

***DENEYSEL OMURİLİK HASARI MODELİNDE ANTİOKSİDAN VE LİPİT
PEROKSİDASYON İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ İYİLEŞME ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ***



**T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. BÜNYAMİN KILIÇLI**

TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. ANIL MURAT ÖZTÜRK

İZMİR

ARALIK 2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimine başladığım günden beri bana destek olan Ege Ortopedi ailesine teşekkür ederim.

Tezimin başlangıç ve ilerleme süreçlerinde desteklerini esirgemeyen tez danışmanı hocam Doç. Dr. Murat Öztürk'e teşekkür ederim.

Akademik çalışmalar ile ilgili tüm süreçlerde koşulsuz desteğini esirgemeyen Gülden Köse'ye teşekkür ederim.

Tezimin kurgulanması aşamasından itibaren büyük emekleri ve yönlendirmeleri için Prof. Dr. Güliz Armağan ve ekibine teşekkür ederim.

Tezimizi beraber yaptığımız, beraber çalıştığımız Op. Dr. Arman Vahabi'ye teşekkür ederim.

Sevgili yoldaşım, bu yoldaki destekçim olan biricik eşim Dr. Embiye MUTLU'ya sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Bünyamin KILIÇLI

İzmir

ARALIK 2024

1.ÖZET

Omurilik yaralanması (SCI), motor, duyu ve otonomik fonksiyonların dejeneratif kaybindan kaynaklanır. Uzun süreli engelliliğin önemli bir nedenidir. SCI iki fazda gerçekleşir. İlk olarak, mekanik travmaya bağlı olarak gerçekleşen nöral parankim yıkımı olur ve bu düzeltilemez. Sonrasında sekonder faz aktive olur. Sekonder fazın klinik belirtileri arasında hücre geçirgenliğinde artış, apoptotik sinyalleme, iskemi, vasküler hasar, ödem, eksitotoksisite, iyonik serbestleşme, inflamasyon, lipid peroksidasyonu, serbest radikal oluşumu, demiyelinizasyon, Wallerian dejenerasyonu yer alır. Sekonder hasar mekanizmalarının neden olduğu fonksiyonel hücre kaybının primer hasar sebebiyle meydana gelen kayıp miktarından daha fazla olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle sekonder hasar yolaklarının baskılanması omurilik yaralanması için tedavi arayışlarında bir umut ışığı olarak görülmektedir.

Ferroptoz, demire bağımlı, lipid peroksit birikimi ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışıyla tetiklenen, apoptotik olmayan bir hücre ölümüdür. Apoptoz ve nekrozdan farklı olarak, hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması veya organel şişmesi gibi özellikler göstermez. Ferroptoz, mitokondri büzülmesi ve kristaların kaybıyla morfolojik olarak ayırt edilir. Glutasyon (GSH) ve GPX4 aktivitesinin azalmasıyla lipid peroksitler temizlenemez ve ROS birikimi ferroptozu tetikler. Kanseri ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok rahatsızlıkta önemli bir rol oynar ve tedavi hedefi olarak değerlendirilir. Ayrıca omurilik yaralanmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ferroptozun baskılanmasında temel hedefler; demir birikiminin azaltılması, reaktif oksijen türlerinin kontrol altına alınması ve lipid peroksidasyonunun durdurulmasıdır. Bu yaklaşımlar, terapötik müdahaleler için önemli fırsatlar sunar. Ferroptoz, omurilik yaralanmasının sekonder faz aşamasında etkili olduğu net bir şekilde ortaya konmuştur ancak terapötik bir ajan henüz bulunamamıştır.

Ebselen olarak bilinen 2-Fenilbenzo[d][1,2]-selenazol-3(2H)-on, güçlü antioksidan özelliklere sahip olan, lipide çözünebilen bir seleno-organik bileşiktir. Glutasyon peroksidaz benzeri etkiler göstererek lipid peroksidasyonunu engeller. Bu sayede, hücre zarındaki lipidlerin oksidatif hasara uğramasını önleyerek, ferroptozu inhibe edebilir. Ebselen'in bazı klinik çalışmalarda önemli hücresel toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir, bu da terapötik pencereyi genişleterek daha az toksik olabilecek türevleri keşfetmeyi önemli kılmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında Landgraf ve ark. ürettiği türevlerden Ebselen 9 ve Ebselen 27 yüksek hücresel canlılık sağladıklarından nöroprotektif özellikleri bakımından hayvan çalışmasına uygun bulunmuştur.

Çalışmamız deneysel hayvan modeli olarak tasarlanmıştır. Omurilik hasarı yöntemi olarak klip-kompresyon modeli uygulanmıştır. Biyokimyasal analizler omurilik doku numunelerinden 24.saat, 72. Saatte örnekler alınmıştır. Bu numunelerde Fe^{+2} , GSH, GPX4, TfR1, FPN, MDA, 4-HNE ve ACSL4 düzeyleri çalışılmıştır. 6 haftalık gruplar da fonksiyonel değerlendirme skalası olarak BBB lokomotor skalası kullanılmıştır.

Çalışmada elde edilen veriler ışığında; Ebselen etkisini demir şelasyonu ve GPX4 benzeri aktivite ile göstermiştir. Ebselen demir şelasyonu etkisini 24 saate gösteremezken Ebselen 9 ve Ebselen 27 24. ve 72. saatte demir şelasyonu etkisini göstermiştir. Ayrıca GPX4 düzeylerinde her üç molekülde 24. saatte etkin artırma sağlarken Ebselen 9 ve Ebselen 27 bu etkisini 72. saatte kadar korumuştur. GSH düzeylerine bakıldığında her üç molekülünde 24. ve 72. Saatlerde etkili artırımı gösterdiği görülmektedir. Bu veriler Ebselen ve türevlerinin antioksidan etkinliğini GSH aracılığı ile de yaptığını desteklemekte, hem de ferroptoz açısından önemli bir enzim olan GPX4'ün aktivitesini artırma potansiyeli olduğu gösterilmiştir. Bu potansiyel Ebselen 9 ve 27 özellikle 72. saatte daha anlamlıdır. MDA ve 4-HNE düzeylerine bakıldığında Ebselen'in 24. ve 72. Saatlerde etkin olmadığı görülmektedir. Diğer taraftan Ebselen 9 4-HNE düzeylerini 72.saatte düşürebilmiştir. Ebselen 27 ise MDA seviyelerini 24. ve 72.saatte düşürmüştür. Ebselen 27 MDA seviyelerini Ebselen'e oranla daha etkin düşürmüştür. Ebselen 9 ve 27 lipit peroksidasyonunu uygun şekilde azaltmasa da Ebselen'e göre daha etkin olduğu süreçler mevcuttur. TfR1 seviyeleri açısından Ebselen ve Ebselen 9 etkilerini 24.saatte etkin baskılama sağlayamamıştır ancak Ebselen 27 24. ve 72. Saatte etkin baskılanma oluşturmuştur. Ferroportin seviyelerine bakıldığında ise Ebselen ve Ebselen 9 etkilerini 72.saatte taşıyamamış ancak Ebselen 27 24. ve 72.saatlerde anlamlı etki göstermiştir. ACSL4 baskılanmasını her üç molekülde 24.saatte etkin şekilde yapmamış olup 72.saatte etkin baskılanmayı sağlamışlardır.

Fonksiyonel kazanım olarak değerlendirildiğinde 6 haftalık takip sürecinin sonunda her üç molekül ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Zaman içinde tüm gruplarda anlamlı bir iyileşme görülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Grupların zaman içindeki değişim paterni benzerdir.

Ebselen molekülünün omurilik hasarında antiferroptotik etkinliği bulunmaktadır. Bunu demir metabolizması düzenlemeleri ve GPX4 benzeri aktiviteyi artırarak oluşturmaktadır. Ebselen 9 ve Ebselen 27 etki başlangıçlarının hızlı olması ve daha uzun etki oluşturmaları nedeniyle Ebselen'e üstünlükleri bulunmaktadır. Ayrıca kısmen lipit peroksidasyon ürünlerinin azaltmaları Ebselen'e göre lipit peroksidasyonuna etkileri olduğunu düşündürülebilir.

Ferroptoz yolağı, umut vaaden bir yolak olmasına rağmen omurilik yaralanmasında hala çalışmalar devam etmektedir. Sekonder hücre ölümünün önemli bir değişken olduğu omurilik yaralanmasında, sekonder hasar mekanizmalarını etkin ve güvenli bir şekilde baskılamayı başaran terapötik ajanlar gelecekte kurgulanacak klinik araştırmalara konu edilebilecektir.

Anahtar kelimeler: ferroptoz; Ebselen; Ebselen9; Ebselen 27; omurilik

2. ABSTRACT

Spinal cord injury (SCI) results from the degenerative loss of motor, sensory, and autonomic functions and is a significant cause of long-term disability. SCI occurs in two phases. First, neural parenchymal destruction occurs due to mechanical trauma, which is irreversible. Then, the secondary phase is activated. The clinical manifestations of the secondary phase include increased cell permeability, apoptotic signaling, ischemia, vascular damage, edema, excitotoxicity, ionic release, inflammation, lipid peroxidation, free radical formation, demyelination, and Wallerian degeneration. It has been reported that the functional cell loss caused by secondary injury mechanisms exceeds the loss caused by primary injury. Therefore, suppressing secondary injury pathways is considered a beacon of hope in the search for treatments for spinal cord injury.

Ferroptosis is a form of non-apoptotic cell death triggered by iron dependency, lipid peroxide accumulation, and an increase in reactive oxygen species (ROS). Unlike apoptosis and necrosis, it does not exhibit characteristics such as cell shrinkage, chromatin condensation, or organelle swelling. Ferroptosis is morphologically distinguished by mitochondrial shrinkage and the loss of cristae. Lipid peroxides cannot be cleared due to decreased glutathione (GSH) and GPX4 activity, and ROS accumulation triggers ferroptosis. It plays a critical role in various conditions, including cancer and neurodegenerative diseases, and is considered a therapeutic target. Moreover, it has been shown to be effective in spinal cord injury. The main targets in suppressing ferroptosis are reducing iron accumulation, controlling reactive oxygen species, and stopping lipid peroxidation. These approaches offer significant opportunities for therapeutic interventions. Although it has been clearly demonstrated that ferroptosis is effective in the secondary phase of spinal cord injury, no therapeutic agent has yet been discovered.

