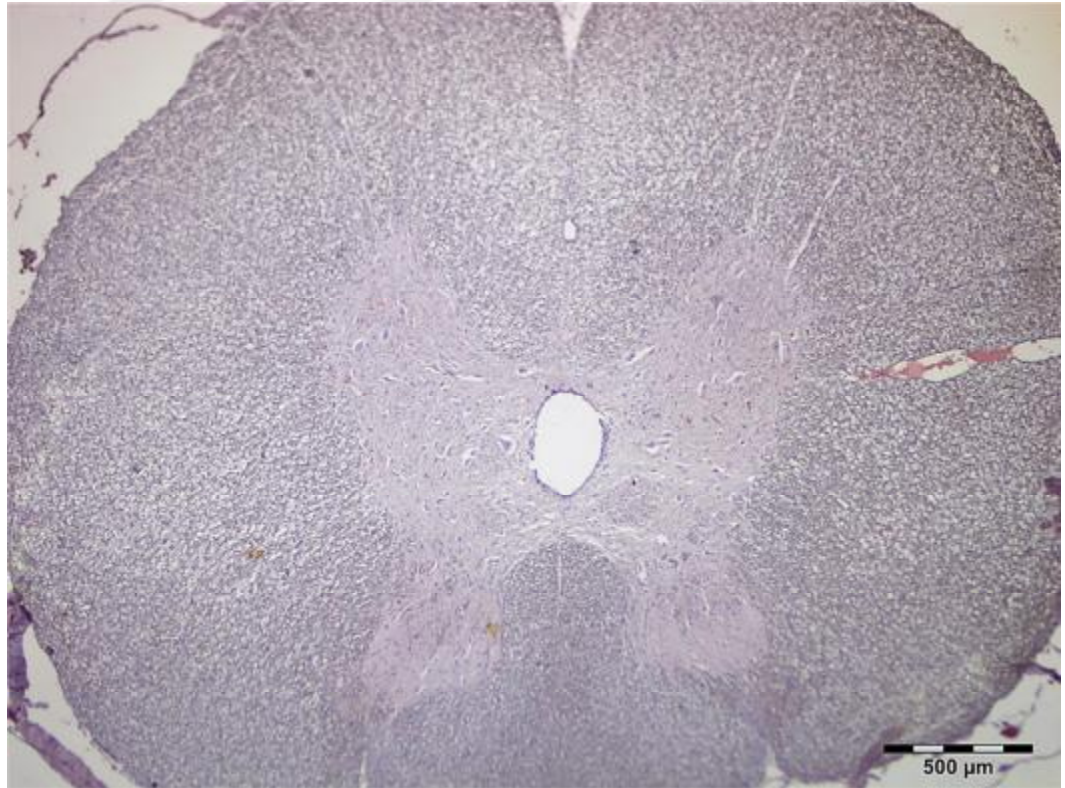
Herhangi bir cerrahi işlem uygulanmayan tamamen sağlam deneklerden elde edilen spinal kord doku örneklerinde TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarını araştırmak amacıyla immunohistokimyasal yöntemler uygulandı. Spinal kord kesitlerinde gri cevherde yerleşen sinir hücre perikaryonları ile hem gri hem de beyaz cevherde bulunan gliya hücre sitoplazmaları ve sinir liflerinde her üç sitokinin de çok zayıf miktarlarda eksprese olduğu görüldü. Kan damarlarının duvarlarını döşeyen endotel hücrelerinde de TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonunun minimal düzeyde olduğu izlendi (Şekil 26, 27 ve 28).



Şekil 26. Kontrol grubunda TNF- α immunoreaktivitesi. Spinal kord dokusunda TNF- α immunoreaktivitesinin bazı gliya hücreleri ve kapiller damar endotel hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 200 μ m.



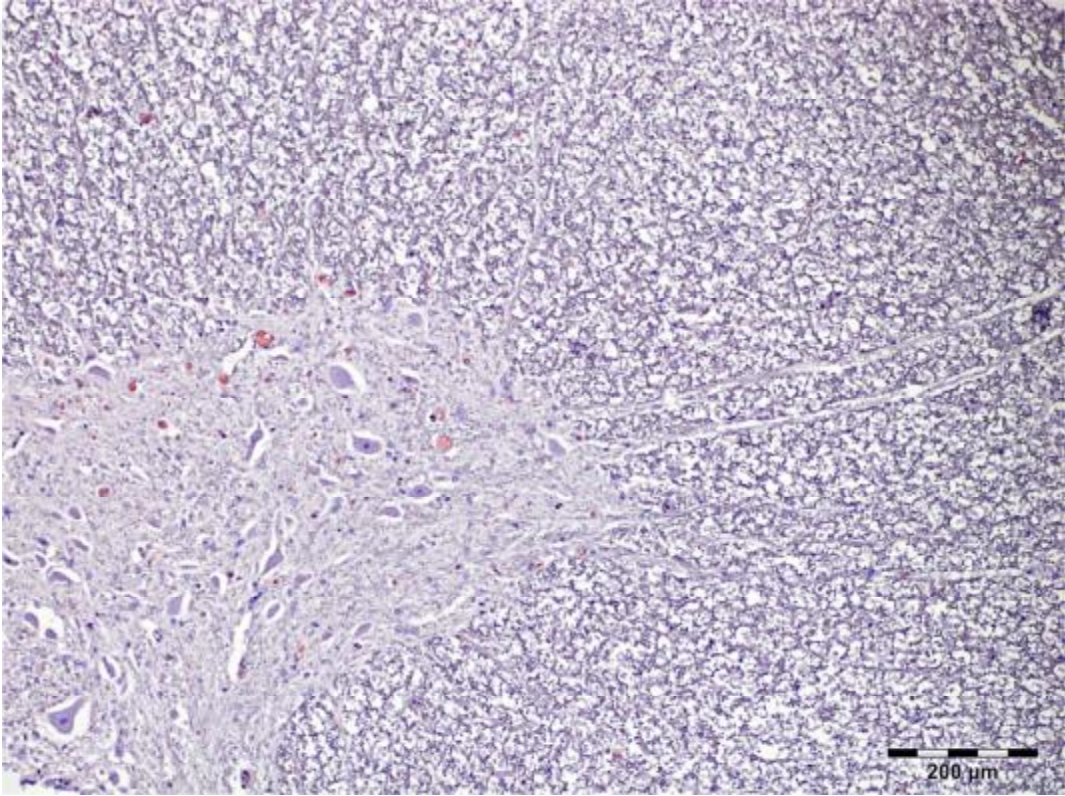
Şekil 27. Kontrol grubunda IL-6 immunoreaktivitesi. Kontrol grubundan alınan spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin kapiller damar endotel hücrelerinde ve bazı gliya hücrelerinde çok az düzeyde olduğu izlenmektedir. Bar= 200 µm.



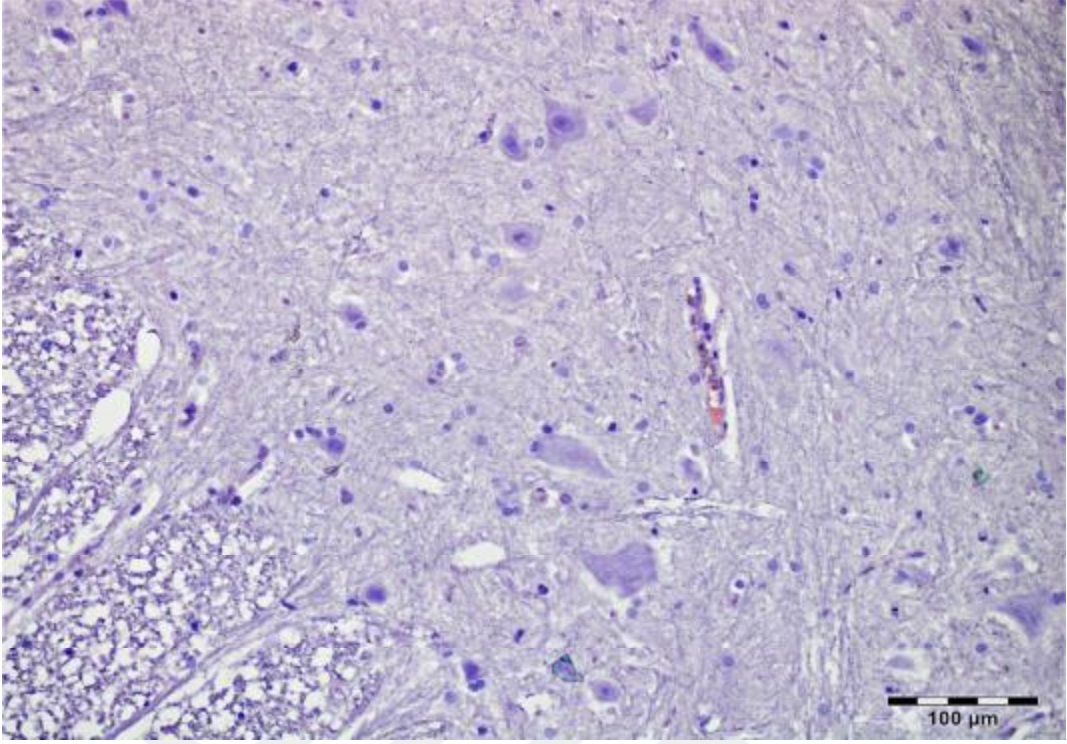
Şekil 28. Kontrol grubunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi. Spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesinin gliya hücreleri ve kapiller damar endotel hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 500 µm.

4.3.2. Sham operasyonu grubu

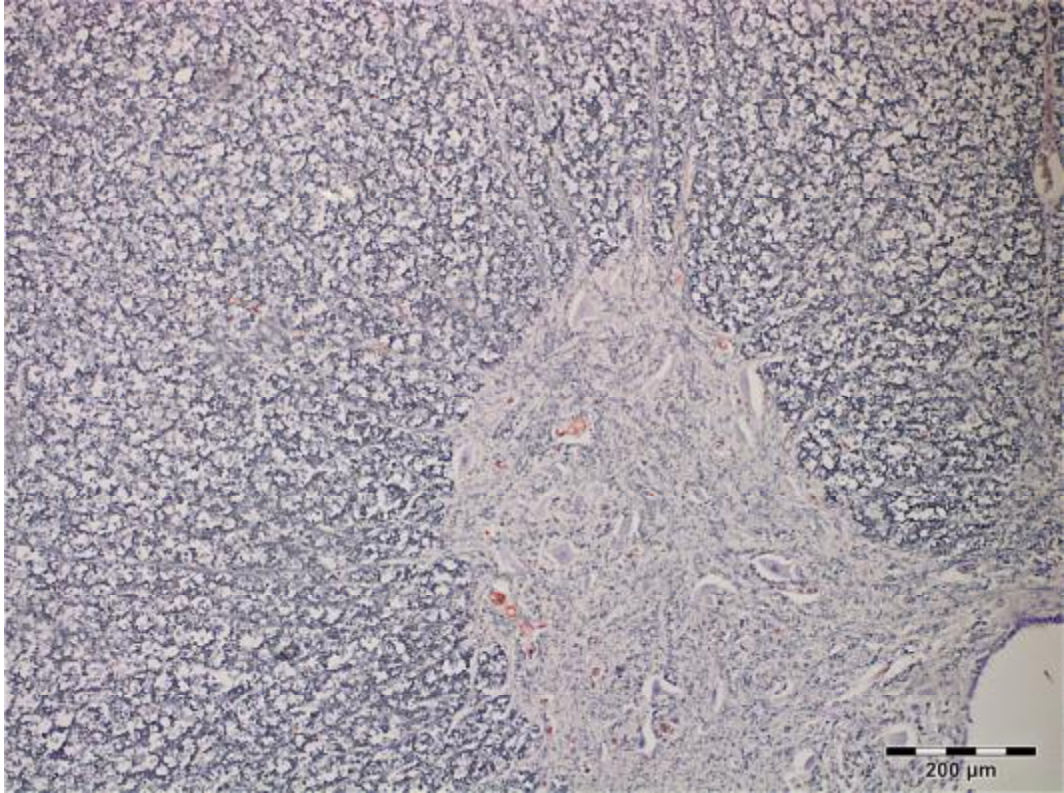
Spinal kord yaralanmasına maruz bırakılmayıp sadece laminektomi uygulanan bu gruba ait spinal kord doku örnekleri, 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınarak, TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının gösterilmesi amacıyla immunohistokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının, kontrol grubuna benzer şekilde, minimal düzeyde olduğu gözlemlendi. Sinir hücre perikaryonlarında, gliya hücreleri, sinir lifleri ve kan damarlarının duvarlarını döşeyen endotel hücrelerinin sitoplazmalarında sitokin ekspresyonlarının çok düşük düzeyde olduğu belirlendi (Şekil 29, 30 ve 31).



Şekil 29. Sham operasyon grubunda TNF- α immunoreaktivitesi. Spinal kord dokusunda TNF- α immunoreaktivitesinin gri ve beyaz cevherde yerleşen gliya hücrelerinin sitoplazmalarında minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 200 μ m.



Şekil 30. Sham operasyon grubunda IL-6 immunoreaktivitesi. Spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesinin gri ve beyaz cevherde bulunan kapiller damar endotel hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.