Ebselen, known as 2-Phenylbenzo[d][1,2]-selenazol-3(2H)-one, is a lipophilic seleno-organic compound with potent antioxidant properties. By exhibiting glutathione peroxidase-

like effects, it prevents lipid peroxidation. Thus, it may inhibit ferroptosis by preventing oxidative damage to lipids in the cell membrane. Ebselen has been shown in some clinical studies to have significant cellular toxicity, highlighting the importance of discovering derivatives that may widen the therapeutic window with lower toxicity. In cell culture studies, derivatives produced by Landgraf et al., namely Ebselen 9 and Ebselen 27, were found to be suitable for animal studies due to their high cellular viability and neuroprotective properties.

Our study was designed as an experimental animal model. The clip-compression model was applied as a spinal cord injury method. Biochemical analyses were performed on spinal cord tissue samples taken at the 24th and 72nd hours. The levels of Fe²⁺, GSH, GPX4, TfR1, FPN, MDA, 4-HNE, and ACSL4 were measured in these samples. The BBB locomotor scale was used for functional evaluation in the 6-week groups.

Based on the data obtained in the study, Ebselen demonstrated its effect through iron chelation and GPX4-like activity. While Ebselen did not show an iron chelation effect at 24 hours, Ebselen 9 and Ebselen 27 exhibited this effect at both 24 and 72 hours. Furthermore, all three molecules effectively increased GPX4 levels at 24 hours, with Ebselen 9 and Ebselen 27 maintaining this effect until 72 hours. GSH levels were significantly increased by all three molecules at both 24 and 72 hours. These data support the notion that Ebselen and its derivatives enhance antioxidant activity via GSH and increase the activity of GPX4, an enzyme critical to ferroptosis. This potential was particularly significant for Ebselen 9 and 27 at 72 hours.

Regarding MDA and 4-HNE levels, Ebselen was ineffective at 24 and 72 hours. On the other hand, Ebselen 9 was able to reduce 4-HNE levels at 72 hours, and Ebselen 27 reduced MDA levels at both 24 and 72 hours, showing greater effectiveness in lowering MDA levels compared to Ebselen. Ebselen 9 and 27 demonstrated more effective processes in reducing lipid peroxidation compared to Ebselen. In terms of TfR1 levels, neither Ebselen nor Ebselen 9 showed effective suppression at 24 hours, while Ebselen 27 achieved significant suppression at both 24 and 72 hours. Regarding ferroportin levels, Ebselen and Ebselen 9 did not maintain their effects until 72 hours, but Ebselen 27 showed a significant effect at both 24 and 72 hours. For ACSL4 suppression, all three molecules were ineffective at 24 hours but achieved significant suppression at 72 hours.

From a functional recovery perspective, no significant differences were found between the control group and any of the three molecules at the end of the 6-week follow-up period. Over time, significant improvement was observed in all groups, but no statistically significant

difference was detected between the groups. The change patterns over time were similar across the groups.

The anti-ferroptotic efficacy of the Ebselen molecule in spinal cord injury is evident. It exerts this effect by regulating iron metabolism and increasing GPX4-like activity. Ebselen 9 and Ebselen 27 outperform Ebselen due to their faster onset and longer duration of effects. Moreover, their partial reduction of lipid peroxidation products suggests that they might have a more pronounced impact on lipid peroxidation compared to Ebselen.

Although the ferroptosis pathway shows promise, research on spinal cord injury is still ongoing. In spinal cord injury, where secondary cell death is a critical factor, therapeutic agents that can effectively and safely suppress secondary injury mechanisms may become the subject of future clinical research.

Keywords: ferroptosis; Ebselen; Ebselen 9; Ebselen 27; spinal cord

3. İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	III
2. ABSTRACT	V
3. İÇİNDEKİLER.....	VIII
4. ŞEKİLLER	X
5. RESİMLER	XIII
6. TABLOLAR	XIII
7. KISALTMALAR.....	XIV
8. GİRİŞ.....	1
8.1. OMURGA VE OMURILIK	1
8.1.1. Omurga ve Omurilik Embriyolojisi	1
8.1.2. Omurga ve Omurilik Anatomisi.....	5
8.1.2.1 Omurga Anatomisi.....	5
8.1.2.2 Omurilik Anatomisi.....	11
8.1.3. Omurilik Yaralanması	17
8.1.4. Omurilik Yaralanması Patofizyolojisi	22
8.1.4.1. Primer Faz	22
8.1.4.2. Sekonder Faz	22
8.1.4.2.1 Akut Faz	23
8.1.4.2.2. Subakut Faz.....	28
8.1.4.2.3 Kronik Faz.....	30
8.1.4.3 Omurilik Yaralanmasında Güncel Tedavi Seçenekleri	32
8.2. FERROPTOZ.....	35
8.2.1. Ferroptozu Etkileyen Mekanizmalar	36
8.2.1.1. Demir Metabolizması.....	36
8.2.1.2. Lipid Peroksidasyonu	36
8.2.1.3. Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Azalması.....	37
8.2.1.4. Glutasyon Peroksidaz 4 (GPX4) İnhibisyonu	37
8.2.1.5. Mitokondriyal Disfonksiyon	37
8.2.1.6. p53 Yolu	38
8.2.1.7. Koenzim Q10 (CoQ10) ve FSP1(Ferroptoz Baskılayıcı Protein 1)	38
8.2.1.8. Otofaji.....	38
8.2.2. Ferroptoz Yolağının Etkili Olduğu Hastalıklar.....	39
8.2.2.1 Ferroptoz ve Tümör.....	39
8.2.2.2 Ferroptoz ve Nörolojik Hastalıklar	41

8.2.2.3. Ferroptoz ve İnme	42
8.2.2.4. Ferroptoz ve Travmatik Beyin Hasarı(TBI)	42
8.2.2.5 Ferroptoz ve Akut Böbrek Yetmezliği (AKI).....	43
8.2.2.6. Ferroptoz ve Omurilik Yaralanması.....	43
8.3. EBSELEN.....	44
8.3.1. Ebselen Molekül Yapısı	45
8.3.2. Ebselen'in Kullanım Alanları.....	47
8.3.3. Ebselen ve Ferroptoz	49
8.3.4. Ebselen ve Omurilik Yaralanması	50
8.4. EBSELEN TÜREVLERİ.....	51
8.4.1. Ebselen 9 Molekül Yapısı ve Özellikleri	52
8.4.2 Ebselen 27 Molekül Yapısı ve Özellikleri.....	53
9. HİPOTEZ	54
10. GEREÇ VE YÖNTEM	55
10.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÖZELLİKLER	55
10.2. OMURİLİK HASARI OLUŞTURMA YÖNTEMİ.....	58
10.3. CERRAHİ YÖNTEM.....	59
10.4. EBSELEN VE TÜREVLERİNİN HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI	62
10.5. SIÇANLARIN CERRAHİ SONRASINDA BAKIM VE TAKİBİ.....	63
10.6. SIÇANLARIN SAKRİFİYE EDİLMESİ VE ÖRNEK ALIMI	64
10.7. FONKSİYONEL DEĞERLENDİRME VE LOKOMOTOR AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ.....	64
10.8. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME.....	66
10.8.1. Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri.....	66
10.8.1.1. Lipit Peroksidasyonu	67
10.8.1.2. Demir Metabolizmasının Değerlendirilmesi.....	68
10.8.2. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilme Zamanı.....	70
10.9. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	70
10.9.1. Elde Edilen Sonuçların İşlenmesi	71
10.9.2. Verilerin Gözlemciler Arası Uyumu	71
10.9.3. İstatistiksel Analiz	71
11. BULGULAR	71
11.1 BİYOKİMYASAL SONUÇLAR.....	71
11.1.1 Fe^{+2} Düzeyi Ölçümleri	71
11.1.2 MDA Düzeyleri Ölçümleri.....	73
11.1.3 GSH Ölçümleri.....	75
11.1.4. 4-HNE Düzeyi Ölçümleri.....	77

11.1.5. GPX4 Düzeyi Ölçümleri	79
11.1.6. TfR1 Düzeyi Ölçümleri	82
11.1.7. Ferroportin (FPN) Düzeyi Ölçümleri.....	85
11.1.8. ACSL4 Düzeyi Ölçümleri	87
11.2 FONKSİYONEL SONUÇLAR.....	90
11.2.1 Basso Beattie Bresnahan (BBB) Lokomotor Değerlendirme Skalası Ölçümleri....	90
12. TARTIŞMA	90
12.1 EBSELEN VE OMURİLİK YARALANMASI	91
12.2 EBSELEN VE TÜREVLERİNİN OMURİLİK HASARINDAKİ ETKİLERİ.....	94
12.3. FONKSİYONEL SKORLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	96
12.4 SINIRLILIKLAR.....	97
13. SONUÇ	98
14. PROJE BÜTÇE DESTEĞİ.....	98
15. REFERANSLAR.....	98

4. Şekiller

Şekil-1: Üçüncü hafta gerçekleşen trilaminer germ diskinin oluşumu

Şekil-2: Notokordal süreçlerin gelişimi

Şekil-3: Nöral Plaka ve Notokord

Şekil-4: 4. haftada nöroporların kapanması ve somitlerin oluşumu

Şekil-5: A, Servikal, torasik, lomber ve sakral bölgeleri gösteren yan görünüm. B, Ön görünüm.

Şekil-6: Omurga kemik yapıları ve fonksiyonları

Şekil-7: Trabeküler kemik yapısı ve intervertebral disk anatomisi

Şekil-8: Omurilik ve epidural aralık

Şekil-9: Omurilik segment anatomisi

Şekil-10: Omurilik enine kesiti ve spinal sinir yapısı

Şekil-11: Rexed Laminaları ve Omurilik gri maddesi

Şekil-12: Omurilik enine kesitte spinal arterler

Şekil-13: Travmatik omurilik yaralanmasının global yaygınlığı. 2016 yılında ülkeye göre 100.000 kişi başına TSCI'nin yaşa göre standardize edilmiş yaygınlığını göstermektedir.

Şekil-14: Sekonder faz aşamasında omurilik hasar mekanizmaları

Şekil-15: Fenton reaksiyonu

Şekil-16: SCI sonrasında inflamasyondan sorumlu hücrelerin günlere göre dağılımı

Şekil-17: SCI fazlarında gerçekleşen yolaklar

Şekil-18: Ferroptozu düzenleyen mekanizmalar

Şekil-19: Ebselen 2D molekül yapısı

Şekil-20: Ebselen'in ROS inaktivasyon döngüsü

Şekil-21: Ebselen'in ferroptoz yolağına katıldığı basamakalar

Şekil-22: Ebselen'in ilk üretilen türevleri

Şekil-23: Ebselen 9 molekül yapısı

Şekil-24: Ebselen 27'nin üretildiği reaksiyon ve molekül yapısı

Şekil-25: Suchek/Landgraf ve ark. tarafından üretilen ve tarafımıza uygun şartlarda gönderilen Ebselen 9 ve 27'nin transfer formu ve bileşik yapıları

Şekil-26: Fe^{+2} düzeylerinin çoklu çapraz analizleri * $p<0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p<0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; $\Delta p<0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; $\Omega p<0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

Şekil 27: MDA düzeylerinin çoklu çapraz analizleri; * $p<0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p<0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

Şekil 28: GSH seviyesi ölçümlerinin çapraz analizleri; * $p<0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p<0.05$; Ebselen tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; $\Delta p<0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; $\Omega p<0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; & $p<0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. Ebselen tüm gruplar; $\pi p<0.05$; 72sa Ebselen 27 vs. 72sa Ebselen

Şekil-29: 4-HNE ölçümleri elektroforez görüntüleri

Şekil-30: 4-HNE düzeylerinin çapraz analizi; ; * $p<0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p<0.05$; 72sa Ebselen 9 vs. 72sa Ebselen

Şekil-31: GPX4 ölçümleri elektroforez görüntüleri

Şekil-32: GPX4 çapraz analizleri; * $p<0.05$; 24sa Ebselen vs. 72sa SCI; 24sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI; ; # $p<0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

Şekil-33: TfR1 ölçümleri elektroforez görüntüleri

Şekil-34: TfR1 Düzeyi Ölçümleri Çapraz Analizi; * $p<0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; $\Delta p<0.05$; 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI; # $p<0.05$ Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

Şekil-35: Ferroportin seviyeleri ölçümleri elektroforez görüntüleri

Şekil-36: FPN seviyelerinin çapraz analizleri ; * $p<0.05$; 24sa Ebselen vs. 24sa SCI; $\Delta p<0.05$; Ebselen 27 tüm grupları vs. SCI tüm gruplar; # $p<0.05$ 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI

Şekil-37: ASCL4 ölçümleri elektroforez görüntüsü

Şekil-38: ASCL4 ölçümleri Çapraz Analizleri; * $p<0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; $\Delta p<0.05$; 72sa Ebselen 27 vs. 72sa SCI ; # $p<0.05$ 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI.

Şekil-39: BB Skor Analizlerinin Haftalara Göre Değişimi

Şekil-40 : Ebselen'in Ferroptozda etkin olduğu basamaklar

Şekil-41: BBB skorlarının haftalık değişimi

5. Resimler

Resim-1: İntadural kemik tümörü nedeniyle omurilik yaralanması oluşan hastanın mrg görüntüleri.

Resim-2: Omurilik yaralanmasında görüntüleme A: bilgisayarlı tomografi B: MRI T2 sagittal C: MRI T2 aksiyal görüntüler

Resim-3: Anestezi altında bir Sprague-Dawley Sıçan

Resim-4: Klip-Kompresyon yönteminde kullanılan klipler ve anestezi altında laminektomi sonrasında omuriliği klip kompresyon yöntemi ile hasar verilmesi

Resim-5: Sıçan anatomik yapısı ve anestezi altında posterior elemanları ayrılmış cerrahi alan

Resim-6: Cerrahi aşamaları: A: Paraspinal kasların ayrılması sonrasında spinöz proseslerin ortaya konması B: Laminektomi aşaması C: Hemo-klip yerleştirilmesi

Resim-7: Klip-kompresyon yöntemi sonrasında omurilikte oluşan hematoma mikroskopa altında(A) ve klinik görünümü(B)

6. Tablolar

Tablo -1: Vertebraların spinöz prosesleri ve ilişkili yapılar

Tablo 2: Spinal sinirlerin omurga IVF'den çıkış seviyeleri

Tablo-3: Omurilik inen-çıkan yollar ve özellikleri

Tablo- 4 : ASIA skorlaması

Tablo-5: SCI'da tedavi yöntemleri ve öneriler

Tablo-6: SCI'de kullanılan hedef ajanlar

Tablo-7: Omurilik yaralanması ve ferroptoz ilişkili yollar

Tablo-8: Ebselen'in kullanım alanları

Tablo-9: BBB skor tablosu

7. Kısaltmalar

Kısaltma	Anlamı
SCI	Omurilik yaralanması
ROS	Reaktif oksijen türevleri
GSH	Glutasyon
GPx/GPx1/GPx4	Glutasyon peroksidaz /1/4
TfR1/2	Transferrin reseptörü 1/2
FPN	Ferroportin
MDA	Malondialdehit
4-HNE	4-Hidroksinenal
ACSL4	Asetil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4
BBB	Basso, Beattie and Bresnahan
CNS	Merkezi sinir sistemi
IVD	İntervertebral disk
IVF	İntervertebral foramen
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
IV	intervertebral
ATLS	Gelişmiş travma yaşam desteği
ASIA	Amerikan Omurilik Yaralanması Derneği Skorlaması
BT	Bilgisayarlı tomografi
Mrg/Mr1	Manyetik rezonans görüntüleme
IL	interlökin
TNF-a	Tümör nekroz faktör alfa
NMDA	N-metil-D-aspartat
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit
ETC	Elektron transfer sistemi
RNS	Reaktif nitrojen türevleri
AAD	Akut aksonal dejenerasyon
ECM	Ekstrasellüler matriks
TLR4/MyD88	Toll benzeri reseptör 4/ Miyeloid farklılaşması birincil yanıtı 88

AANS/CNS	Amerikan Nöroşirurji Derneği
ISNCSCI	Uluslararası Omurilik Yaralanması Nörolojik Sınıflandırma Standartları
MPSS	Metilprednizolon
NASCIS	Ulusal Omurilik Yaralanması Çalışmaları
MAP	Ortalama arteriyel basınç
SV2A	Sinaptik vezikül glikoprotein 2a
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
STEAP3	Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3
PE	Fosfatidiletanolamin
AA	Araşidonik asit
LPCAT3	Lizofosfatidilkolin asil transferaz 3
LOX	lipooksijenaz
Sistem Xc ⁻	Sistin/glutamat antiporter sistemi
SLC7A11/SLC3A2	Sistin taşıyıcı çözünen taşıyıcı ailesi 7/ 3
GSSG	Okside glutatyon
L-OOH	Lipit peroksit
L-OH	Alkol
VDAC	Voltaaj bağımlı anyon kanalları
CDKN1A	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1A
CoQ10	Koenzim Q
FSP1	Ferroptoz baskılayıcı protein 1
CN-A	artesanat, Cotylenin A
Rb	Retinoblastom
HCC	Hepatosellüler karsinom
CDO-1	Sistein dioksijenaz tip 1
CRC	Kolorektal karsinom
TNBC	Üçlü negatif meme kanseri
NFS1	Sistein desülfüras
ccRCC	Berrak hücreli renal karsinom
ACL	Adrenokortikal karsinom
AH	Alzheimer hastalığı
PD	Parkinson hastalığı

DFO	deforoksamin
HD	Huntington hastalığı
Fer-1	Ferostatin-1
ALS	Amiyotrofik lateral skleroz
FRDA	Friedreich ataksi
NAC	N-asetil sistein
TBI	Travmatik Beyin yaralanması
AKI	Akut böbrek yetmezliği
I/R	İskemi/ reperfüzyon
PCD	Programlanmış hücre ölümü
NO	Nitrik oksit
LDL/HDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein/ yüksek yoğunluklu lipoprotein
EBS-SeH	Selenol
EBS-Se-OH	Selenenik asit
EBS-Se-SG	Selenil sülfid
TrxR	Tioredoksin redüktaz
H2O2	Hidrojen peroksit
DHA	Dehidroaskorbik asit
VPN	Ventroposterior nükleus
IMPase	İnositol monofosfataz
meHG	Metil-civa
iNOS	Nitrik oksit sentetaz
Nrf2	Nükleer Faktör Eritroid 2 ile İlişkili Faktör 2
OGD/R	Oksijen/glukoz yoksunluğu- reperfüzyon
SH-SY5Y	İnsan nöroblastoma hücreleri,
LPO/LPS	Lipit peroksidasyonu
DMSO	Dimetil sülfoksit
TBA	Tiyobarbitürik asit
HPLC/GC-MS	Sıvı kromatografi /kütle spektrometresi
GCL	Glutamat sistein ligaz
Tf	Transferrin
DMT1	Memeli membran demir taşıyıcısı-1
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel fotometrisi