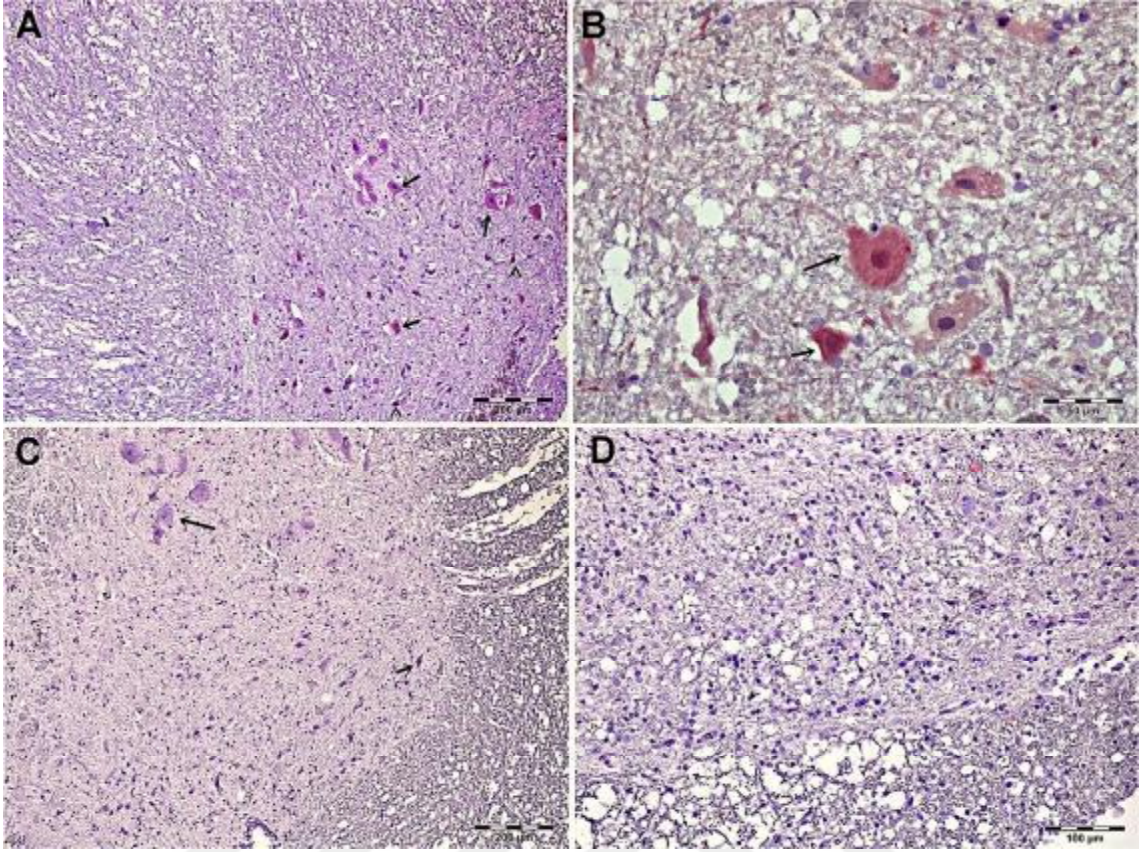
Şekil 31. Sham operasyon grubunda kaspaz- 3 immunoreaktivitesi. Spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi bazı gliya hücrelerinde ve kapiller damar endotel hücrelerinde zayıf olarak izlenmektedir. Bar= 200 µm.

4.3.3. Deney Kontrol Grubu

Spinal kord yaralanmasından sonra sadece serum fizyolojik verilen bu gruba ait deneklerden, 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınan doku örneklerinde, TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildi.

4.3.3.1. TNF- α immünoreaktivitesi

Deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularında TNF- α ekspresyonu 1. günde özellikle nöron perikaryonlarında ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında TNF- α ekspresyonun belirgin olarak artış gösterdiği dikkati çekti (Şekil 32A). Aynı gruptan 3. günde alınan spinal kord dokularının immunohistokimyasal olarak incelenmesinde, TNF- α ekspresyonunun şiddetli dejenerasyona uğrayan gri cevher bölgelerinde yaygın olduğu dikkati çekti. Bu grupta nöron perikaryonlarında, gliya hücrelerinin sitoplazmalarında ve sinir liflerinde TNF- α ekspresyonunun varlığı tespit edildi (Şekil 32B). Aynı gruptan 7. günde alınan spinal kord dokularının immunohistokimyasal incelenmesinde, TNF- α ekspresyonunun deney 1 ve deney 3. güne göre oldukça azaldığı görüldü (Şekil 32C). Yaralanma sonrası 14. günde alınan spinal kord dokularında, TNF- α ekspresyonunun nöron perikaryonlarında çok zayıf olduğu görüldü. Bununla birlikte, gliya hücrelerinde ve infiltre olan hücrelerde TNF- α ekspresyonunun belirgin olduğu dikkati çekti (Şekil 32D).

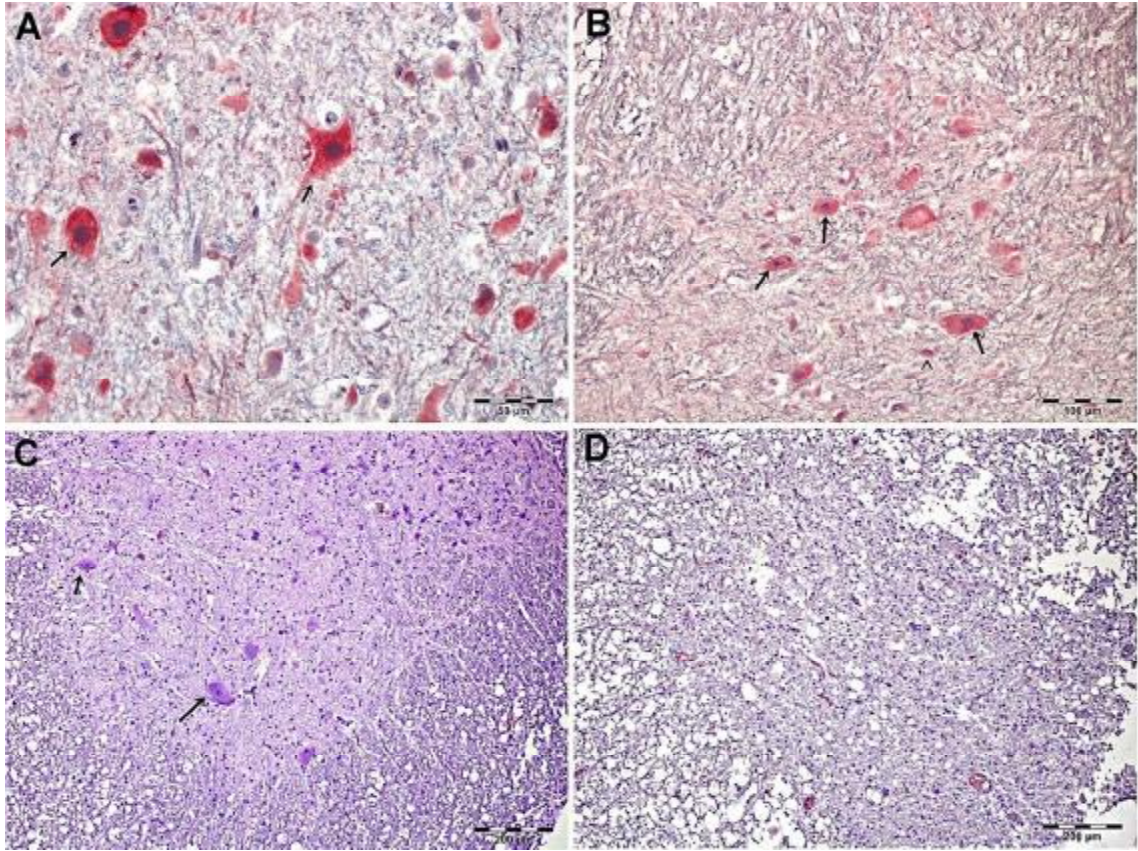


Şekil 32. Deney kontrol grubu TNF- α immünoreaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoreaktivitesi. TNF- α immünoreaktivitesinin, gri cevherdeki nöron perikaryonları (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başları) yoğun olduğu izlenmektedir. Bar= 200 μ m. B) 3. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoreaktivitesi. TNF- α immünoreaktivitesi nöron perikaryonları (oklar) ve bazı sinir liflerinde (ok başları) yoğun olduğu görülmektedir. Bar= 50 μ m. C) 7. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoreaktivitesi. TNF- α immünoreaktivitesi nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde çok zayıf olarak izlenmektedir. Bar= 200 μ m. D) 14. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoreaktivitesi. TNF- α immünoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 μ m.

4.3.3.2. IL-6 İmmünoreaktivitesi

Deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularının IL-6 ekspresyonunun 1. günde çok yoğun olduğu gözlemlendi. Nöron perikaryonlarında ve hem gri hem de beyaz cevherde yer alan sinir liflerinde IL-6 ekspresyonu izlendi. Dejenerasyonun şiddetli olduğu merkezi gri cevher bölgelerinde makrofajlar ve nötrofiller gibi enflamatuvar hücrelerde IL-6 için yoğun pozitif boyanmaların olduğu dikkati çekti (Şekil 33A). Aynı gruptan 3. günde alınan spinal kord dokularının IL-6 ekspresyonunun gri cevherdeki nöron ve gliya hücrelerinde, 1 günlük gruba benzer şekilde olduğu görüldü. Nöron perikaryonları, sinir lifleri ve gliya hücrelerinde, IL-6 ekspresyonu ayırt edilmekteydi. Hemoraji ve ödemin yoğun olduğu gri cevher bölgelerinde kan damarlarının duvarını

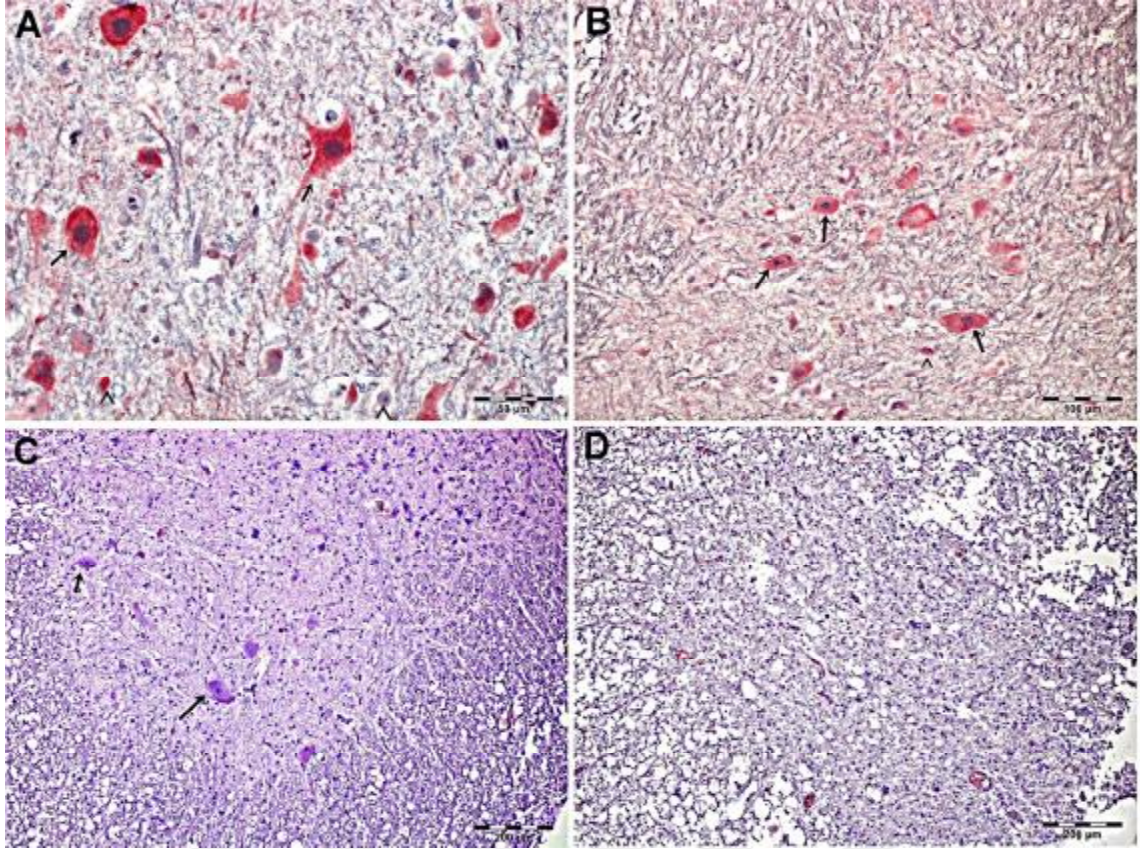
döşeyen endotel hücrelerinin de IL-6 için pozitif olduğu dikkati çekti (Şekil 33B). Aynı gruptan 7. günde alınan spinal kord dokularında IL-6 ekspresyonunun belirgin ölçüde azaldığı, sadece birkaç gliya hücresinde ve nöron perikaryonlarında ekspresyonun olduğu dikkat çekti (Şekil 33C). Yaralanma sonrası 14. günde alınan spinal kord dokularında IL-6 ekspresyonunun nöron perikaryonlarında çok zayıf olduğu, bununla birlikte gliya hücrelerinde ve infiltre hücrelerde işaretlenmenin kuvvetli olduğu dikkati çekti (Şekil 33D).



Şekil 33. Deney kontrol grubu IL-6 immunoreaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında artmış olduğu izlenmektedir. Bar= 50 µm. B) 3. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin özellikle nöron perikaryonları (oklar), gliya hücreleri (ok başları) ve dejenere sinir liflerinde yoğun olduğu izlenmektedir. Bar= 200 µm. C) 7. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) çok azaldığı görülmektedir. Bar= 50 µm. D) 14. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin yalnızca bazı nöron ve gliya hücreleri ile kapiller damarlarının duvarını döşeyen endotel hücrelerinde bulunduğu görülmektedir. Bar= 200 µm.

4.3.3.3. Kaspaz-3 İmmünoreaktivitesi

Deney kontrol grubuna ait spinal kord dokularında kaspaz-3 ekspresyonunun 1. günde özellikle nöron perikaryonlarında çok yoğun olduğu görüldü. Dejenerasyonun şiddetli olduğu gri cevher bölgelerinde nöronlarda ve gliya hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonunun belirgin olarak artış gösterdiği dikkati çekti (Şekil 34A). Diğer taraftan 3. günde alınan spinal kord dokularında da kaspaz-3 ekspresyonunun 1 günlük gruba kıyasla azalmış olduğu dikkati çekti. Bu grupta nöron perikaryonlarında ve gliya hücrelerinin sitoplazmalarında kaspaz-3 ekspresyonunun zayıf olarak ayırt edildi (Şekil 34B). 7. günde alınan spinal kord dokularında kaspaz-3 ekspresyonunun az sayıda gliya hücresinde belirgin olduğu, nöron perikaryonlarında ise işaretlenmenin çok zayıf olduğu dikkat çekti (Şekil 34C). Yaralanma sonrası 14. günde alınan spinal kord dokularında, kaspaz-3 ekspresyonunun nöron perikaryonlarında çok zayıf olduğu, bununla birlikte gliya hücrelerinde ve infiltre hücrelerde işaretlenmenin kuvvetli olduğu dikkati çekti (Şekil 34D).



Şekil 34. Deney kontrol grubu kaspaz-3 immünoreaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi. Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) oldukça yoğun olduğu izlenmektedir. Bar= 100 µm. B) 3. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi. Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve bazı gliya hücrelerinde (ok başları) varlığı izlenmektedir. Bar= 100 µm. C) 7. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi. Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde zayıf olarak varlığı izlenmektedir. Bar= 100 µm. D) 14. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immunoreaktivitesi. Kaspaz-3 immunoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında ve gliya hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.