BCA	Bikinkoninik asit
sa	saat
SOD	Süperoksit dismutaz
HMC3	Mikroglia hücreleri



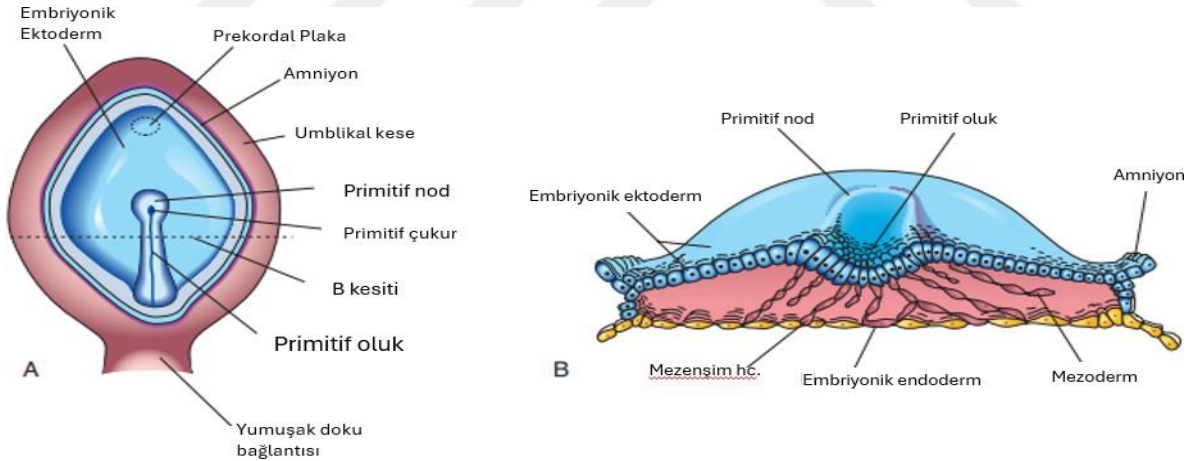
8. GİRİŞ

8.1. Omurga ve Omurilik

8.1.1. Omurga ve Omurilik Embriyolojisi

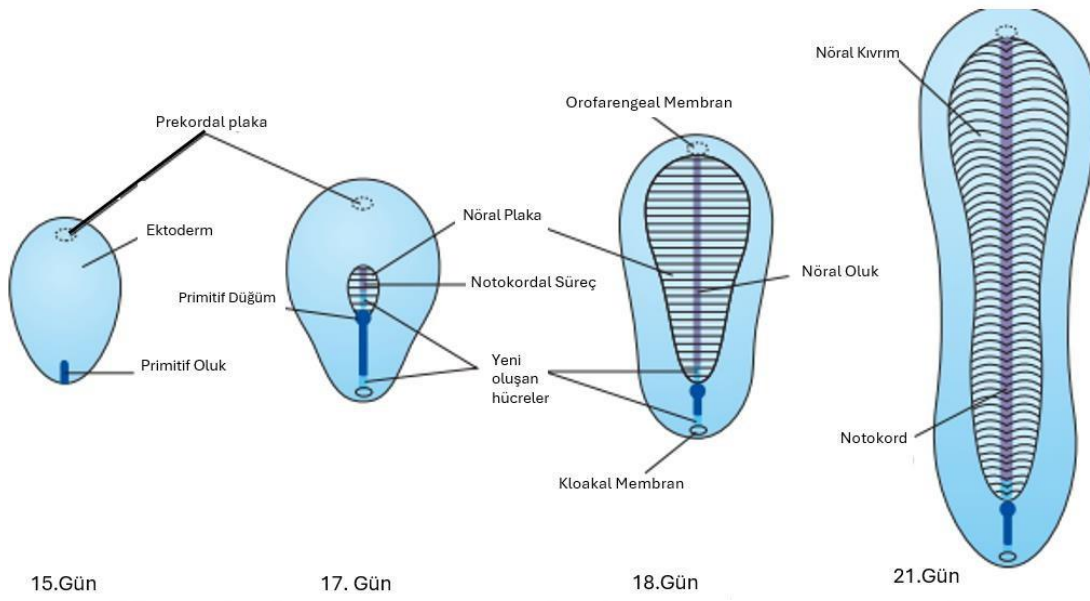
Vertebralar ve omurganın gelişimi gebeliğin üçüncü haftası ile şekillenir. Erken gelişim aşamasında embriyo, bilaminar germ diski adı verilen iki hücre katmanından oluşan bir yapıdır. Yaklaşık gebeliğin on beşinci gününde, germ diskinin orta hattında bir oluk oluşur. Bu oluğa primitif oluk denir.

Embriyogeneze üçüncü haftasında gastrulasyon denilen iki katmanlı tabakanın üç katmanlı bir yapı halini alması durumu gerçekleşir. Gastrulasyon vücut formunun gelişiminin başlangıcıdır. Gastrulasyonun ilk sinyali primitif oluğun oluşmasıdır(2,3). Primitif oluğun oluşmasından kısa süre endoderm ve ektoderm arasında mezenşim adı verilen ve ileride vücudun bağ ve destek tabakasının kökeni olacak hücreler gelişir. Bu hücreler trilaminar germ diskinin orta tabakası olan mezoderme farklılaşırlar. Epiblast hücrelerinin primitif oluk boyunca çoğalması ve göç etmesiyle trilaminar germ diski oluşur (Şekil-1). Üç tabaka endoderm, ektoderm ve mezoderm olarak adlandırılır.



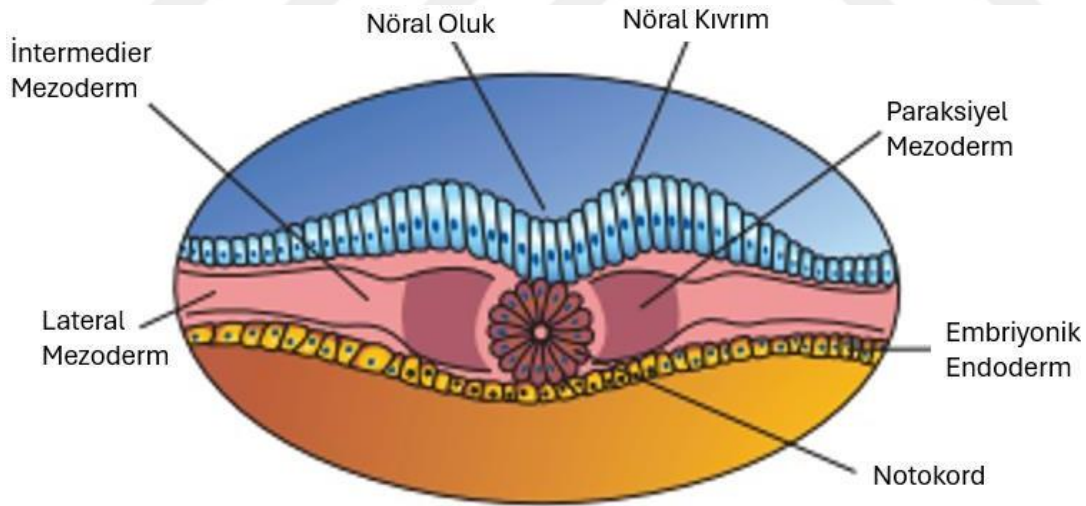
Şekil-1: Üçüncü hafta gerçekleşen trilaminar germ diskinin oluşumu(4).

Primitif oluk, kalan hücrelerin mezodermi oluşturması ile gerileyerek dördüncü haftada kaybolur. Mezoderm yapısından iki yapı gelişir: prekordal plaka ve notokord. Primitif oluktan gelen sinyaller notokord öncü hücreleri ve sonrasında notokordun kendisini oluşturmak için indükler (Şekil-2). Notokord vertebra gövdelerinin oluşumunu tetikler ve erken vertebra gövdeleri notokord etrafında birleştikçe, dejenere olur ardından notokord her bir vertebranın nükleus pulposusu haline gelir(2,3).



Şekil-2: Notokordal süreçlerin gelişimi(4)

Notokord , aksiyal kas-iskelet yapılarının ve merkezi sinir sisteminin (CNS) gelişimi için gerekli sinyalleri için birincil indiktördür(2). Notokordun gelişmesi ile trilaminar germ diskinin üstteki tabakası olan ektodermde kalınlaşma ve merkezi sinir sistemini oluşturacak olan nöral plakayı oluşumu başlar(2)(şekil -3).



Şekil-3: Nöral Plaka ve Notokord(4)

Nöral plaka, nöral tüpü oluşturacak şekilde farklılaşmaya devam ederken nöral plaka ve yüzey ektodermi arasındaki hücreler farklılaşarak nöral krest hücrelerini oluşturur(2). Nöral krest hücreleri nöral tüpün dorsolateraline sağ ve solda olacak şekilde yerleşir. Nöral krest

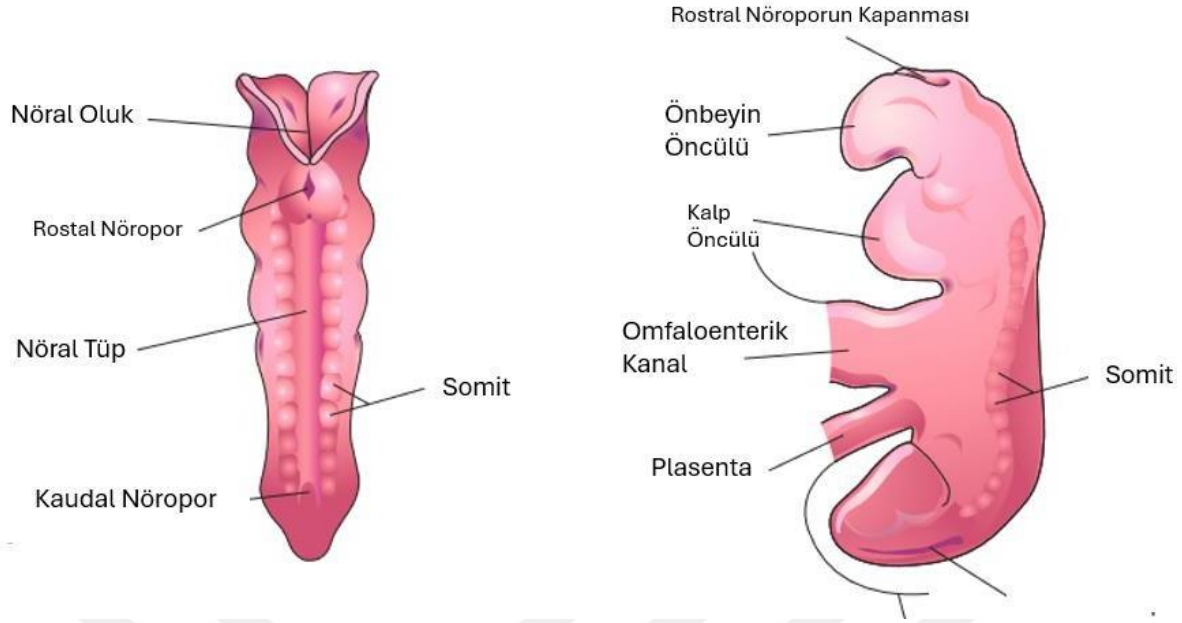
hücreleri spinal dorsal kök ganglionları ve otonom sinir sisteminin ganglionlarını oluşturur. Bunların yanı sıra periferik sinir sisteminin nörolemmal kılıflarını oluşturur.