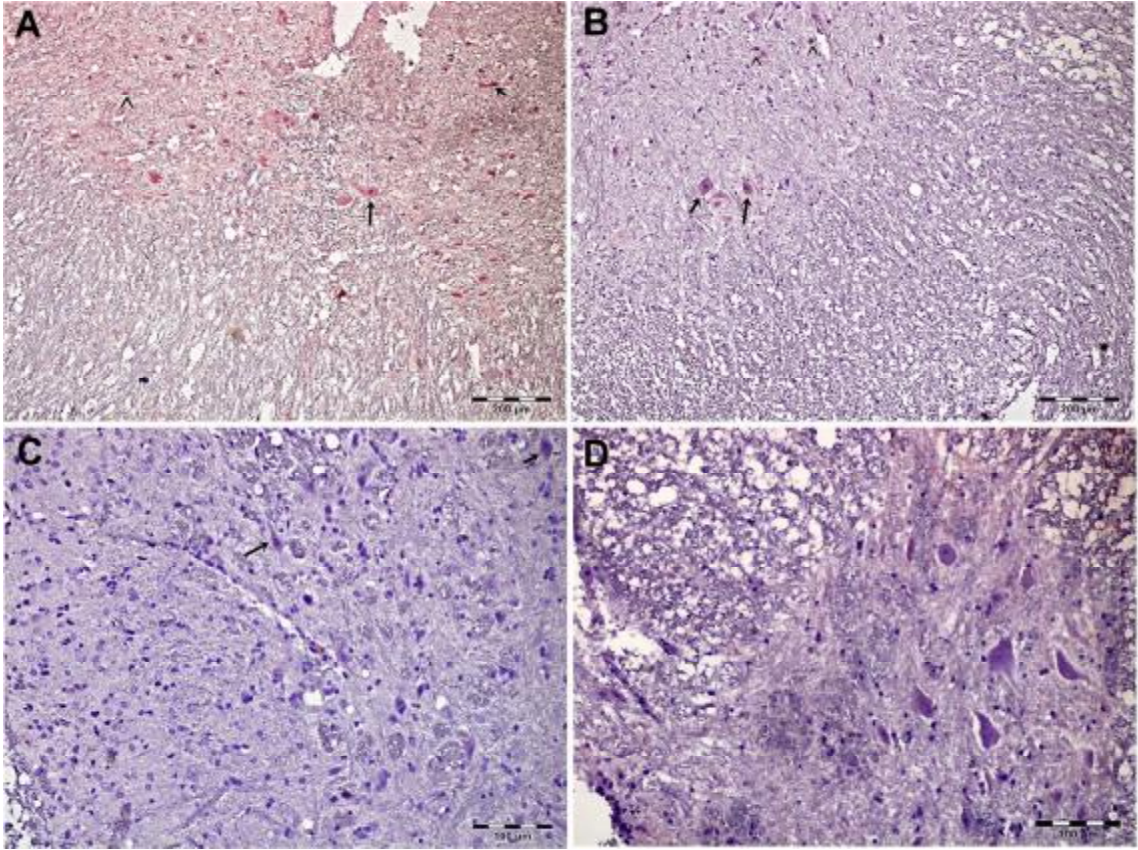
4.3.4. Metilprednizolon Tedavisi Uygulanan Grup

Spinal kord yaralanması oluşturulduktan sonra metilprednizolon tedavisi uygulanan gruba ait doku örneklerinde 1, 3, 7 ve 14. günlerde TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonları değerlendirildi.

4.3.4.1. TNF- α İmmunoreaktivitesi

Metilprednizolon tedavisi sonrasında TNF- α ekspresyonunun 1. günde özellikle nöron perikaryonlarında yoğun olduğu gözlemlendi. Gliya hücrelerinin sitoplazmalarında ve sinir liflerinde TNF- α ekspresyonunun belirgin olarak artış gösterdiği dikkati çekti (Şekil 35A). 3. günde alınan spinal kord dokularında TNF- α ekspresyonunun, gri

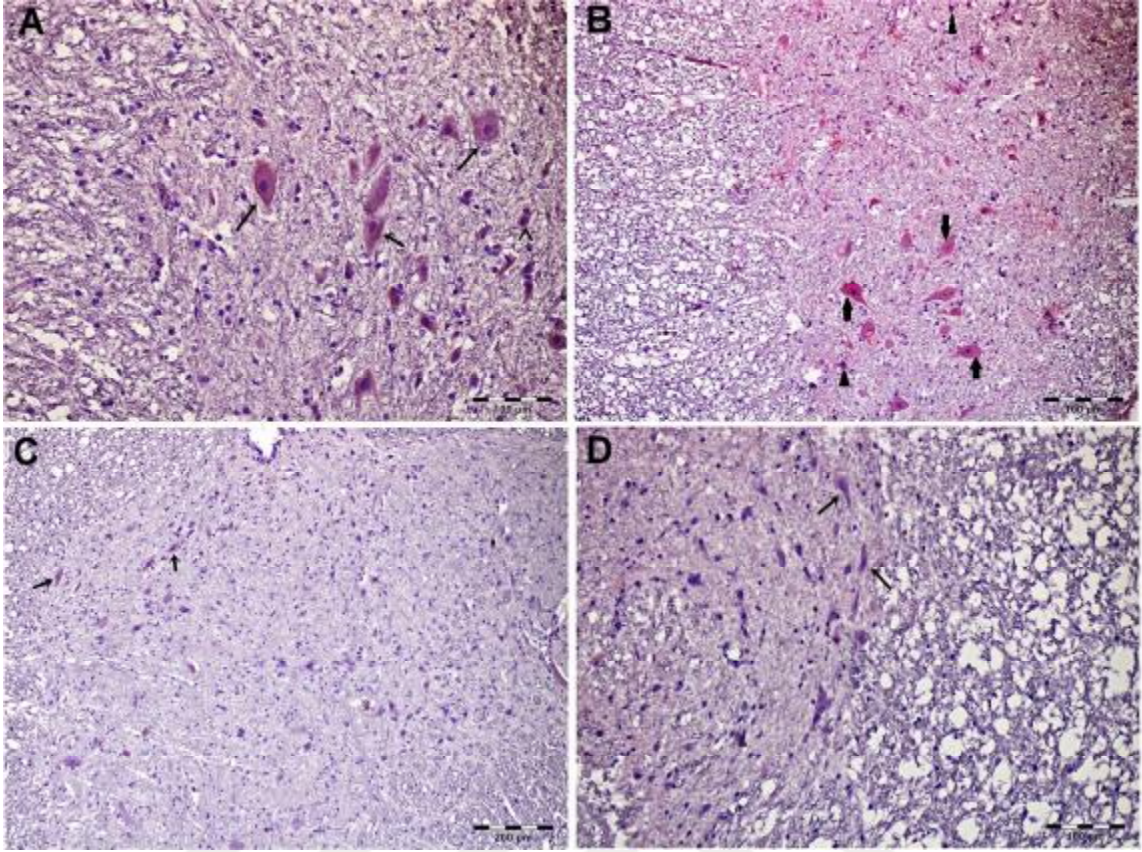
cevherdeki nöron ve gliya hücrelerinde, 1 günlük gruba benzer şekilde olduğu görüldü. Ancak deney kontrol grubu 3. güne göre TNF- α ekspresyonunun azaldığı görüldü (Şekil 35B). 7. günde alınan spinal kord dokularında TNF- α ekspresyonunun sinir hücre gövdelerinde ve gliya hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 35C). 14. günde alınan spinal kord dokularında TNF- α ekspresyonunun nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde çok zayıf olduğu tespit edildi (Şekil 35D).



Şekil 35. Metilprednizolon grubu TNF- α immünoaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoaktivitesi. TNF- α immünoaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başı) olduğu görülmektedir. Bar= 200 μ m. B) 3. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoaktivitesi. TNF- α immünoaktivitesinin nöron perikaryonları (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başları) olduğu görülmektedir. Bar= 200 μ m. C) 7. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoaktivitesi. TNF- α immünoaktivitesinin çok azaldığı izlenmektedir. Bar= 100 μ m. D) 14. günde spinal kord dokusunda TNF- α immünoaktivitesi. TNF- α immünoaktivitesinin nöron perikaryonları ve sinir liflerinde minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 μ m.

4.3.4.2. IL-6 İmmunoreaktivitesi

Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 1 gün sonra alınan spinal kord dokuları IL-6 ekspresyonu için immunohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde, deney kontrol grubu 1. günde oldukça yoğun eksprese olan IL-6'nın, metilprednizolon tedavisinden sonra bir miktar azaldığı görüldü. IL-6 ekspresyonunun gri cevherdeki nöron gövdelerinde ve gliya hücrelerinde belirgin olduğu izlendi (Şekil 36A). 3. günde alınan spinal kord dokularında IL-6 ekspresyonunun 1 günlük gruba benzer olarak nöron gövdeleri ve gliya hücrelerinde olduğu gözlemlendi (Şekil 36B). 7. günde alınan spinal kord dokularında, IL-6 ekspresyonunun, tedavi 1 ve tedavi 3. güne göre oldukça azaldığı görüldü (Şekil 36C). 14. günde alınan spinal kord dokularında IL-6 ekspresyonunun nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 36D).

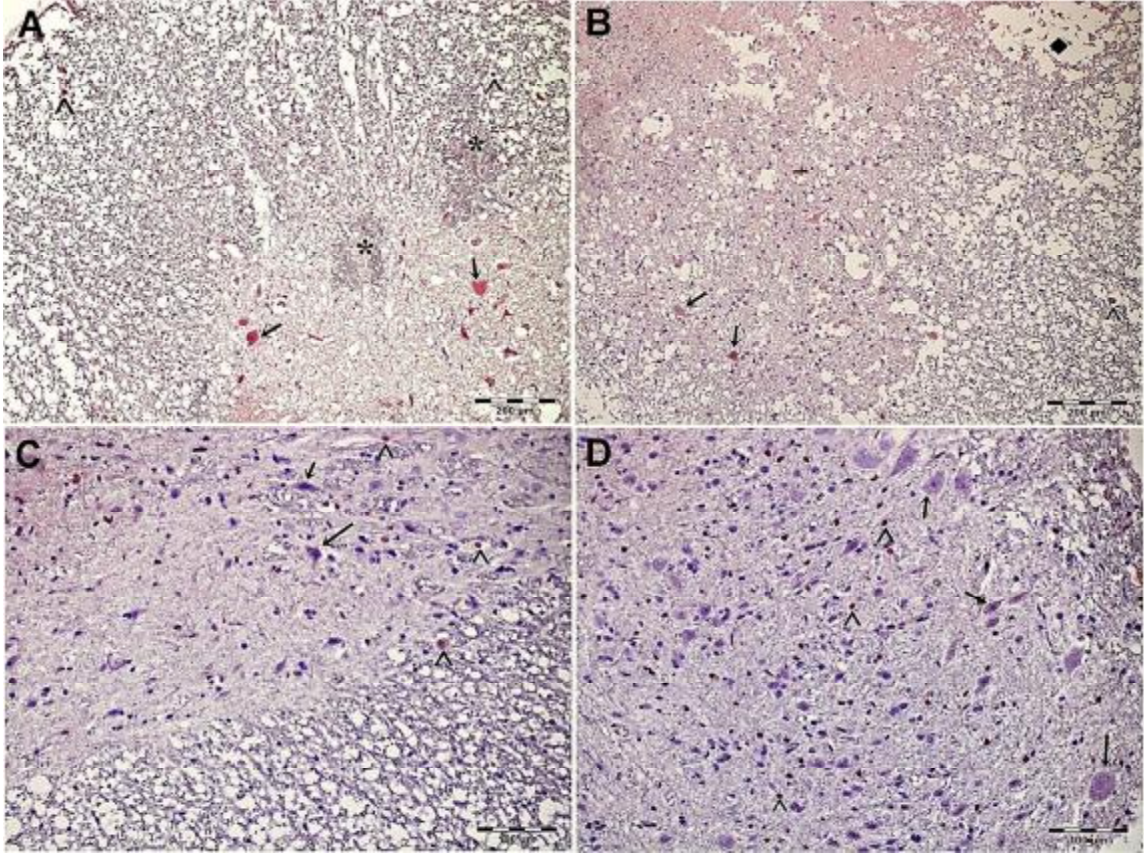


Şekil 36. Metilprednizolon grubunda IL-6 immunoreaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immünorektivitesi nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde (ok başları) yoğun bir şekilde izlenmektedir. Bar= 100 µm. B) 3. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin gri cevherdeki nöron perikaryonlarında (oklar), gliya hücrelerinde (ok başları) ve sinir liflerinde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm. C) 7. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin (oklar) 3 günlük metilprednizolon grubuna oranla belirgin bir şekilde azalmış olduğu izlenmektedir. Bar= 200 µm. D) 14. günde spinal kord dokusunda IL-6 immunoreaktivitesi. IL-6 immunoreaktivitesinin minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.

4.3.4.3. Kaspaz-3 İmmunoreaktivitesi

Metilprednizolon tedavisi uygulanan gruptan 1 gün sonra alınan spinal kord dokularında kaspaz-3 ekspresyonu için immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesinde, özellikle gri cevherdeki nöron perikaryonlarında, hem gri hem de beyaz cevherde yerleşen gliya hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu dikkati çekti (Şekil 37A). Diğer taraftan 3. günde alınan spinal kord dokularında hem sinir hücre gövdelerinde, hem de gliya hücrelerinde, kaspaz-3 immunoreaktivitesinin çok azaldığı dikkati çekti (Şekil 37B). 7. günde alınan spinal kord dokularında kaspaz-3 ekspresyonunun nöron perikaryonlarında minimal düzeyde olduğu görüldü (Şekil 37C). 14. günde alınan spinal kord doku örneklerinde kaspaz-3 ekspresyonunun oluşan

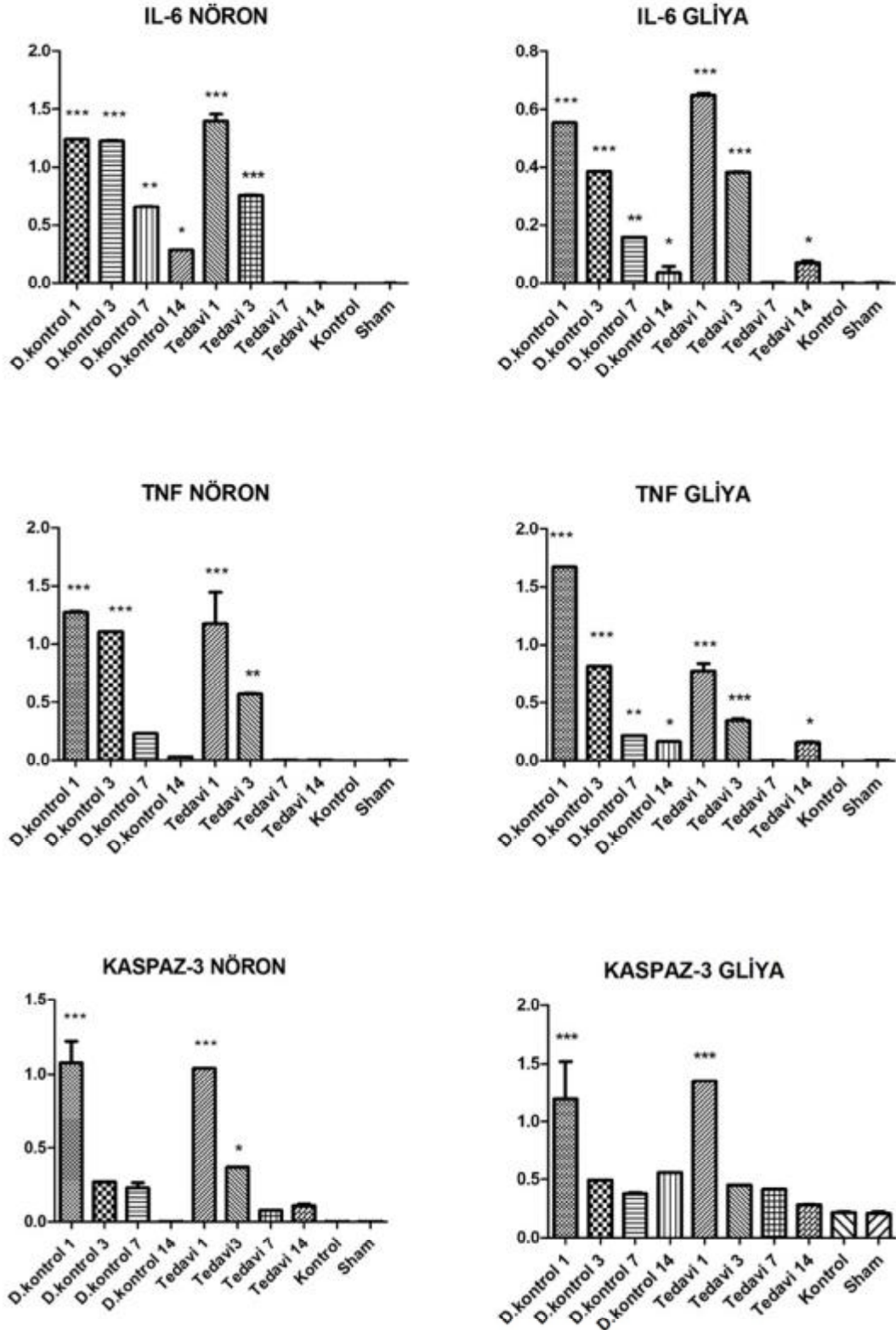
hücresel enkazdaki bazı hücrelerde ve gliya hücrelerinde olduğu tespit edildi (Şekil37D).



Şekil 37. Metilprednizolon grubunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. A) 1. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Kaspaz-3 immünoreaktivitesinin gri cevherdeki nöron perikaryonlarında (oklar) ve gliya hücrelerinde yoğun olduğu görülmektedir. Bar= 200 µm. B) 3. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Kaspaz-3 immünoreaktivitesinin 1. güne göre nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde belirgin düzeyde azaldığı izlenmektedir (oklar). Bar= 200 µm. C) 7. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Kaspaz-3 immünoreaktivitesinin nöron perikaryonlarında (oklar) ve bazı gliya hücrelerinde (ok başı) minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm. D) 14. günde spinal kord dokusunda kaspaz-3 immünoreaktivitesi. Kaspaz-3 immünoreaktivitesinin sadece bazı gliya hücrelerinde ve infiltre hücrelerde (ok başı) minimal düzeyde olduğu görülmektedir. Bar= 100 µm.

4.3.5. İmmünohistokimyasal Değerlendirme

TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının immünohistokimyasal skorlaması sonucunda, deney kontrol grubunda TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde 1. ve 3. günlerde yüksek olduğu, ancak 7 ve 14. günde her iki sitokin immünoreaktivitesinin anlamlı derecede azaldığı görüldü. Tedavi grubunda ise 1 ve 3. günlerde yüksek olan TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun 7 ve 14. günlerde kontrol grubuna benzer olarak minimal düzeyde olduğu tespit edildi. Kaspaz-3 ekspresyonunun ise özellikle 1. günde nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde belirgin bir artış olduğu, ancak 3, 7 ve 14. günlerde bu artışın anlamlı ölçüde azaldığı ve kontrol grubuna benzer şekilde minimal düzeyde olduğu görüldü. Tedavi grubunda kaspaz-3 ekspresyonunun nöron perikaryonları ve gliya hücrelerinde 1. günde yüksek olduğu, 3, 7 ve 14. günlerde kaspaz-3 immünoreaktivitesinin azaldığı tespit edildi (Şekil 38).

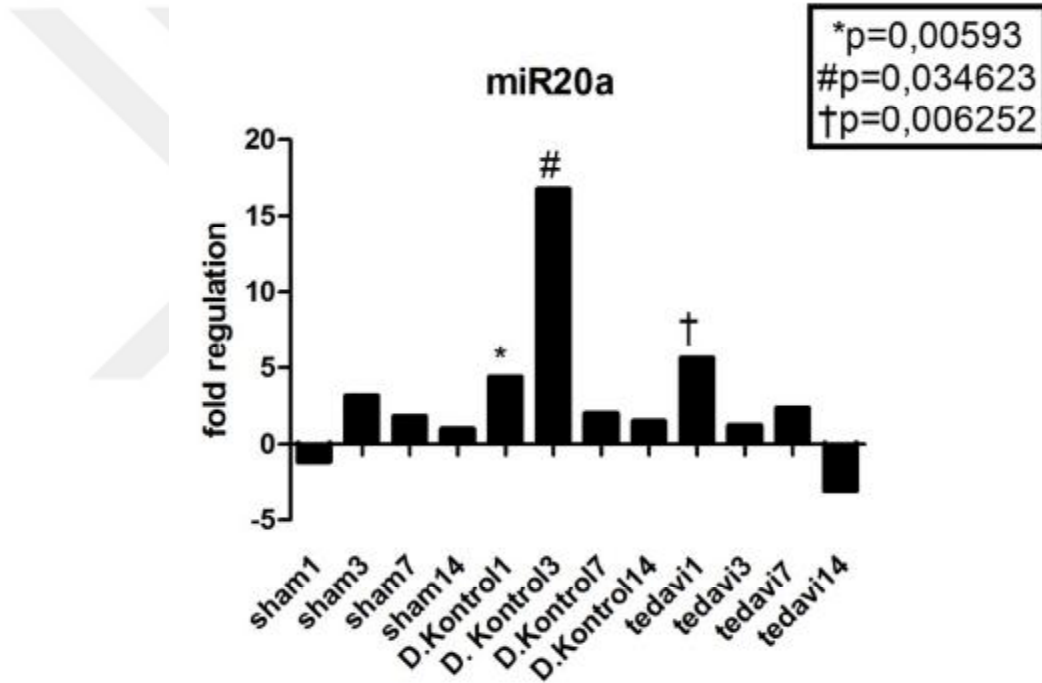


Şekil 38. IL-6, TNF- α ve Kaspaz-3 için immünohistokimyasal skoreleme. ***P< 0,0001, **P< 0,001, *P< 0,01.

4.4. Moleküler Biyolojik Bulgular

4.4.1. Spinal Kord Hasarının miR-20a üzerine etkisi

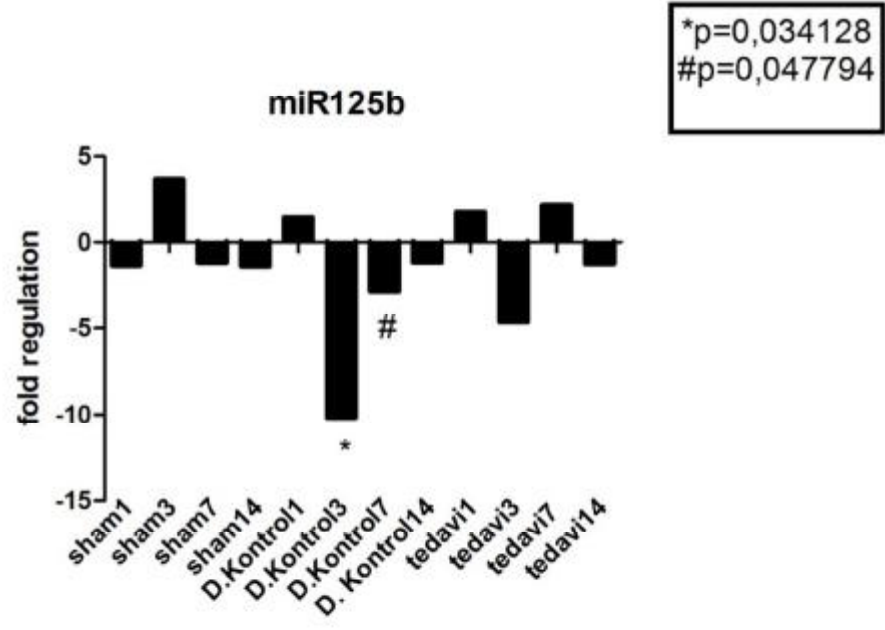
Spinal kord hasarından sonra kontrol geni (SNORD87) ile kıyaslandığında, miR-20a ekspresyonunun upregüle olduğu görüldü. Ancak bu artışın deney kontrol 1, deney kontrol 3 ve tedavi 1. gün gruplarında anlamlı olduğu tespit edildi. miR-20a gen ekspresyonunun deney 1. günde 4,38 kat, deney 3. günde 16,75 kat ve tedavi 1. günde 5,63 kat arttığı bulundu. Yaralanma sonrası deney 3. gün grubunda miR-20a gen ekspresyonunun maksimum seviyeye ulaştığı tespit edildi (Şekil 39).



Şekil 39. Spinal kord hasarının miR-20a gen ekspresyonuna etkisi

4.4.2. Spinal Kord Hasarının miR-125b üzerine etkisi

Spinal kord hasarından sonra kontrol geni (SNORD87) ile karşılaştırıldığında, miR-125b ekspresyonunun downregüle olduğu görüldü. Ancak bu azalmanın deney kontrol 3 ve deney kontrol 7. gün gruplarında anlamlı olduğu tespit edildi. MiR-125b gen ekspresyonunun deney 3. günde 10,17 kat, deney 7. günde 2,83 kat azaldığı bulundu. Yaralanma sonrası deney 3. gün grubunda miR-125b gen ekspresyonunun minimum seviyeye ulaştığı tespit edildi (Şekil 40).



Şekil 40. Spinal kord hasarının miR-125b gen ekspresyonuna etkisi

5. TARTIŞMA

Deneyisel akut spinal kord yaralanması sonrasında miR-20a ve miR-125b düzeylerinin, apoptoz ve enflamasyon ile olan ilişkilerinin, mikroskopik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemlerle araştırıldığı bu çalışmada, miR-20a seviyesinin spinal kord hasarı sonrası deney grubu 1. ve 3. günler ile tedavi grubu 1. günde upregüle olduğu, SKH sonrası 3. günde ise en yüksek seviyede bulunduğu tespit edildi. MiR-125b düzeyinin ise, spinal kord hasarı sonrası deney grubu 3. ve 7. günlerde downregüle olduğu, hasar sonrası 3. günde en düşük seviyede bulunduğu saptandı. İmmünohistokimyasal incelemelerde, proenflamatuvar moleküller olan TNF- α ve IL-6 seviyelerinin spinal kord hasarı oluşturulan deney ve tedavi gruplarında belirgin olarak artış gösterdiği, bu artışın yaralanmayı takiben 1. ve 3. günlerde elde edilen gruplarda belirgin olduğu, 7. ve 14. günlerde ise sitokin seviyesinde anlamlı bir azalmanın olduğu gözlemlendi. Apoptoz markırı olan kaspaz-3 seviyesinin spinal kord hasarı oluşturulan deney ve tedavi gruplarında belirgin olarak artış gösterdiği, bu artışın yaralanmayı takiben 1. günde elde edilen gruplarda belirgin olduğu, daha sonraki günlerde ekspresyonun aşamalı olarak azaldığı dikkati çekti.

İnsanda merkezi sinir sisteminin akut yaralanmaları sonucu oluşan yüksek morbidite ve mortaliteden sorumlu moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Son yıllarda özellikle primer yaralanmadan sonra meydana gelen sekonder doku hasarının etkileri üzerinde durulmaktadır. SKH'ndan sonra oluşan doku hasarının iyileştirilmesinde, henüz tam olarak etkili bir tedavi yönteminin bulunmaması sebebiyle, yaralanma sonrası oluşan sekonder hasar sürecinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması üzerine yapılan araştırmalar halen yoğun şekilde sürdürülmektedir¹¹⁸.

SKH, sinir, immün ve vasküler sistemlerde güçlü hücrel ve moleküler değişiklikler oluşturan kompleks bir yaralanmadır. Hasar sonrası kan-omurilik bariyerinin bozulması, bunu takiben periferel immün hücrelerin bölgeye infiltrasyonu, mikrogliaların aktivasyonu ve sinyal yollarının indüksiyonu ile güçlü bir enflamatuvar cevap başlatılmaktadır. SKH ile indüklenen enflamatuvar cevabın kesin mekanizması ve sonuçları henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Enflamatuvar cevabın zararlı etkilerinin yanında, yararlı etkileri de bulunmaktadır¹⁰. Enflamatuvar hücreler

tarafından salgılanan sitokinlerin, enflamatuvar reaksiyonların çeşitli adımlarının düzenlenmesinde önemli rolleri bulunmaktadır. Hasar sonrası, yerleşik hücrelerin (endotel hücreleri, makrofajlar ve fibroblastlar, MSS'ndeki mikroglia ve muhtemelen astrositler) ve göç eden hücrelerin (T ve B hücreleri, nötrofiller ve monositler) aktivasyonu sitokin üretimine neden olmaktadır. Bu hücreler, yaralanmaya ve enfeksiyona tepki olarak erken üretilen pro-enflamatuvar sitokinlerin (IL-1 α/β , IL-6, IL-8, CSF, IFN α/β) salgılanmasını uyarmaktadır. Pro-enflamatuvar sitokinler farklı etkilere sahip olan ve akut enflamatuvar cevapta yer alan moleküllerdir. IL-1, IL-6 ve TNF- α en önemli pro-enflamatuvar sitokinlerdir ve çoğunlukla birlikte hareket ederler. IL-1, IL-6 ve TNF- α 'nın işlevleri büyük oranda örtüşmekle birlikte, her biri aynı zamanda kendi karakteristik özelliklerini de göstermektedir¹⁰³.