Notokordun gelişimini takiben, mezoderimde üç farklı yapı oluşur: paraksiyal mezoderm, ara mezoderm ve lateral mezoderm. Üçüncü haftanın sonuna doğru, paraksiyal mezoderm farklılaşır, yoğunlaşır ve kraniyokaudal bir dizi boyunca somitler (Yunanca soma, vücut) adı verilen yuvarlak cisimlere bölünmeye başlar(2,3).

İnsan gelişiminin somit döneminde (20 ila 30. günler) yaklaşık 38 çift somit oluşur. Somitlerin boyutu ve şekli hücre-hücre etkileşimleri tarafından belirlenir. Beşinci haftanın sonunda 42 ila 44 çift somit mevcuttur. Yakında kraniyokaudal olarak gelişirler ve aksiyal iskeletin ve ilgili kasların çoğunun yanı sıra cildin bitişik dermisini de oluştururlar. Başlangıçta 42-44 tane olan somit çiftleri notokordu sarar, terminal 5-7 somit çifti gerileyerek kaybolur. Somit 5-12 servikal omurgayı oluşturur (8 servikal somit vardır, ancak sadece 7 servikal vertebra vardır, çünkü ilk servikal somit oksiput oluşumuna katılır). Somit 13-24 torasik omurların, somit 25-29 lomber omurların ve somit 30-34 sakral omurların oluşumuna katılır. Üç kaudal, terminal somit çifti terminal embriyonik kuyruğun gerilemesinden sonra devam eder ve kuyruk sokumunu oluşturur.

Nörülasyon (nöral plak ve nöral tüpün oluşumu) dördüncü haftada (22-23 gün) dördüncü ila altıncı somit çifti bölgesinde başlar. Bu aşamada, nöral plaka ve tüpün dördüncü somit çiftine kadar kaudalindeki kranyal üçte ikisi gelecekteki beyni temsil eder ve nöral plaka ve tüpün kaudal üçte ikisi gelecekteki omuriliği temsil eder. Nöral tüpün lümeni, amniyotik boşlukla serbestçe iletişim kuran nöral kanal haline gelir. Kranial açıklık (rostral nöropor) yaklaşık 25. günde, kaudal nöropor ise yaklaşık 27. günde kapanır. Nöral tüpün duvarındaki nöroprogenitör hücreler kalınlaşarak beyni ve omuriliği oluşturur(2).

Primordial omurilik, nöral plağın kaudal kısmından gelişir. Dördüncü somit çiftinin kaudalindeki nöral tüp, omuriliğe doğru gelişir. Nöral tüpün yan duvarları kalınlaşır Başlangıçta nöral tüpün duvarı kalın, psödostratifiye, kolumnar nöroepitelden oluşur. Bu nöroepitelyal hücreler, omurilikteki tüm nöronlara ve makrogial hücrelere (makroglia) ve epididimal hücrelere farklılaşır. Bu bölge, omurilik ganglionları ve beyindeki sinir hücresi gövdelerinden gelen aksonların bulunduğu omuriliğin beyaz maddesi haline gelir (Şekil-4).



Şekil-4: 4. haftada nöroporların kapanması ve somitlerin oluşumu(4)

Gelişmekte olan omurilikteki nöroepitelyal hücrelerin çoğalması ve farklılaşması, omuriliğin yan duvarlarının farklı kalınlaşmasına neden olur. Bu kalınlaşma her iki taraftan sulcus limitans oluşturur. Bu yapının dorsal kısmı alar plak, ventral kısmı bazal plak olarak adlandırılır. Alar ve bazal plaklar, gelişmekte olan omuriliğin uzunluğunun büyük bir kısmı boyunca uzanan uzunlamasına çıkıntılar üretir. Bu bölgesel ayrım temel öneme sahiptir çünkü alar ve bazal plaklar daha sonra sırasıyla afferent ve efferent fonksiyonlarla ilişkilendirilir(2,4).

Embriyo geliştikçe somitler alt bölümlere ayrılır. Ortaya çıkan ilk somit alt bölümleri sklerotomlardır. Sklerotomlar nihayetinde omurgayı oluşturur. Vertebra gövdesi ve vertebral ark gelişimi, altta yatan notokord ve nöral tüp tarafından sklerotom indüksiyonuna bağlıdır. Sklerotomlar oluşup notokord ve nöral tüpe bitişik hale geldiğinde, her bir sklerotom bölünerek spinal sinirlerin nöral tüpten çıkmasına izin verir(4).

Notokord, gelişmekte olan omurga gövdeleri tarafından çevrelendiği yerde dejenere olur ve kaybolur. Omurlar arasında notokord genişleyerek intervertebral diskin jelatinimsi merkezini, yani nükleus pulposus oluşturur. Bu çekirdek daha sonra annulus fibrosus'u oluşturan dairesel olarak düzenlenmiş liflerle çevrelenir.

Altıncı haftada mezenkimal omurgada kondrifikasyon merkezleri gelişir. Spinöz ve spinöz süreçler bu kondrifikasyon merkezlerinden gelişir. Omurganın kemikleşmesi yedinci haftada başlar ve yaşamın 25. yılına kadar devam eder. Ventral ve dorsal olmak üzere iki ana kemikleşme merkezi vardır. Sekizinci haftada vertebra üç ana yapıdan oluşur:vertebral ark,

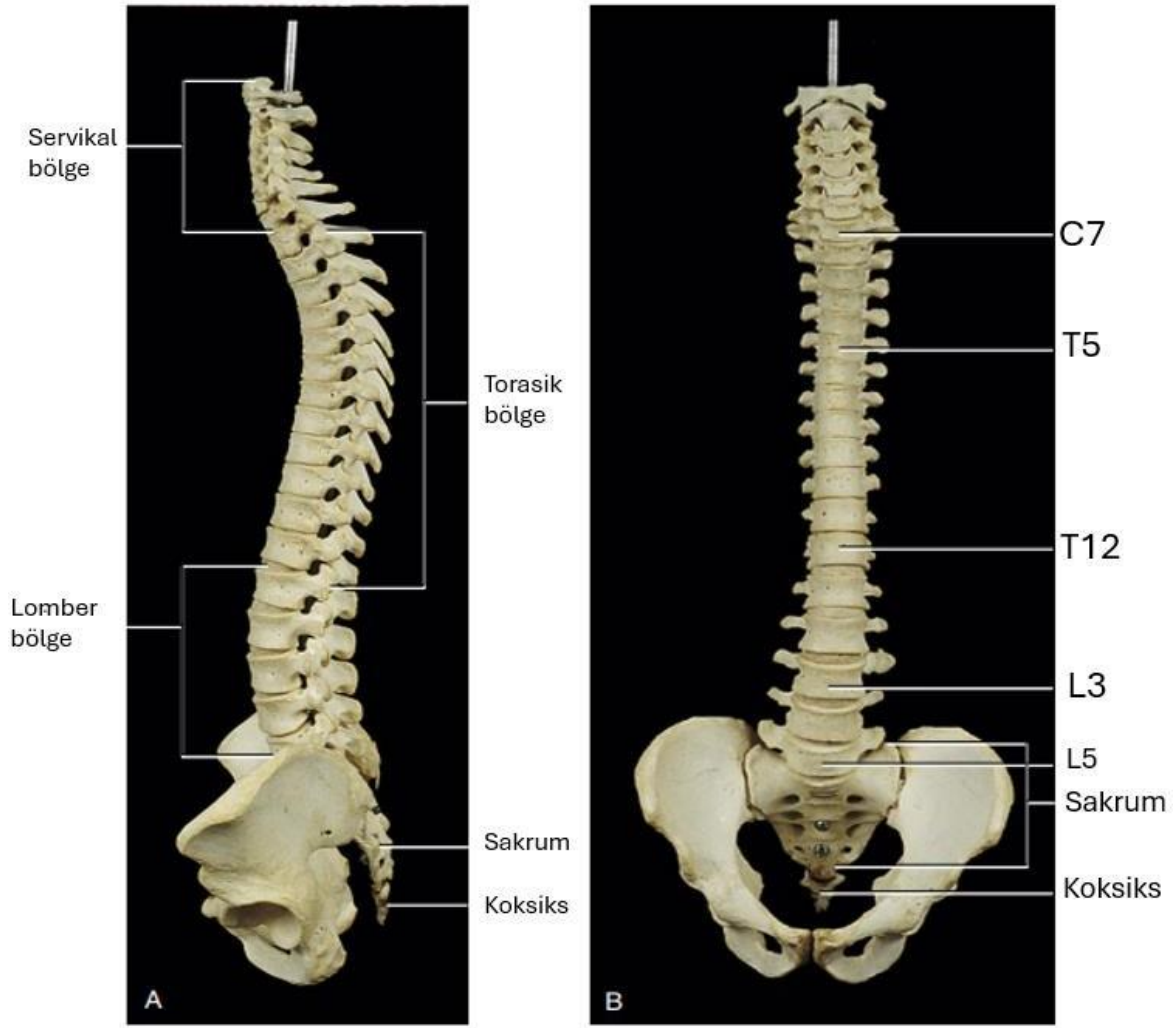
vertebral gövde ve transvers proceşler. Vertebral arkların kemik çıkıntıları yaşamın ilk 5 yılında kemikleşir(4).