Çalışmamızda, TNF- α ve IL-6 seviyelerinin spinal kord hasarı oluşturulan gruplarda belirgin olarak artış gösterdiği, bu artışın yaralanmayı takiben özellikle 1. ve 3. günlerde elde edilen gruplarda belirgin olduğu, 7. ve 14. günlerde ise sitokin seviyelerinin azaldığı tespit edildi. TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun hasar sonrası 1. günde en yüksek seviyede olduğu ve bu ekspresyonun daha çok dejenerasyonun belirgin olduğu alanlarda, nöron perikaryonlarında, gliya hücrelerinde ve kapiller endotel hücrelerinde belirgin olduğu, ayrıca, hasar bölgesinde çok miktarda eritrosit, lökosit ve makrofajların da yer aldığı dikkati çekti. Yapılan araştırmalarda, spinal kord hasarından sonraki ilk saatlerde nötrofillerin yaralanma bölgesine ulaştığı ve birinci hafta sonuna kadar da varlıklarını sürdürdükleri rapor edilmiştir^{119,120}. Spinal kord yaralanmasını takiben ortaya çıkan akut nötrofil infiltrasyonunun, daha sonraki günlerde azaldığı, buna karşın monosit sayılarının arttığı bilinmektedir. SKH'nda enflamatuvar reaksiyonların düzenlenmesinde önemli roller üstlenen bu hücrelerin, özellikle TNF- α tarafından aktive edildikleri kabul edilmektedir. Nötrofillerin bölgeye göçü, makrofajları hasar alanına çeken sinyal proteinlerinin serbest bırakılmasını uyarmaktadır. Nötrofil ve makrofajların hasar sonrası 1. hafta sonunda seviyelerinin düşmesi, bu hücrelerin ürettiği TNF- α ve IL-6 seviyelerini de düşürmektedir. Diğer taraftan, aktive olan mikrogliaların, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi pek çok sitokinleri salgıladıkları rapor edilmiştir^{121,122}. Byrnes ve arkadaşları⁶⁷, SKH'ndan sonra aktive olan mikroglialardan salınan IL-1 ve IL-6 gibi proenflamatuvar moleküllerin, 24. saatte en yüksek seviyeye ulaştıklarını göstermişlerdir. Araştırmacılar, post-travmatik 1. günde mikroglia

aktivasyonunun belirgin olduğunu, aktif mikroglia sayısının ilk 7 gün içinde arttığını ve 2-4 hafta sonra hücre sayısının stabil hale geldiğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda hasardan sonra 1. ve 3. günlerde yüksek olan TNF- α ve IL-6 sitokin düzeylerinin 7. günde azalmış olması çalışmaları destekler niteliktedir.

Çalışmamızda ışık ve elektron mikroskopik incelemelerde, SKH oluşturulan gruplarda hemorajik ve ödematöz alanların 1 ve 3. günlerde belirgin olduğu, 7. günden itibaren de azaldığı tespit edildi. Deneysel SKH oluşumu sırasında doku üzerine uygulanan mekanik güçlerin etkisiyle başlıca nöronlar ve endotel hücrelerinin plazma membranlarının zarar gördüğü bilinmektedir. Gri cevherin yoğun vasküler yapısı ve yumuşak kıvamından dolayı bu durum çoğunlukla kanamaya neden olmaktadır. Travmayı takiben ilk günlerde hemorajik alanların arttığı, ödem ve ekstraselüler sıvı artışına bağlı olarak da yaralanma bölgesinin oldukça genişlediği rapor edilmiştir^{31,33}. TNF- α 'nın, MSS'inde enflamatuvar reaksiyonların başlatılması ve sürdürülmesinde, anahtar konumda görev alan bir molekül olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Primer hasara bağlı olarak damar duvarında meydana gelen bozulma yanında, daha sonra ortama salınan sitokinlerin de etkisiyle, sekonder endotel hasarının oluşabileceği, buna bağlı olarak da hemoraji ve ödem alanlarının artacağı ileri sürülebilir. Yaralanma alanında aşırı derecede eksprese olan enflamatuvar moleküllerin, kapiller damar seviyesinde oluşturacağı hücresel hasarlar sonucu meydana gelen hemoraji ve ödemin, nöron ve gliya hücrelerine zarar vereceği açıktır. Gerçekten de çalışmamızda özellikle hemoraji ve ödemin yaygın olduğu 1. ve 3. günlerde deney kontrol grubu ve tedavi gruplarında, yaygın nöron ve gliya hücre dejenerasyonları izlenmektedir. Ayrıca hücresel değişikliklerin belirgin olduğu alanlara komşu bölgelerde sinir liflerinde akson ve miyelin kılıf hasarlarının da varlığı dikkati çekmektedir.

Diğer taraftan TNF- α 'nın yanında, IL-6 ekspresyonunun da, deney kontrol grubu 1. ve 3. günlerde arttığı, 7. ve 14. günlerde azaldığı belirlendi. IL-6'nın, özellikle MSS yaralanmalarında makrofaj/monosit fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynayan, multifonksiyonel bir sitokin olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca IL-6'nın, spinal kord yaralanması patofizyolojisinde sekonder hasarın başlatılmasında görev aldığı da bilinmektedir¹²¹. Araştırmamızda hücresel hasarın belirgin olduğu alanlarda TNF- α yanında, IL-6 ekspresyonunun da yüksek olması, her iki sitokinin birlikte uyarımı ile ortamda enflamasyonu arttıracacağı, buna bağlı olarak da, sekonder doku hasarını

tetikleyebilecekleri ileri sürülebilir. Gerçekten de erken dönemde IL-6 konsantrasyonunda meydana gelen aşırı yükselmenin, nöral dokulara zararlı olduğu, bu nedenle de nötralize edilmesinin yararlı olacağı öne sürülmüştür.

Deneyisel araştırmalar sonucunda TNF- α ve IL-6'nın aşırı ekspresyonunun hücreler de toksik etki yarattığı, apoptozu arttırdığı ve nöronal fonksiyonları bozduğu rapor edilmiştir¹²¹. SKH'nın karmaşık patofizyolojisi sekonder yaralanmayı da içeren çok sayıda moleküler mekanizmanın inhibisyonu ve aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu moleküler mekanizmalardan birisi olan apoptoz, SKH'nın önemli bir karakteristiğidir. Memelilerde apoptoz kaspaz ailesi tarafından düzenlenmektedir. Çalışmamızda kaspaz-3 ekspresyonun, deney kontrol grubu 1. günde yükseldiği, 3 ve 7. günlerde ise aşamalı olarak azaldığı belirlendi. Apoptoz, gliyal hücreler de dahil olmak üzere, spinal korddaki tüm hücre tiplerini etkilemektedir¹⁰⁸. Özellikle kaspaz-3'ün aşağı akışının (downstream) in vivo ve in vitro nükleer DNA parçalanmasına yol açtığı, bu durumun nöronal gelişim ve hasar için önemli olduğu rapor edilmiştir⁹. SKH'nda oligodendrositlerin apoptozu, aksonlarını izole eden miyelin kılıfın kaybedilmesi sonucu demiyelinizasyona neden olmaktadır¹⁰. Sıçanlarda yapılan deneySEL SKH'ndan sonra, oligodendrositlerin apoptozunun, sekiz gün kadar sürdüğü gösterilmiştir⁹.

Sunulan çalışmada, yaralanmadan sonra özellikle 1. günde apoptotik markır olan kaspaz-3 ekspresyonun artmış olduğu görüldü. Kaspaz-3 ekspresyonunun hem nöron perikaryonlarında hem de beyaz cevherde dejenere sinir liflerinde yüksek olduğu dikkati çekti. Bununla birlikte, yaralanmadan sonraki 3. ve 7. günlerde kaspaz-3 seviyelerinin azaldığı belirlendi. Eric ve arkadaşları apoptozun lezyon bölgesinde yaralanma sonrası 6. saatte meydana geldiğini ve bir kaç gün sonra bu bölgede apoptotik hücre sayılarının arttığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, 1. hafta sonunda apoptotik hücre sayısının belirgin olarak azaldığını ancak primer yaralanma bölgesi çevresinde, daha çok beyaz cevherde, apoptotik hücre ölümün arttığını göstermişlerdir¹. Çalışmamızda elektron mikroskopik incelemelerde hasar sonrası 1. ve 3. günlerde daha belirgin olmak üzere sinir lifleri etrafında miyelin kılıf hasarının belirgin olduğu, miyelin lamellerinin birbirlerinden ayrıldıkları, miyelin kılıf ile akson arasında geniş boşlukların meydana geldiği, akson ve miyelin kılıfta dejeneratif değişikliklerin olduğu gözlemlendi. Travma sonrası oluşan hücreSEL ölüm ile akson ve

miyelin kılıf hasarı, sonuçta yaygın dejenerasyonla sonuçlanmakta¹²³, ortaya çıkan hücrel artıkların birikimi makrofaj ve mikroglialar tarafından fagosite edilmektedir¹²⁴.

Çalışmamızda akut spinal kord yaralanmasını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, 1 gün sonra alınan doku örneklerinde, kavitasyon, hemoraji ve ödem alanlarının belirgin olduğu, nöronlarda ve gliya hücrelerinde dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği, miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf harabiyetlerinin olduğu, bu bulguların, 3. günde alınan doku örneklerinde de görüldüğü, ancak 7. ve 14. günlerde yapısal bozuklukların daha hafif seyrettiği gözlemlendi. Günümüzde akut MSS yaralanmalarından sonra ikincil beyin hasarını ve nörolojik disfonksiyonun tedavisinde tam etkili bir terapötik madde bulunmamaktadır¹¹⁸. Enflamatuvar hastalıkları tedavi etmek için kullanılan sentetik bir glukokortikoid olan metilprednizolon, SKH için nöroprotektif bir tedavi ajanı olarak klinikte halen yaygın olarak kullanılmaktadır^{54,55}. Kortikosteroidlerin kesin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte⁵⁷, MP'nin enflamasyon, oksidatif stres ve nöronal apoptozu inhibe ettiğini ve SKH sonrası fonksiyonel iyileşme üzerine nöroprotektif etkiye sahip olduğu düşünülmektedir⁶¹. Hem TNF- α hem de IL-1'in reseptörlerine bağlanması, nükleer faktör sinyal yolağı vasıtasıyla enflamatuvar cevabın indüklenmesine sebep olmaktadır. SKH tedavisinde kullanılan antienflamatuvar ajan olan metilprednizolonun, NF κ B yolağını inhibe ettiği, böylece sitokin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir¹. Gerçekten bizim çalışmamızda da metilprednizolon ile tedavi sonrası elde edilen gruplarda, TNF- α ve IL-6 ekspresyonlarının, 1 ve 3. günlerde azaldığı, bu düşüşün 7 ve 14. günlerde daha belirgin olduğu tespit edildi.

Günümüzde SKH'ndan sonra meydana gelen süreçlerin gen ekspresyonunun değişimiyle ilişkili olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. SKH tarafından tetiklenen reaksiyonların ilişkili olduğu gen ekspresyonlarının değişimi post-transkripsiyonel düzenlemelerle bağlantılıdır⁵. Bu süreçlerde anahtar konumda olan mikroRNA'lar, aynı anda yüzlerce geni düzenleyebildiklerinden, SKH'nı takiben sekonder hasarın başlatılmasında önemli rollere sahiptirler ve bu özelliklerinden dolayı da, spinal kord hasarının tedavisinde etkin moleküller olabilecekleri düşünülmektedir². Biyoinformatik analizler miRNA'ların değişen ekspresyonlarının SKH patofizyolojisinin kritik süreçlerinde etkili olduğunu göstermektedir⁵. SKH boyunca çeşitli miRNA'ların farklı patolojik süreçlere katıldıkları ve homeostazın yeniden oluşmasında önemli rollere

sahip oldukları ortaya çıkarılmıştır¹³. Spinal kord hasarını takiben ortaya çıkan global miRNA değişiklikleri, bir dizi mikroarray çalışmalarında araştırılmış olmakla birlikte, literatürde SKH ile ilişkili bireysel miRNA'ların çalışıldığı sınırlı sayıda çalışma yer almaktadır³⁵.

Spinal kord yaralanması sonrasında miR-20a ve miR-125b ekspresyonlarının apoptoz ve enflamasyon ile ilişkilerinin araştırıldığı bu ilk çalışmada miR-20a ekspresyonunun yaralanma sonrası 1 ve 3. günlerde ve tedavi sonrası 1. günde upregüle olduğu tespit edildi. Diğer taraftan hasar sonrası 1. ve 3. günlerde proenflamatuvar moleküller olan TNF- α ve IL-6 ekspresyonunda artış olduğu gözlemlendi. Bu nedenle SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyonunun upregülasyonunun, proenflamatuvar moleküllerin artışıyla indükleyebileceği düşünüldü. MiR-20a'nın, SKH'nda birden fazla sürece aracılık ettiği gösterilmiş³⁵ olmakla birlikte, miR-20a'nın, SKH'ndan sonra enflamasyon üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğu günümüze kadar çalışılmamıştır. SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyon değişimini araştıran bir çalışmada, hasardan 24 saat sonra miR-20a ekspresyonunun upregüle olduğu ve bunun bir hafta boyunca sürdüğü gösterilmiştir⁹². Hücrenin hayatta kalmasını ve nörogenezini sürdürebilen anahtar bir protein olan NGN-1, miR-20a tarafından inhibe edilmektedir, dolayısıyla, SKH oluşturulan hayvanlarda miR-20a ekspresyonunun baskılanmasının, nöronal canlılığı ve nörogenezi etkili bir şekilde uyardığı gösterilmiştir⁸⁵. Xue-Jun Liu ve arkadaşları, SKH'ndan sonra miR-20a ekspresyonunun arttığı, bunun da antiapoptotik Mcl-1 üzerinde baskıya neden olduğu, böylece miR-20a'nın SKH kaynaklı nöronal apoptozda rol oynadığını rapor etmişlerdir³⁵.

SKH'ndan sonra mikroRNA'ların enflamasyon üzerine etkilerini araştıran Iyer ve arkadaşları da, hasardan sonra miR-146a'nın yüksek seviyesinin iki enflamatuvar molekül olan IL-6 ve COX-2 ekspresyonlarını inhibe ettiğini, miR-146a'nın inhibisyonunun ise IL-6 ve COX-2 ekspresyonunu artırdığını göstermişlerdir. Böylece miR-146a, kronik enflamasyon boyunca, enflamatuvar cevabı düzenleyebilmektedir¹⁰⁵. miR-146a'nın SKH sırasında spinal kordda astrositlerde aşırı derecede eksprese edildiği ve yaralanmadan sonra, miR-146a'nın manipülasyonunun, anti-enflamatuvar ve anti-hiperplastik etkilere neden olabileceği ileri sürülmüştür¹⁰⁸.