8.1.2. Omurga ve Omurilik Anatomisi

8.1.2.1 Omurga Anatomisi

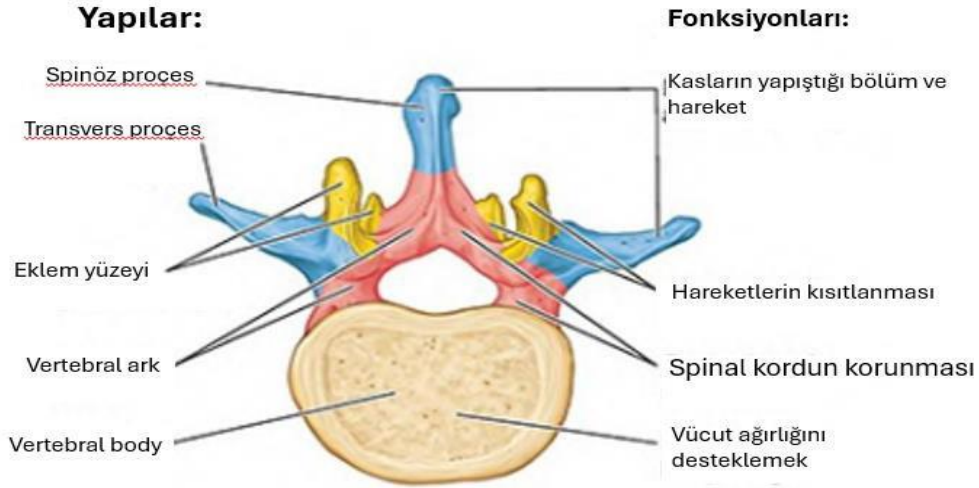
Erişkin bir vertebral kolonda beş bölgeye ayrılmış, 33 vertebradan oluşur: 7 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral, 4 koksigeal. Vertebral kolonda önemli hareket üst vertebralarda oluşur. 9 alt vertebradan 5 sakral vertebra sakrumu oluşturur. 4 koksigeal vertebra otuz yaşından sonra kaynaşarak koksiksi oluşturur(5). Bu kaynaşma ile sakrum ve koksiks diğer 24 mobil segmentten ayrılır

Omurga önden arkaya doğru dört farklı eğriliği ile dikkat çeker. Öne doğru içbükey eğriliklere kifoz, arkaya doğru içbükey eğriliklere lordoz denir. Omurganın iki kifoz ve iki lordoz olmak üzere dört adet eğriliği bulunmaktadır. İki kifoz olan eğrilikler primer eğrilikler olarak adlandırılır (torasik kifoz ve pelvik kifoz). Bunun nedeni bu eğriliklerin yaşamın erken evrelerinde oluşmasıdır (Şekil-5). Torasik eğrilik T2 ile T12 vertebralar arasında oluşur, pelvik eğrilik ise sakral vertebralarla koksiks kemiği arasındadır. İkincil eğrilikler ise servikal lordoz ve lomber lordozdur. Bu eğrilikler intrauterin dönemde tespit edilebilseler bile doğum sonrası dönemde belirginleşirler. Servikal lordoz bebek başını tutmaya başladığında servikal vertebralar boyunca gelişir. Lomber lordoz ise çocuk yürümeye hazır olduğunda erektör spina kasının çekmesine bağlı olarak gelişir. Lomber lordoz T12 ile L3 arasında gelişir.



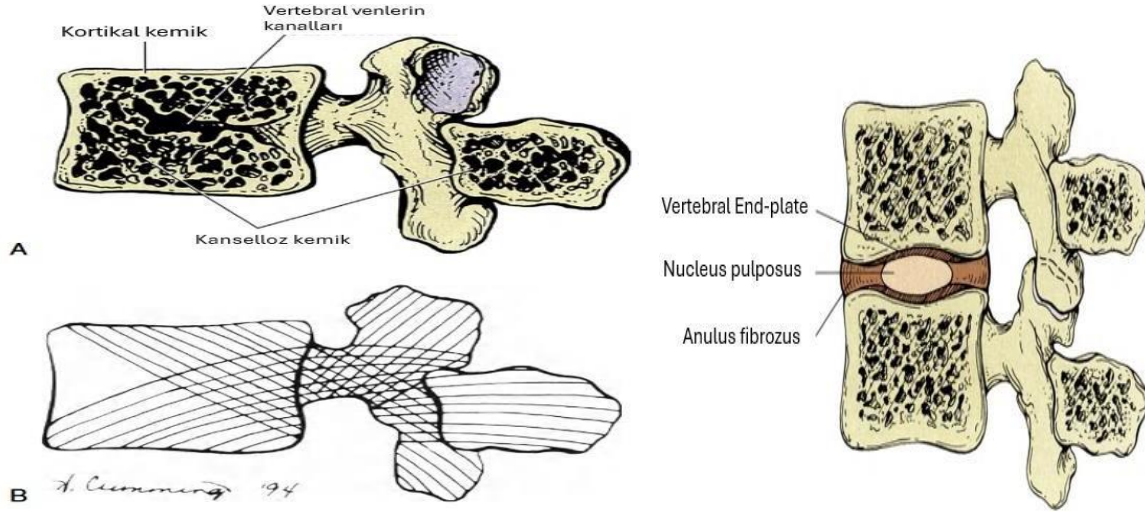
Şekil-5: A, Servikal, torasik, lomber ve sakral bölgeleri gösteren yan görünüm. B, Ön görünüm(6).

Omurgalar, omurganın bir bölgesinden diğerine ve her bölge içinde daha az ölçüde boyut ve diğer özellikler açısından farklılık gösterir; ancak temel yapıları aynıdır. Tipik vertebra iki parçaya ayrılabilir: vertebral gövde ve vertebral ark (posterior ark)(Şekil-6). Vertebral gövde kolonun ön kısmını destekleyen bir yapıdır. Vertebral kolon aşağı doğru indikçe, her biri giderek daha fazla vücut ağırlığı altında kaldığından, vertebral gövdelerin boyutu en belirgin şekilde T4'ten aşağıya doğru artar. Vertebral gövdelerin enine çapı C2'den L3'e doğru artar.



Şekil-6: Omurga kemik yapıları ve fonksiyonları(6)

Vertebral gövde dışta ince bir kortikal kemik ve onun içerisinde vasküler yapıları barındıran trabeküler(spongioz) kemikten oluşur. Trabeküler kemik, çoğunlukla kısa, yatay trabeküllerle kesişen uzun dikey trabeküllerden oluşan bir ağırdır (Şekil-7). Yaşam boyunca, vertebral gövdenin üst ve alt yüzeylerinin çoğu, kemiğin geliştiği kıkırdaklı modelin kalıntıları(notokord) olan hiyalin kıkırdak diskleri ile kaplıdır. Bunlara intervertebral disk (IVD) denir. IVD'ler C2'den L5 ile ilk sakral segment arasındaki vertebra gövdeleri arasındaki ekleme kadar bitişik vertebral gövdeler arasında yer alır. İki bitişik vertebral gövde ve araya giren IVD tarafından oluşturulan eklem, simfiz olarak sınıflandırılır(7). IVD'ler vertebral kolonun yüksekliğinin %20 ila %33'ünü oluşturur(8). IVD'nin işlevi, iki bitişik vertebral gövde arasındaki değişken boşluğu korumaktır. Aynı zamanda hareket ve ağırlık taşıma görevleri de vardır. Disk, omurganın esnekliğine yardımcı olurken, omurga segmentleri arasında yalnızca makul miktarda hareketin meydana gelmesini sağlar. Tüm diskler, merkezi bir nükleus pulpozus ve etrafında onu çevreleyen annulus fibrozus'tan oluşur. Intervertebral disklerin içeriği su, esas olarak kondrosit benzeri hücreler ve fibroblastlar, proteoglikan agregatları ve tip I ve II kolajen liflerinden oluşur(Şekil-7). Nükleus pulpozus %70-90'ı sudan oluşan mukoid bir maddedir, kuru ağırlığının %65'i proteoglikan, %20'si kolajendir. Annulus fibrozusun %60-70'i sudan oluşur ve çok yönlü gerilimlere dayanması için ardışık lamellar kolajen liflerinden oluşur. Kuru ağırlığının %50-60'ı kolajen ve %20'si proteoglikandan oluşur. IVD'ler vücuttaki en büyük avasküler yapılardır. Beslenmelerini vertebra gövdesindeki uç plakadan difüzyon yolu ile gerçekleştirirler.



Şekil-7: Trabeküler kemik yapısı ve intervertebral disk anatomisi(6)

Vertebral ark vertebral gövdenin arkasında devam eder ve iki (sağ ve sol) pedikül ve laminadan, superior ve inferior eklem yüzlerinden, transvers ve spinöz süreçlerden oluşur. Pediküller, vertebral gövdeden arkaya doğru uzanan ve lamina adı verilen iki geniş, düz kemik yapısıyla birleşen kısa silindirik çıkıntılardır. Her bir vertebranın spinöz süreci laminerden posterior ve sıklıkla inferior olarak çıkıntı yapar. Bu çıkıntının boyutu, şekli ve yönü vertebral kolonun bir bölgesinden diğerine büyük ölçüde değişir. Spinöz süreçlere yapışan kaslar duruş sırasında omurgaların hareketinden sorumludur(7). Belirli spinöz süreçler vücutta belli anatomik yapıları gösterir (Tablo-1).

Tablo -1: Vertebraların spinöz süreçleri ve ilişkili yapılar

Palpe edilen yapı	Spinöz süreç	Seviyedeki yapılar
Vertebra prominens	C7	Tiroid istmusu, akciğerlerin apexi
Spina skapula	T3	Superior vena cava
Spina skapula	T4	Aortic ark
Skapulanın alt ucu	T7	Meme ucu,
	T9-10	Diyafragma, akciğer basisi

12. kaburga	L2	Omurilik conus medullaris
İlliak krest	L4	Aortik bifurkasyon
Posterior superior illiak spine	S2	Subaraknoid aralığın sonu

Transvers proçesler pedikül ve laminanın birleşme noktasından lateral olarak çıkıntı yapar. Spinöz procesler gibi, bunların tam yönü omurganın bir bölgesinden diğerine önemli ölçüde değişir. Transvers proçesler kas bağlanma yerleridir ve spinal kaslar tarafından kaldıraç kolları olarak kullanılır. Transvers çıkıntılara bağlanan kaslar duruşu sağlar ve tek omurların ve omurganın tamamının rotasyonunu ve lateral fleksiyonunu başlatır.

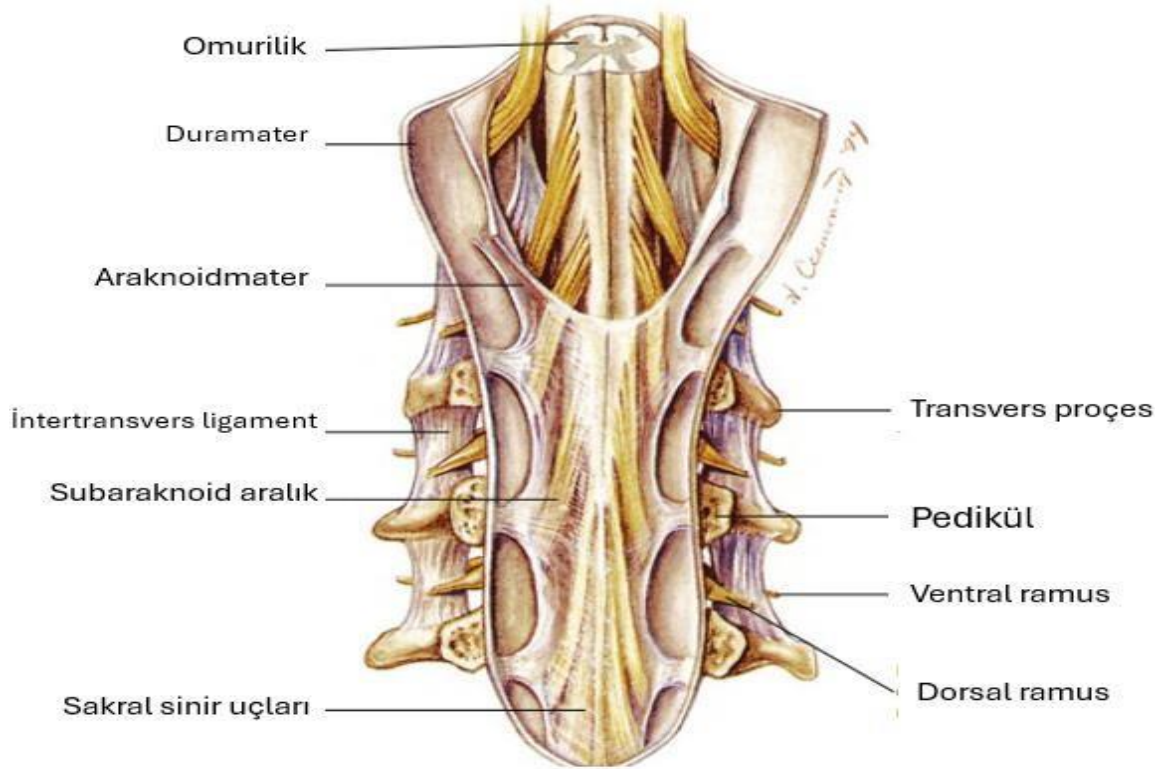
Omurga gövdesi ile vertebral ark olarak devam eden her iki tarafında transvers proçesler ve superior-inferior artiküler proçesler mevcuttur. Bu artiküler proçesler, kendilerine bitişik (üst ve alt) omurların karşılık gelen çıkıntılarıyla zıt konumdadır ve zigapofizyal (faset) eklemler oluşturur. Bu eklemlerin karşılıklı yönelimi omurgaya fleksiyon, ekstansiyon ve rotasyon sağlar. Vertebral gövde, sol ve sağ pediküller, sol ve sağ laminalar ve spinöz procesler tipik bir vertebradaki vertebral foramenin sınırlarını oluşturur. Vertebral kolondaki vertebral foraminaların ardışıklığı vertebral kanalı (spinal kanal) oluşturur. Kanal, omuriliği ve spinal sinirlerin köklerini, bunları çevreleyen zarları (meninksler) ve damarları içerir.

Vertebral kanalın sınırlarını oluşturan yapılar; vertebral gövde, sağ ve sol pediküller, sağ ve sol laminalar, spinöz proçes. Ayrıca IVD'ler ve posterior ligamentöz kompleksin bileşeni olan ligamentum flavum da vertebral kanalın sınırlarını oluşturur(6). Vertebral kanalın dışında vertebral kolonu çevreleyen eksternal vertebral venöz pleksus adı verilen bir ven ağı vardır. Eksternal vertebral venöz pleksus, vertebral kolonun hem arka hem de ön elemanlarıyla ilişkilidir. Bu pleksus omurga boyunca segmental venlerle (derin servikal venler, interkostal venler, lomber venler ve yükselen lomber venler) ve ayrıca vertebral kanal içinde bulunan internal vertebral venöz pleksusla ilişkilidir(6).

Vertebral kanalı oluşturan kemik ve bağ elemanlarının hemen altındaki bölge epidural boşluk olarak bilinir. Epidural boşluk, ince bir yağ dokusu tabakasına gömülü bir venöz pleksus içerir. Bu venöz pleksusa internal vertebral venöz pleksus denir. Bu venöz pleksusta kapaklar yoktur, solunum ve duruşa bağlı olarak tüm omuriliğin venöz drenajını sağlar. Epidural venöz

pleksus ve epidural yağ dokusunun altında, omuriliği çevreleyen meninksler bulunur (Şekil-8). Omurilik duramater, araknoid ve piamater'in altında yer alır (Şekil-8). Şeffaf pia mater'in altında, omuriliğe tutunan dorsal ve ventral kökler görülebilir. Bu kökler omuriliği segmentlere ayırır. İntervertebral foramen(IVF) içinde dorsal ve ventral kökler birleşerek spinal siniri oluşturur(6). Spinal sinir IVF'den çıkarken iki bölüme ayrılır: arka birincil bölüm (dorsal ramus) ve ön birincil bölüm (ventral ramus)(Şekil-8).

Omurga kanalı arteriyel beslemesini, spinal dalları IVF'lere gönderen segmental arterlerden alır. Segmental arterler, servikal bölgedeki vertebral arterin, torasik bölgedeki posterior interkostal arterlerin ve lomber bölgedeki lomber segmental arterlerin dallarıdır. IVF'ye girerken, bir segmental arterin her spinal dalı (ramus) üç dala ayrılır. Bir dal, lamina ve ligamenta flavumu beslemek için posteriora ilerler ve büyük bir dal genellikle spinöz süreçlere doğru ilerler, burada spinöz sürecin tabanına girer ve posterior olarak devam ederek posterior ucuna ulaşır. Diğer büyük bir dal, pedikülle birleştiği yere yakın bir yerden laminaya girer. Laminaya girerken, bir asendan dal ve bir desendan dal sırasıyla üst ve alt artiküler süreçlere geçerek fasetlerin subkondral kemiğine ulaşır(9).



Şekil-8: Omurilik ve epidural aralık anatomisi (6)

8.1.2.2 Omurilik Anatomisi

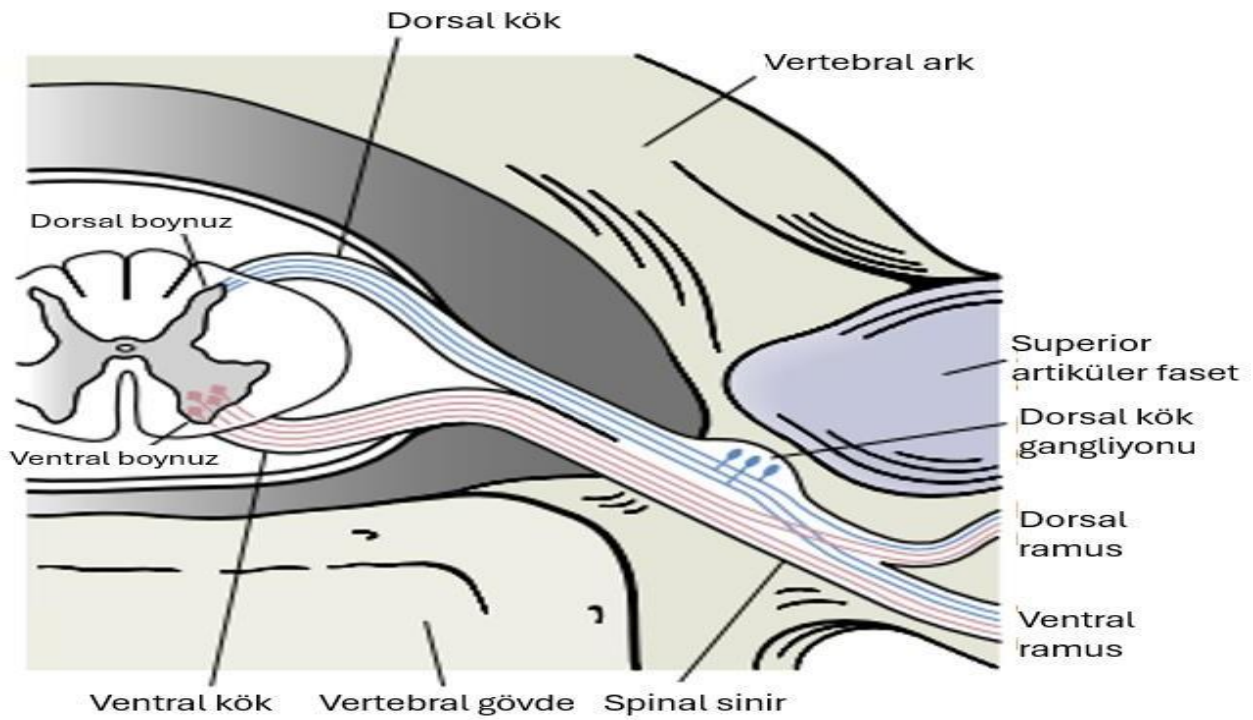
Omurilik vertebraların koruduğu spinal kanal içinde uzanır. Omurilik, vücut ve beyin arasındaki başlıca refleks merkezi ve iletim yoludur. Yaygın somatik ve viseral yapılarda bulunan periferik reseptörlerden birincil afferent lifler alır ve iskelet kasına motor aksonlar gönderir. Ayrıca, kardiyak ve düz kas ve salgı bezlerinin sempatik innervasyonundan ve arka bağırsağın distal kısmındaki düz kasın, pelvik iç organların ve dış genital organların erektile dokularının parasempatik innervasyonundan sorumlu tüm preganglionik nöronların hücre gövdelerini içerir(10). Ön ve arkada hafifçe yassılaştırmış olan bu silindirik yapı, vertebralar, ilişkili bağları ve kasları, spinal meninksler ve beyin omurilik sıvısı (BOS) tarafından korunur. Omurilik, beyin sapının kaudal kısmı olan medulla oblongata'nın (genellikle medulla olarak adlandırılır) devamı olarak başlar(5). Omurilik, konus medullaris olarak bilinen konik bir yapı olarak L1-L3 vertebralar seviyesinde sona erer. Bu konus medullaris'in tepesinden piamater'in bir uzantısı olan filum terminale distale doğru uzanır ve koksiks arka yüzeyine bağlanır. Bu nedenle, omurilik vertebral kanalın yalnızca üst üçte ikisini işgal eder. Medulla spinalis servikal, torasik, lomber, sakral, koksigeal olmak üzere beş segmentten oluşur. Spinal kanal içinde seyreden spinal korddan 31 çift sinir kökü çıkar. Bunlar: 8 servikal, 12 torasik(dorsal), 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigealdır(11).