Yapılan diğer bir çalışmada da, miR-181'in makrofajlar, monositler ve astrositler tarafından eksprese edildiği gösterilmiştir. MiR-181'in aşırı ekspresyonunun,

IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α gibi proenflamatuvar sitokinlerin inhibisyonuna neden olması, bu molekülün antienflamatuvar bir ajan olarak nitelenmesine sebep olmuştur. MiR-181, COX2 ve STAT3 tarafından düzenlenen bir proenflamatuvar faktör olan HMGA-1'i inhibe etmektedir. Bununla birlikte SKH'nda, miR-181 ekspresyonunun azaldığı, bu nedenle de enflamatuvar cevabın oluştuğu kaydedilmiştir¹⁰⁸. Hu ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, miR-126'nın, anjiyogenez ve fonksiyonel iyileşmenin yanı sıra enflamasyonu azaltmada da oldukça etkin olduğunu göstermişlerdir. Eksojen miR-126 ile tedavi edilen farelerde ekstrasvaza lökositler ve makrofajlar için biyolojik belirteçler olan CD45 ve CD68 ifadesini downregüle ettiği gözlenmiştir. Bu sonuç, miR-126'nın SKH için potansiyel bir terapötik ajan olabileceğini düşündürmüştür¹⁰⁹.

Literatürde miRNA'ların artan ekspresyonlarının enflamasyonu baskıladığı kabul edilmekle birlikte, bizim çalışmamızda hasardan sonra miR-20a ekspresyonun arttığı ve buna paralel olarak TNF- α ve IL-6 ekspresyonlarının da belirgin olduğu tespit edildi. Bunun yanında hasardan 7 gün sonra ise miR-20a düzeyinin düşmesiyle beraber TNF- α ve IL-6 ekspresyonlarının azaldığı dikkati çekti. Bu bulgular, miR-20a'nın SKH'nda güçlü bir proenflamatuvar ajan olabileceğini düşündürmektedir. Yaralanmadan sonra miRNA ekspresyon değişiminin hangi mekanizmalarla düzenlediği henüz tam olarak bilinmemektedir ve düzenlemeler birçok farklı seviyede ortaya çıkabilmektedir¹²⁵. Gerçektende miRNA'ların moleküler ve yapısal özelliklerinin tam olarak ortaya konulması, gelecekte SKH'nın tedavisinde etkin bir ajanın ortaya çıkarılmasına yardımcı olabilecektir¹⁰⁰.

Çalışmamızda miR-125b ekspresyonunun yaralanma sonrası deney grubu 3. ve 7.günlerde downregüle olduğu, aynı zamanda özellikle, 3. günde kaspaz-3 ekspresyonunda belirgin bir azalmanın olduğu ve 7. günde ise kaspaz-3 ekspresyonun minimal olduğu dikkati çekti. Kaspaz-3 ekspresyonunun belirgin olarak azalmasının, miR-125b'nin downregülasyonu ile birlikte gözlenmesi, miR-125b ekspresyonunun hücre ölümüyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla SKH'ndan sonra miR-125b ekspresyonunun azalması, apoptotik markır olan kaspaz-3 inhibisyonuna yol açabileceğini düşündürmektedir. SKH'ndan sonra miR-125b'nin apoptoz ile ilişkisi daha önce çalışılmamış olmakla birlikte, Diaz Quiroz ve arkadaşları, miR-125b'nin SKH'ndan sonra aksonal rejenerasyonla olan muhtemel ilişkisini mikroarray

yöntemiyle araştırmışlar ve miR-125b ekspresyonunun, hasardan sonra downregüle olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, miR-125b seviyesinin düşmesiyle aksonal dejenerasyonu ilişkilendirmişler ve miR-125b'nin upregülasyonunun, aksonal rejenerasyonu artırabileceğini ileri sürmüşlerdir¹²⁵. Bizim çalışmamızda ise miR-125b'nin hasardan sonra 3. ve 7. günlerde downregüle olduğu tespit edildi. Diğer çalışmalardan farklı olarak, çalışmamız SKH'ndan sonra miR-125b'nin qRT-PCR ile bireysel olarak çalışıldığı ilk çalışma olması açısından oldukça önemli olup, gelecekte araştırmacılara da yol gösterici niteliktedir.

MiR-125b'nin bireysel olarak çalışıldığı diğer çalışmalarda, LPS verilen sıçanlarda, TNF- α 'nın ekspresyonu artan ana sitokinlerden biri olduğu ve TNF- α ekspresyonu üzerinde miR-155 ve miR-125b'nin etkili olduğu gösterilmiştir. LPS'ye yanıt olarak, miR-155, TNF- α ekspresyonunu upregüle ederken; miR-125b'nin downregüle ettiği ortaya konulmuştur¹⁰¹. Alpini ve arkadaşları da, miR-125b'nin karaciğer kanseri ve kutanöz skuamöz hücreli karsinoma hücrelerinin istilasını, migrasyonu ve anjiyogenezisini inhibe edebileceğini göstermişlerdir^{126,127}. Zhou ve arkadaşları da, miR-125b'nin aşırı ekspresyonunun hepatoselüler karsinomda EMT 'yi inhibe ettiğini rapor etmişlerdir¹²⁸. MiR-125b'nin SET genini 3'-UTR bağlanması yoluyla düzenleyerek, bu yolla EMT'yi kontrol ettiği ve tümör metastazı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir¹⁰⁰. Dolayısıyla miR-125b ekspresyonundaki değişikliklerin, hücre invazyonu, migrasyon ve tümör oluşumu ile bağlantılı olabileceği gösterilmiştir. Sunulan çalışmada, SKH'ndan sonra miR-125b ekspresyonundaki değişimin hücre ölümüyle bağlantılı olabileceği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, miR-125b'nin hücrelerde birden fazla biyolojik süreçte rol oynayabileceğini söylemek yanlış olmayacaktır.

SKH, hücrelerde apoptotik genleri upregüle veya downregüle etmek için miRNA ekspresyonunu uyarmaktadır. Bu süreçte yer alan miRNA'lar arasında, miR-21'in SKH'ndan sonra en fazla ekspresyonu değişen miRNA'lardan biri olduğu gösterilmiştir. MiR-21, her ikisi de apoptozu teşvik eden Fas ligand geni ve fosfataz ve tensin homolog geninin downregulatörüdür¹⁰⁸. Strickland ve arkadaşları, miR-21'in SKH'ndan 4 gün sonra belirgin olarak upregüle olduğunu ve 14. günde downregüle olarak düzenlendiğini gösterdiler². Her ne kadar miR-21'in susturulması, astrogliyozis ile ilgili birçok yararlı etkiye sahip gibi görülse de, nöronal hücre ölümü üzerine zıt

etkisinin olduğu gösterilmiştir. Antagomir-21'i kullanarak miR-21'in bastırılması, SKH'ndan 28 gün sonra spinal kordda nöronlarda yapısal bozuklukları ve lezyon boyutunu arttırmaktadır⁹³. Yapılan araştırmaların çoğunda, miR-21'in güçlü bir antiapoptotik faktör olabileceğı kabul edilmektedir. Dolayısıyla miR-21'in, PTEN/mTOR yolağını hedef alarak akson rejenerasyonunu indüklediğı, buna karşın FASL genini baskılayarak antiapoptotik etki gösterdiğı düşünölmektedir³⁵.

MikroRNA'ların apoptozla ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, miR-384-5p ekspresyonunun SKH sonrası downregöle olduğı tespit edilmiştir. Aktif kaspaz-3 ifadesi, miR-384-5p tarafından upregöle olurken, miR-384-5p'nin inhibitörü tarafından ise downregöle edilmektedir, bu sonuç, miR-384-5p'nin, apoptotik sinyal yolaklarının düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşöndürmektedir⁸⁸. Sunulan çalışmada SKH'ndan sonra 3. ve 7. günlerde miR-125b'nin downregölasyonunun, kaspaz-3 ekspresyonunu azalmasına neden olması, miR-125b'nin de benzer bir etkisinin olabileceğini akla getirmektedir.

Yapılan diğeri bir çalışmada, Satoshi Ujigo ve arkadaşları, miR-210'u SKH oluşturulan fare spinal korduna enjekte etmişler ve miR-210'un, anjiyogenez, astrogliozis, miyelinizasyonu arttırdığı, fonksiyonel iyileşmeyi sağıladığı ve apoptozu da engellediğini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu nedenle, insanlarda spinal kord yaralanmalarında, miR-210'un, tedavi edici bir ajan olarak değerlendirilebileceğini ileri sürmiřlerdir¹¹⁶. Izumi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, miR-223 ekspresyonunun SKH sonrası 12. saat ve 3. günde upregöle olduğı, bu nedenle miR-223'ün ekspresyonunda meydana gelen değişimin, enflamatuvar cevap ve hücre ölüümüyle ilişkili olabileceğini ileri sürölmüřtür⁹⁰. Gerçekten yapılan diğeri bir araştırmada, SKH sonrası antagomir-223 tedavisi, downregöle olan BAX ve Kaspaz-3 ile upregöle olan BCL2'yle birlikte apoptotik hücrelerin sayılarını önemli ölçüde düşörmüřtür⁹¹. Ming Bai ve arkadaşları da, insan melanoma hücrelerinde miR-194'ün aşırı ekspresyonunun hücre proliferasyonunu inhibe ettiğı ve kaspaz-3 ve kaspaz-9 ekspresyonunu arttırarak apoptozu indüklediğini göstermişler, miR-194'ün bu etkiyi PI3K/AKT/FoxO3a sinyal yolağını baskılayarak yaptığını rapor etmiřlerdir¹¹⁷. Diğeri taraftan Huaguang Zhu ve arkadaşları, sıçanlarda deneysel SKH'dan sonra miR-494 ekspresyonunun upregöle olduğunu, buna paralel olarak kaspaz-3 ekspresyonunun arttığını ve bu durumun fosforile AKT ve mTOR düzeylerini belirgin olarak arttırdığını

buna karşın PTEN seviyesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu veriler, SKH sonrası miR-494'ün upregülasyonunun PTEN'i inhibe ederek, AKT/mTOR yolacağını aktive ettiğini göstermektedir. Bu sonuç, SKH'nın tedavisinde miR-494'ün, potansiyel bir tedavi edici ajan olabileceğini düşündürmektedir¹²⁹. Çalışmamızda SKH'ndan sonra downregüle olan miR-125b'nin kaspaz-3 ekspresyonunun azaltarak antiapoptotik etkiye sahip olması, SKH'nda miR-125b'nin baskılanmasının hastalığın tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Sunulan çalışmada miR-20a ve miR-125b miRNA düzeylerinin araştırılmasında Real-time qRT-PCR analizi kullanıldı. Liu ve arkadaşları SKH'ndan sonra, mikroarray analizini kullanarak yaptıkları araştırmalarında, SKH'ndan sonra yaklaşık 300 miRNA'nın ekspresyonunda değişikliklerin oluştuğunu, ancak bunlardan 97 miRNA'da anlamlı bir değişimin meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu kapsamda, miR-20a ekspresyonunun arttığını, buna karşın miR-125b ifadesinin ise azaldığını rapor etmişlerdir¹⁴. Mikroarray analizinin miRNA ekspresyonu araştırmalarında hata oranının yüksek olduğu, bu nedenle de, sonuçların Real-time qRT-PCR yöntemi ile doğrulanmasının gerekliliği yaygın olarak kabul edilmektedir.

SKH'nı takiben miRNA'ların ekspresyon düzeyleri hasar sürecinde değişebilmektedir. Bu nedenle, miRNA'ların ifadesinde gözlenen bu değişikliklerin, SKH'nda, apoptoz, enflamasyon, eksitotoksiste, anjiyogenez, astrogliyozis, oligodendrosit gelişimi, aksonal rejenerasyon ve remiyelinizasyon üzerinde etkili olabilecekleri düşünülmektedir^{130,131}. SKH'ndan sonra ekspresyonu değişen miRNA'ların, hastalığın prognozunu etkileme potansiyelinin her zaman var olduğu bir gerçektir. Bununla birlikte, SKH'nda miRNA'ların tedavi edici ajan olarak kullanılması için, daha ileri araştırmaların yapılmasının gerektiği de yaygın olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla, SKH'ndan sonra miRNA'ların ekspresyonunun manipüle edilmesi, hasarın kalıcı ve zararlı etkilerini ortadan kaldırmaya yönelik yeni bir terapötik strateji potansiyeli olma gerçeğini her zaman taşımaktadır.

Bütün bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel akut spinal kord yaralanmasından sonra miR-20a upregülasyonun proenflamatuvar molekülleri indükleyerek enflamasyonu artırabileceği düşünüldü. Diğer taraftan, miR-125b'nin kaspaz-3 ile ilişkili olabileceği ve hasardan sonra miR-125b downregülasyonunun apoptozu inhibe edebileceği şeklinde yorumlandı. Bu nedenle, miR-20a ve miR-

125b'nin SKH'nda bir biyomarkır ve tedavi ajanı olarak dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.



6. SONUÇLAR

Deneyssel olarak yetişkin erkek sıçanlarda spinal kord hasarı oluşturulan deney ve tedavi gruplarından 1, 3, 7 ve 14. günlerde alınan spinal kord dokularında, miR-20a ve miR-125b ekspresyonları ile bunların apoptoz ve enflamasyonla ilişkilerinin mikroskopik, immünohistokimyasal ve moleküler biyolojik yöntemler ile araştırıldığı bu çalışma sonucunda;

1. Spinal kord hasarı oluşturulmayan ve herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubunun ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde spinal kordda, nöron perikaryonlarının, gliya hücrelerinin ve sinir liflerinin normal yapılarını korudukları,
2. Aynı grubun immünohistokimyasal değerlendirmelerinde, spinal kordda TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonunun minimal seviyede olduğu,
3. Spinal kord yaralanmasına maruz bırakılmayıp sadece T2-T7 seviyesinde laminektomi yapılan sham operasyon grubunda, ışık ve elektron mikroskopik incelenmesinde spinal kord yapısının normal kontrol grubuna benzerlik gösterdiği,
4. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda bu grupta da TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonunun zayıf olduğu,
5. Aynı grubun real time PCR değerlendirmelerinde, miR-20a ve miR-125b ekspresyonları da istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı,
6. Spinal kord hasarı oluşturulduktan sonra hiçbir tedavi yöntemi uygulanmayıp serum fizyolojik verilen deney kontrol grubunun ışık ve elektron mikroskopik değerlendirmelerinde, 1. ve 3. günlerde, spinal kord gri cevherinde hücresel hasarın nöronlarda, gliya hücrelerinde ve miyelinli sinir liflerinde belirgin olduğu ve önemli boyutta kavitasyon alanlarının bulunduğu dikkati çekmiştir. Bunun yanı sıra hem gri cevherde hem de beyaz cevherde ödem ve hemorajik alanların varlığı izlendi. Gri cevherde nöron perikaryonlarının çekirdeklerinde kromatin yoğunlaşması ve sitoplazmik organellerin, özellikle mitokondriyonlarda dejenerasyon olduğu görüldü. Özellikle beyaz cevherde miyelinli sinir liflerinde önemli miktarda miyelin kayıplarına rastlandı. 7. günde,

gri ve beyaz cevherde ödematöz ve kavitasyon alanlarının önemli ölçüde azaldığı, hemarajik alanların kaybolduğu tespit edildi. Miyelin kılıf lamellerinde ayrılmalar, miyelin kılıf devamlılığının bozulması, vakuolizasyon ve kopmalar gibi yapısal değişiklikler görüldü. 14. günde, kavitasyon alanlarının yerini hücre artıklara bıraktığı görüldü. Beyaz cevherde miyelin kılıfta yapısal bozukluklar ve gri cevherde nöron perikaryonlarında ki bozukluklar bu grupta da var olduğu,

7. Deney kontrol grubunun TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının immünohistokimyasal incelemesi sonucunda, özellikle 1. ve 3. günlerde TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun nöron perikaryonları, gliya hücreleri ve sinir liflerinde yüksek olduğu, ancak 7. ve 14. günde her iki sitokin immünoaktivitesinin azaldığı görüldü. Kaspaz-3 ekspresyonunun ise özellikle 1. günde nöron perikaryonları, gliya hücreleri ve sinir liflerinde belirgin bir artış olduğu, ancak 3, 7 ve 14. günlerde bu artışın önemli ölçüde azaldığı,
8. Aynı grubun real time PCR değerlendirmelerinde, miR-20a ekspresyonunun deney kontrol grubu 1. ve 3. günlerde upregüle olduğu, miR-20a ekspresyonunun en yüksek deney 3. günde olduğu tespit edildi. MiR-125b ekspresyonunun ise 3. ve 7. günlerde downregüle olduğu, miR-125b ekspresyonunun en düşük deney 3. günde izlendiği,
9. Spinal kord yaralanmasını takiben metilprednizolon tedavisi uygulanan grubun ışık ve elektron mikroskopik incelemelerinde, 1 günlük metilprednizolon grubunda spinal kordda yaralanma ile birlikte meydana gelen dejeneratif değişikliklerin, deney kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı ölçüde azalmış olduğu dikkati çekti. Spinal kord gri ve beyaz cevherinde ödematöz ve hemoraji bölgeleri, nöron perikaryonları ve sinir liflerinde dejeneratif değişiklikler, beyaz cevherde yer alan miyelinli sinir liflerinde miyelin kılıf bozuklukları ve aksonal harabiyet görüldü. Tedavi 3. günde, gri cevherde yer alan nöronlarda büzülme gibi dejeneratif değişiklikler görülmekle birlikte, deney kontrol grubuna oranla ultrastrüktürel değişikliklerin nispeten azaldığı dikkati çekti. Tedavi 7. günde, hemorajik alanların tamamen kaybolduğu ve kavitasyon alanlarının çok önemli ölçüde azaldığı, nöron perikaryonları ve sinir liflerinin bazı bölgelerde dejeneratif değişikliklerin olduğu tespit edildi. 14. günde ise

spinal kord gri ve beyaz cevherinde normal histolojik yapının genellikle korunmuş olduğu, ancak hücrel artıkların diğer tedavi gruplarına kıyasla daha yoğun olduğu,

10. Tedavi grubunun TNF- α , IL-6 ve kaspaz-3 ekspresyonlarının immünohistokimyasal incelemesi sonucunda, özellikle 1. ve 3. günlerde TNF- α ve IL-6 ekspresyonunun nöron perikaryonları, gliya hücreleri ve sinir liflerinde yüksek olduğu, 7. ve 14. günlerde her iki sitokin immünoaktivitesinin azaldığı görüldü, ancak deney kontrol grubuyla kıyaslandığında bu sitokinlerin ekspresyonunda azalma olduğu dikkat çekti. Kaspaz-3 ekspresyonunun ise özellikle 1. günde nöron perikaryonları, gliya hücreleri ve sinir liflerinde belirgin bir artış olduğu, ancak 3, 7 ve 14. günlerde bu artışın önemli ölçüde azaldığı,
11. Aynı grubun real time PCR değerlendirmelerinde, miR-20a ekspresyonunun tedavi grubu 1. günde upregüle olduğu, miR-125b ekspresyonunda ise tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğin olmadığı, belirlendi.

Bütün bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, deneysel akut spinal kord yaralanmasından sonra miR-20a upregülasyonunun proenflamatuvar molekülleri indükleyerek enflamasyonu artırabileceği düşünüldü. Diğer taraftan, miR-125b'nin kaspaz-3 ile ilişkili olabileceği ve hasardan sonra miR-125b downregülasyonunun apoptozu inhibe edebileceği şeklinde yorumlandı. Bu nedenle, miR-20a ve miR-125b'nin SKH'nda bir biyomarkır ve tedavi ajanı olarak dikkate alınabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

1. **Profyris C, Cheema SS, Zang D, Azari MF, Boyle K, Petratos S.** Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiol Di*, **2004**; 15(3):415-36.
2. **Strickland E, Hook M, Balaraman S, Huie J, Graub J, Miranda R.** MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair. *Neuroscience*, **2011**; 186: 146–160.
3. **Liu D, Huang Y, Jia C, Li Y, Liang F, Fu Q.** Administration of Antagomir-223 Inhibits Apoptosis, Promotes Angiogenesis and Functional Recovery in Rats with Spinal Cord Injury. *Cell Mol Neurobiol*, **2015**; 35:483–491.
4. **Zhu SP, Wang ZG, Zhao YZ, Wu J, Shi HX, Ye LB et al.** Gelatin nanostructured lipid carriers incorporating nerve growth factor inhibit endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and improve recovery in spinal cord injury. *Molecular neurobiology*, **2015**; doi:10.1007/s12035-015-9372-2.
5. **Yunta M, Nieto-Diaz M, Esteban F, Caballero-Lopez M, Navarro-Ruiz R, Reigada D.** MicroRNA Dysregulation in the Spinal Cord following Traumatic Injury. *PLoS ONE*, **2012**; doi:10.1371/journal.pone.0034534.
6. **Dong J, Lu M, He X, Xu J, Qin J, Cheng Z et al.** Identifying the role of microRNAs in spinal cord injury. *Neurol Sci*, **2014**; 35:1663–1671.
7. **Berk A, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Bretscher A, Ploegh H, Matsudaira P.** *Molecular Cell Biology*. 6.th. W. H. Freeman and Company, **2011**: 347-350.
8. **Madathil S, Nelson P, Saatman K, Wilfred B.** MicroRNAs in CNS injury: Potential roles and therapeutic implications. *Bioessays*, **2011**; 33(1): 21–26.
9. **Hausmann O.** Post-traumatic inflammation following spinal cord injury. *Spinal Cord*, **2003**; 369–378.
10. **Nieto-Diaz M, Esteban F, Reigada D, Munoz-Galdeano T, Yunta M, Caballero-Lopez M.** MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences, and therapeutics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, **2014**; Volume 8, Article 53.
11. **Singh S, Metz I, Amor S, van der Valk P, Stadelmann C, Bruck W.** Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Neuropathol*, **2013**; 125:595–608.
12. **Janssen KT, Mac Nair CE, Dietz JA, Schlamp CL, Nickells RW.** Nuclear atrophy of retinal ganglion cells precedes the baxdependent stage of apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **2013**; 54:1805–1815. doi:10.1167/iops.11-9310.
13. **Liu G, Keeler B, Zhukareva V, Houle J.** Cycling Exercise Affects the Expression of Apoptosis-Associated microRNAs after Spinal Cord Injury in Rats. *Exp Neurol*, **2010**; 226(1): 200–206.
14. **Liu NK, Wang XF, Lu QB, Xu XM.** Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol*, **2009**; 219:424–429.
15. **Wei H, Wang C, Zhang C, Li P, Wang F, Zhang Z.** Comparative profiling of microRNA expression between neural stem cells and motor neurons in embryonic spinal cord in rat. *International journal of developmental neuroscience: the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. **2010**; 28: 545-51.

16. **Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al.** A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. **2007**; 129: 1401-14.
17. **Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA.** *Text Book Of Histology*. 5th. Ed., Philadelphia: W.B. Saunders Company, **1985**: 199-236.
18. **Ross MH, Pawlina W.** *Histology: A text and atlas*. 7th.Ed., Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2016**: 352-388.
19. **Abraham L.** Çeviri editörü: Demir R. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme yayıncılık, **2006**: 200-225
20. **Bhalala O.G, Srikanth M, Kessler J.A,** The emerging roles of microRNAs in CNS injuries. *Nat Rev Neurol*, **2013**; 9(6): 328–339.
21. **Hel Q, Xiong L, Liu F, Hel X, Feng G, Shang F, Xia Q, Wang Y.** MicroRNA-127 targeting of mitoNEET inhibits neurite outgrowth, induces cell apoptosis and contributes to physiological dysfunction after spinal cord transection. *Scientific Reports*, **2016**: 6:35205.
22. **Biering E, Pedersen V, Clausen S.** Epidemiology of spinal cord lesions in Denmark. *Paraplegia*, **1990**; 28:105–118.
23. **Hoschouer EL, Finseth T, Flinn S et al.** Sensory stimulation prior to spinal cord injury induces post-injury dysesthesia in mice. *J Neurotrauma*, **2010**; 27: 777–87
24. **Richards JS, Hirt M, Melamed L.** Spinal cord injury: a sensory restriction perspective. *Arch Phys Med Rehabil*, **1982**; 63: 195–99
25. **Krishnan KR, Glass CA, Turner SM et al.** Perceptual deprivation in the acute phase of spinal injury rehabilitation. *J Am Paraplegia Soc*, **1992**; 15: 60–65
26. **Tator, CH, Fehlings MG.** Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J. Neurosurg*. **1991**;75, 15– 26.
27. **Beattie MS, Bresnahan JC.** Cell death, repair, and recovery of function after spinal cord injury in rats. *Neurobiology of Spinal Cord Injury*. **2000**.
28. **Liu XZ et al.** Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neuosci*, **1997**; 17: 5395- 5306.
29. **Marmarou A et al.** Traumatic brain tissue acidosis:experimental and clinical studies. *Acta Neurochir Suppl*, **1993**; 57: 160–164.
30. **Segal JL et al.** Circulating levels of IL-2R, ICAM-1, and IL-6 in spinal cord injuries. *Arch Phys Med Rehabil*, **1997**; 78: 44–47.
31. **Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC.** Cell death in models of spinal cord injury. *Prog. Brain Res*, **2002b**; 137, 37– 47.
32. **Acarin L et al.** Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur J Neurosci*, **2000**; 12: 3505–3520.
33. **Tator CH.** Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain Pathol*. **1995**; 5, 407– 413.
34. **Blight AR, Decrescito V.** Morphometric analysis of experimental spinal cord injury in the cat: the relation of injury intensity to survival of myelinated axons. *Neuroscience*, **1986**; 19, 321– 341.

35. **Liu X, Zheng X, Zhang R, Guo Y, Wang J.** Combinatorial effects of miR-20a and miR-29b on neuronal apoptosis induced by spinal cord injury. *Int J Clin Exp Pathol*, **2015**; 8(4):3811-3818
36. **Guth L, Zhang Z, Steward O.** The unique histopathological responses of the injured spinal cord. Implications for neuroprotective therapy. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, **1990**; 890, 366– 384.
37. **Gwak YS, Kang J, Unabia GC, Hulsebosch CE.** Spatial and temporal activation of spinal glial cells: role of gliopathy in central neuropathic pain following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, **2012**;234:362–372.
38. **Schnell L et al.** Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, **1999a**; 11: 3648–3658.
39. **Noble LJ et al.** Disruption and time course of protein extravasation in the rat spinal cord after contusive injury. *Brain Res*, **1989**; 482: 57–66.
40. **Tator CH, Koyanagi I.** Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *J Neurosurg*, **1997**; 86: 483–492.
41. **Beal MF.** Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci*, **2000**; 23:298–304.
42. **Brewer GJ, Wallimann T.** Protective effects of the energy precursor creatine against toxicity of glutamate and betaamyloid in rat hippocampal neurons. *J Neurochem*, **2000**; 74: 1968–1978.
43. **Hausmann ON et al.** Protective effects of oral creatine supplementation prior to spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*, **2002**; 40: 449–456.
44. **Taoka Y, Okajima K.** Role of leucocytes in spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, **2000**; 17: 219–229.
45. **Young W.** Spinal cord contusion models. *Prog. Brain Res*, **2002**; 137, 231– 255.
46. **Koyanagi I, Tator CH, Lea PJ.** Three-dimensional analysis of the vascular system in the rat spinal cord with scanning electron microscopy of vascular corrosion casts. *Neurosurgery*, **1993**; 33, 285– 291
47. **Torre JC.** Spinal cord injury. Review of basic and applied research. *Spine* 6, **1981**; 315–335.
48. **Rivlin AS, Tator CH.** Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology*, **1978**; 10 (1): 38-43.
49. **Cotran RS, Kumar V, Collins T.** Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Venkatachalam, M. (Ed.), Robbins Pathologic Basis of Disease, sixth ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, **1999**; pp. 5 – 18.
50. **Lipton SA et al.** A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, **1993**; 364:626–631.
51. **Bao F, Liu D.** Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces neuron death and neurological deficits. *Neuroscience*, **2002**; 115: 839–849.
52. **Dawson VL et al.** Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary cortical cultures. *J Neurosci*, **1993**; 13: 2651–2661.
53. **Mills CD et al.** Changes in metabotropic glutamate receptor expression following spinal cord injury. *Exp Neurol*, **2001**; 170: 244–257.

54. **Lu G, Niu F, Zhang Y, Du L, Liang Z, Gao Y.** Methylprednisolone promotes recovery of neurological function after spinal cord injury: association with Wnt/ β -catenin signaling pathway activation. *NEURAL REGENERATION RESEARCH*, **2016**; Volume 11, Issue 11
55. **Ulfendrup A, Jonathon CT, Chio CS, Fehlings AM.** Modulating the immune response in spinal cord injury. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2016; 16:10, 1127-1129.
56. **Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF et al.** A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *N Engl J Med*, **1990**; 322:1405—11.
57. **Suberviola B, Castro A, Llorca J, Ortiz-Melon F, Minambres E.** Early complications of high-dose methylprednisolone in acute spinal cord injury patients. *Injury, Int. J. Care Injured*, **2008**; 39, 748—752.
58. **Ahuja C, Nori S, Tetrault L, Wilson J, Kwon B, Harrop J.** Traumatic Spinal Cord Injury- Repair and Regeneration. *Neurosurgery*, **2017**; 80 (3S): S9-S22.
59. **Edward D, Hall PhD, Patrick G, Sullivan PhD.** Preserving Function in Acute Nervous System Injury. *From Neuroscience to Neurology*, **2005**.
60. **Bowers C, Kundu B, Hawryluk G.** Methylprednisolone for acute spinal cord injury: an increasingly philosophical debate. *Neuronal Regeneration Research*, **2016**; Volume 11, Issue 6.
61. **Vaquero J, Zurita M, Oya S, Aguayo C, Bonilla C.** Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. *Histol Histopathol*, **2006**; 21:1091-1102.
62. **Schnell L et al.** Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *Eur J Neurosci*, **1999a**; 11: 3648–3658.
63. **Wu X, Yoo S, Wrathall JR.** Real-time quantitative PCR analysis of temporospatial alterations in gene expression after spinal cord contusion. *J. Neurochem*, **2005**; 93, 943–952.
64. **Di Giovanni S, Knoblach SM., Brandoli C, Aden SA, Hoffman EP, Faden AI.** Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle in neuronal death. *Ann Neurol*, **2003**; 53, 454–468.
65. **Song G, Cechvala C, Resnick DK, Dempsey RJ, Rao VL.** Gene Chip analysis after acute spinal cord injury in rat. *J. Neurochem*, **2001**; 79, 804–815.
66. **Aimone JB, Leasure JL, Perreault VM, Thallmair M.** Spatial and temporal gene expression profiling of the contused rat spinal cord. *Exp. Neurol*, **2004**; 189, 204–221.
67. **Byrnes KR, Garay J, Di Giovanni S, De Biase A, Knoblach SM, Hoffman EP, et al.** Expression of two temporally distinct microglia-related gene clusters after spinal cord injury. *Glia*, **2006**; 53, 420–433.
68. **Carmel JB, Galante A, Soteropoulos P, Tolias P, Recce M, Young W, et al.** Gene expression profiling of acute spinal cord injury reveals spreading inflammatory signals and neuron loss. *Physiol. Genomics*, **2001**; 7, 201–213.
69. **De Biase A, Knoblach SM, Di Giovanni S, Fan C, Molon A, Hoffman EP, et al.** Gene expression profiling of experimental traumatic spinal cord injury as a function of distance from impact site and injury severity. *Physiol. Genomics*, **2005**; 22, 368–381.
70. **Ning B, Gao L, Liu R, Liu Y, Zhang N, Chen Z.** MicroRNAs in Spinal Cord Injury: Potential Roles and Therapeutic Implications. *Int. J. Biol. Sci.*, **2014**; Vol. 10.

71. **Saugstad JA.** MicroRNAs as effectors of brain function with roles in ischemia and injury, neuroprotection, and neurodegeneration. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, **2010**; 30, 1564–1576.
72. **Lee RC, Ambros V.** An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **2001**; 294:862–4.
73. **Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **1993**; 75:843–54.
74. **Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al.** The 21 nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *C. elegans*. *Nature*. **2000**; 403:901–6.
75. **Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP.** Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **2010**; 466, 835–840.
76. **Krichevsky AM.** MicroRNA profiling: from dark matter to White matter, or identifying new players in neurobiology. *Scientific World Journal*, **2010**; 7, 155–166.
77. **Bartel DP.** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **2004**; 116:281–297.
78. **Sayed D, Abdellatif M.** MicroRNAs in development and disease. *Physiol Rev*, **2011**; 91:827–87.
79. **Friedman Y, Balaga O, Linial M.** Working together: combinatorial regulation by microRNAs. *Adv Exp Med Biol*. **2013**; 774:317–37.
80. **Li H, Mao S, Wang H, Zen K, Zhang C, Li L.** MicroRNA-29a modulates axon branching by targeting doublecortin in primary neurons. *Protein Cell*, **2014**; 5(2):160–169.
81. **Liu NK, Wang XF, Lu QB, Xu XM.** Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp. Neurol*, **2009**; 219:424–429.
82. **Alam MM, O'Neill LA.** MicroRNAs and the resolution phase of inflammation in macrophages. *Eur J Immunol*, **2011**; 41:2482–2485.
83. **Jee MK, Jung JS, Choi JI, Jang JA, Kang KS, Im YB, et al.** MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury. *Brain*, **2012**; 135: 1237–52.
84. **Nakanishi K, Nakasa T, Tanaka N, Ishikawa M, Yamada K, Yamasaki K, et al.** Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal cord*. **2010**; 48: 192–6.
85. **Jee MK, Jung JS, Im YB, Jung SJ, Kang SK.** Silencing of miR20a is crucial for Ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Hum Gene Ther*. **2012**; 23: 508–20.
86. **Guo CJ, Pan Q, Li DG, Sun H, Liu BW.** miR-15b and miR-16 are implicated in activation of the rat hepatic stellate cell: an essential role for apoptosis. *J Hepatol*, **2009**; 50:766–778.
87. **Truettner JS, Motti D, Dietrich WD.** MicroRNA overexpression increases cortical neuronal vulnerability to injury. *Brain research*, **2013**; 1533: 122–30.
88. **Bao Y, Lin C, Ren J, Liu J.** MicroRNA-384-5p regulates ischemia-induced cardioprotection by targeting phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*, **2013**; 18: 260–70.
89. **Xie W, Li M, Xu N, Lv Q, Huang N, He J, et al.** MiR-181a regulates inflammation responses in monocytes and macrophages. *PloS one*, **2013**; 8:e58639.

90. **Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, Nakanishi K, Kamei N, Yamamoto R, et al.** MicroRNA-223 expression in neutrophils in the early phase of secondary damage after spinal cord injury. *Neuroscience letters*. **2011**; 492: 114-8.
91. **Liu L, Zhang G, Liang Z, Liu X, Li T, Fan J, et al.** MicroRNA-15b enhances hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes via a mitochondrial apoptotic pathway. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death*. **2013**; doi:10.1007/s10495-013-0899-2.
92. **Liu G, Detloff MR, Miller KN, Sgc L, Houle JD.** Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury. *Experimental neurology*, **2012**; 233: 447-56.
93. **Hu JZ, Huang JH, Zeng L, Wang G, Cao M, Lu HB.** Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *Journal of neurotrauma*. **2013**; 30: 1349-60.
94. **He X, Zhang Q, Liu Y, Pan X.** Cloning and identification of novel microRNAs from rat hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin*, **2007**; 39:708-14.
95. **Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG.** Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*, **2005**; 21:1469-77.
96. **Lei P, Li Y, Chen X, Yang S, Zhang J.** Microarray based analysis of microRNA expression in rat cerebral cortex after traumatic brain injury. *Brain Res*, **2009**; 1284, 191-201.
97. **Carthew RW, Sontheimer EJ.** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, **2009**; 136: 642-655.
98. **Doepfner TR, Doebling M, Bretschneider E, Zechariah A, Kaltwasser B, Muller B, et al.** MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation. *Acta neuropathologica*, **2013**; 126: 251-65.
99. **Sun J, Chen Z, Tan X, Zhou F, Tan F, Gao Y, et al.** MicroRNA-99a/100 promotes apoptosis by targeting mTOR in human esophageal squamous cell carcinoma. *Medical oncology*, **2013**; 30: 411.
100. **Ying X, Wei K, Lin Z, Cui Y, Ding J, Chen Y, Xu B.** MicroRNA-125b Suppresses Ovarian Cancer Progression via Suppression of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway by Targeting the SET Protein. *Cell Physiol Biochem*, **2016**; 39(2):501-10.
101. **Tili E, Michaille J, Cimino A, Costinean S, Dumitru C.** Modulation of miR-155 and miR-125b Levels following Lipopolysaccharide/TNF- Stimulation and Their Possible Roles in Regulating the Response to Endotoxin Shock. *J Immunol*, **2007**; 179:5082-5089.
102. **Bruce AJ et al.** Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med*, **1996**; 2: 788-794.
103. **Klusman I, Schwab ME.** Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res*. **1997**; 762: 173-184.
104. **Wang T, Yuan W, Liu Y, Zhang Y, Wang Z, Chen X.** miR-142-3p is a Potential Therapeutic Target for Sensory Function Recovery of Spinal Cord Injury. *Medical Science*, **2015**; 21: 2553-2556.
105. **Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, Fluiter K, Spliet WG, Van Rijen PC, et al.** MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response. *PLoS ONE*, **2012**; 7:e44789.
106. **Nakanishi K, Nakasa T, Tanaka N, Ishikawa M, Yamada K, Yamasaki K, et al.** Responses of microRNAs 124a and 223 following spinal cord injury in mice. *Spinal Cord*, **2010**; 48:192-196.

107. Zhang KH, Xiao HS, Lu PH, Shi J, Li GD, Wang YT, et al. Differential gene expression after complete spinal cord transection in adult rats: an analysis focused on a subchronic post-injury stage. *Neuroscience*, **2004**; 128, 375–388.
108. Martirosyan M, Carotenuto A, Patel A, Kalani M, Yagmurlu K, Lemole G, et al. The role of microRNA Markers in the Diagnosis, Treatment, and Outcome Prediction of Spinal Cord injury. *Frontiers in Surgery*, **2016**; doi: 10.3389/fsurg.2016.00056.
109. Hua J, Zeng L, Huang J, Wang G, Lu H. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats. *Brain Research*, **2015**; Volume 1608, Pages 191–202.
110. Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, et al. Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron*, **2010**; 65: 597–611.
111. Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, et al. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron*, **2010**; 65: 612–626.
112. Sayed D, He M, Hong C, Gao S, Rane S, Yang Z, Abdellatif M. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*, **2010**; 285:20281–20290.
113. Buller B, Liu, X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, Hozeska SA, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J*, **2010**; 277, 4299–4307.
114. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*. **2005**; 65, 6029–6033.
115. Emery E et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *J Neurosurg*, 1998; 89: 911–920.
116. Ujigo S, Kamei N, Hadoush H, Fujioka Y, Miyaki S. Administration of MicroRNA-210 Promotes Spinal Cord Regeneration in Mice. *SPINE*, Volume 39, Number 14, pp 1099 – 1107.
117. Bai M, Zhang M, Long F, Yu N, Zeng A, Zhao R. Circulating microRNA-194 regulates human melanoma cells via PI3K/AKT/FoxO3a and p53/p21 signaling pathway. *Oncol Rep*. **2017**;37(5):2702–2710.
118. Chandran R, Mehta S, Vemuganti R. Non-coding RNAs and neuroprotection after acute CNS injuries. *Neurochemistry International*, **2017**; 1–11.
119. Fleming JC, Norenberg MD, Ramsay DA, Dekaban GA, Marcillo AE, Saenz AD, et al. The cellular inflammatory response in human spinal cords after injury. *Brain*, **2006**; 129, 3249–3269.
120. Beck KD, Nguyen HX, Galvan MD, Salazar DL, Woodruff TM, Anderson AJ. Quantitative analysis of cellular inflammation after traumatic spinal cord injury: evidence for a multiphasic inflammatory response in the acute to chronic environment. *Brain*, **2010**; 133, 433–447.
121. Esposito E, Cuzzocrea S. Anti-TNF therapy in the injured spinal cord. *Trends Pharmacol Sci*. **2011** Feb; 32(2):107–15.
122. Kumar H et al. Propitious Therapeutic Modulators to Prevent Blood-Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury. *Mol Neurobiol*, **2016**; 54 (5), 3578–3590.
123. David S. Recruiting the immune response to promote long distance axon regeneration after spinal cord injury. *Prog. Brain Res*. **2002**; 137, 407–414.

124. **Sanes JR, Jessell TM.** The formation and regeneration of synapses. In: Kandel, E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M. (Eds.). *Principles of neural science*, **2000b**; fourth ed. 1087– 1114.
125. **Diaz Quiroz JF, Tsai E, Coyle M, Sehm T, Echeverri K.** Precise control of miR-125b levels is required to create a regeneration-permissive environment after spinal cord injury: a cross-species comparison between salamander and rat. *Dis Model Mech.* **2014**; 7(6):601-11.
126. **Lu XC, Williams AJ, Yao C, Berti R, Hartings JA, Whipple R, et al.** Microarray analysis of acute and delayed gene expression profile in rats after focal ischemic brain injury and reperfusion. *J. Neurosci. Res.* **2004**; 77, 843e857.
127. **Schmidt-Kastner R, Zhang B, Belayev L, Khoutorova L, Amin R, Busto R, Ginsberg MD.** DNA microarray analysis of cortical gene expression during early recirculation after focal brain ischemia in rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2002**; 108, 81e93.
128. **Alpini G, Glaser SS, Zhang JP, Francis H, Han Y, Gong J et al.** Regulation of placenta growth factor by microrna-125b in hepatocellular cancer. *J Hepatol*, **2011**; 55:1339-1345.
129. **Xu N, Zhang L, Meisgen F, Harada M, Heilborn J, Homey B.** Microrna-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *J Biol Chem*, **2012**; 287:29899-29908.
130. **Zhou JN, Zeng Q, Wang HY, Zhang B, Li ST, Nan X.** Microrna-125b attenuates epithelialmesenchymal transitions and targets stem-like liver cancer cells through small mothers against decapentaplegic 2 and 4. *Hepatology*, **2015**; 62:801-815.
131. **Zhu H, Xie R, Liu X, Shou J, Gu W, Gu S, Che X.** MicroRNA-494 improves functional recovery and inhibits apoptosis by modulating PTEN/AKT/mTOR pathway in rats after spinal cord injury. *Biomed Pharmacother*, **2017**; 92:879-887.

ÖZGEÇMİŞ

Dilek ŞAKER, 1991 yılında Antakya/Hatay’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Antakya’da tamamladı. Ardından 2010 yılında Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü' nü kazandı ve 2014 yılında Bölüm ve Fakülte birincisi olarak mezun oldu. Lisans eğitimi sırasında 2013 yılında Erasmus kapsamında, Vytatus Magnus Üniversitesi (Litvanya) Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü’nde 7 ay süreyle eğitim aldı. Mezuniyetini takiben, 2014 yılında, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. 2015 yılında Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ÖYP Araştırma Görevlisi kadrosuna atandı. Arş. Gör. Dilek ŞAKER, halen aynı anabilim dalında görevini sürdürmektedir.