Omurilik, uzuvların innervasyonuna göre iki bölgede genişlemiştir. Servikal genişleme, omuriliğin C4'ten T1 segmentlerine kadar uzanır ve ondan çıkan omurilik sinirlerinin ön dallarının çoğu, üst uzuvları innerve eden brakial sinir pleksusunu oluşturur. Lumbosakral genişleme, omuriliğin T11'den S1 segmentlerine kadar uzanır ve bunlardan aşağıda, omurilik conus medullaris olarak küçülmeye devam eder. Bu genişlemeden çıkan omurilik sinirlerinin ön dalları, alt uzuvları innerve eden lomber ve sakral sinir pleksuslarını oluşturur(5,12).

Omuriliğin ön tarafında orta hatta, anterior median sulcus olarak adlandırılan derin uzunlamasına yarıktır. Bu yarıktan anterior spinal arterin bulunduğu yerdir. Benzer şekilde, arka yüzeyde orta hatta, yani posterior median sulkusta sıkı bir çizgi görülür. Bu yapılar anterior median fissür ve posterior median sulkus, spinal kord simetrik, sağ ve sol olarak ikiye böler. Ayrıca anterolateral ve posterolateralde de birer sulcus dikkat çeker. Anterolateral sulcudan omurilik motor(ventral) köklerinin, posterolateral sulkus da duyuşal köklerin çıkış yeridir(2). Ventral spinal sinir kökleri, omurga segmentinin ön boynuzundan çıkan, kaslara ve eklemlere vb. motor uyarıları gönderen kökçüklerle omurga innervasyonunun motor bileşenini oluşturur.

Dorsal spinal sinir kökleri, duyuşal bileşeni oluşturur; dorsal ganglionlar, sinir kökleri yoluyla omurga segmentlerinin arka boynuzuna duyuşal uyarılar gönderir(2,11).

Omuriliğın dış yüzeyini incelendiğinde, dorsal ve ventral kökçükler kolayca görülebilir ve bir çift spinal siniri oluşturan çift (sol ve sağı) dorsal kökçüklerin ve çift ventral kökçüklerin korddan dışarıya doğıru bağılanması, bir spinal kord segmentini tanımlar(Şekil- 9). 1 çift spinal sinir 1 kordon segmentiyle ilişkilidir; 31 çift spinal sinir bulunduğı için 31 omurilik segmenti de vardır: 8 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigeal kordon segmenti.



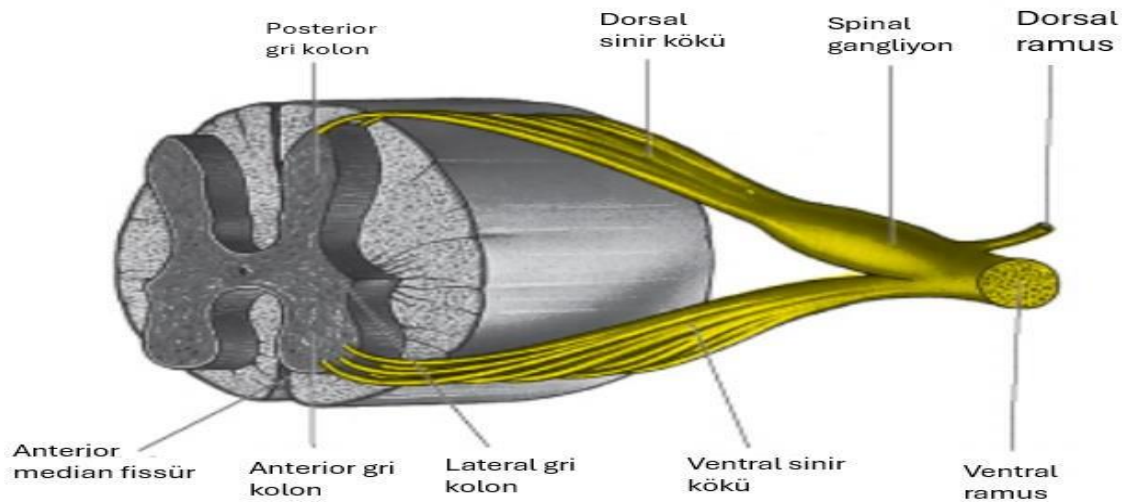
Şekil-9: Omurilik segment anatomisi(6)

Servikal spinal sinirler (C8 hariç), sinirin vertebral kanaldan çıktığı intervertebral foramenin alt kenarını oluşturan vertebralarla aynı alfanümerik ile tanımlanır. Daha alt spinal sinirler (T1 ila Co1) çıkışlarının üst kenarını oluşturan vertebralarla aynı alfanümerik tanımlamayı taşır (Tablo 2). Omurilik konus medullaris'te L2-L3 seviyesinde sonlandığı için lomber ve sakral sinirler çıkış seviyelerine kadar uzancakları için daha uzun spinal sinirlerdir. Konus medullaris'in ucundan çıkan filum terminale, kauda equina'daki spinal sinir köklerinin arasına iner. Filum terminale, embriyonun kuyruk benzeri kaudal çıkıntısında bulunan omuriliğın kaudal kısmının kalıntısıdır. Filum terminale, omuriliğın alt ucu ve spinal meninksler için bir çapa görevi görür(5).

Tablo 2: Spinal sinirlerin omurga IVF'den çıkış seviyeleri(5)

Segment	Sinir numarası	Vertebral seviye çıkış yeri
Servikal	8(C1-C8)	C1 (suboksipital sinir) C1 omur kemerinin üstünden geçer. C2–C7 karşılık gelen omurların üstündeki IV foramenlerden geçer. C8, C7 ve T1 omurları arasındaki IV foramenlerden geçer.
Torakal	12(T1-T12)	T1–L5, karşılık gelen omurların altındaki IV foraminalardan geçer
Lomber	5(L1-L5)	T1–L5, karşılık gelen omurların altındaki IV foraminalardan geçer
Sakral	5(S1-S5)	S1–S4, sakrum içerisinde ön ve arka dallara ayrılır ve ilgili dallar ön ve arka sakral foraminalardan geçer.
Koksigeal	1(Co1)	Sakral hiatustan 5. sakral ve koksigeal sinirler geçer.

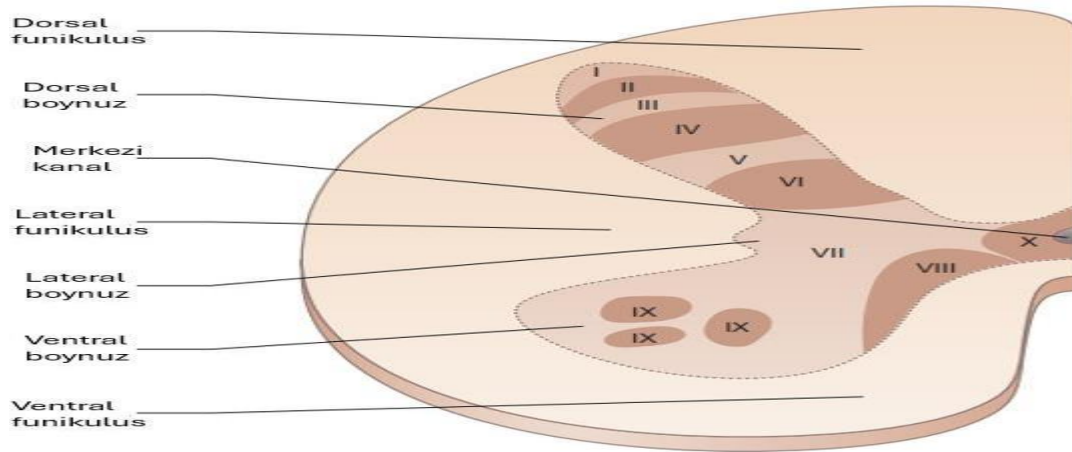
Spinal kordun enine kesiti alındığında, çıplak gözle iki ayrı yapı görülmektedir. Bu görünüm, omuriliğin açıkça kelebek veya H şeklinde gri maddeden oluşan merkezi bir alan ve etrafında beyaz miyelinli aksonlardan oluşan bir alan olarak bölündüğünü göstermektedir(şekil-10). Gri madde hücre gövdelerinden oluşur ve beyaz madde hücre aksonlarından oluşur(2). H şeklindeki gri maddenin her bir yarısı dorsal boynuz, ventral boynuz ve bu boynuzlar arasındaki ara bölgeden oluşur. Merkezi kanal, gri maddenin iki yarısında omuriliğin ortasında uzanır. Bu kanal embriyolojik nöral tüpün lümeninin kalıntısıdır. Dördüncü ventrikül ile proksimalde devam eder ve beyin-omurilik sıvısı içerir.



Şekil-10: Omurilik enine kesiti ve spinal sinir yapısı(11)

Bu gri maddenin H şeklindeki yapısı ortadan omuriliği ikiye ayırsa da H şeklindeki yapının her bir yarımı, dorsal boynuz, lateral boynuz ve ventral boynuz olarak ayrılır. Dorsal boynuz hem beyinden bilgiler, hem de dorsal köklerden gelen duyuşal afferentler için bir alıcı alan işlevi görür. Ventral boynuzu internöronları, propriospinal nöronları ve motor nöronların hücre gövdelerini içerir. Lateral boynuz gri maddenin lateral tarafında bulunur ve aksonları düz kas, kalp kası ve bezleri innerve eden sempatik nöronal hücre gövdelerini barındırır. Lateral boynuz, T1'den L2 veya L3'e kadar olan kordon segmentlerinde bulunur. Torasik segmentlerin ayırt edici bir özelliği, lateral boynuzun varlığıdır(6).

Rexed'in omurilik gri maddesine ilişkin sito-mimari çalışmaları sonucunda Rexed'in laminaları I ila X arasında numaralandırılmıştır. Laminalar I-IX, dorsaldan ventrale doğru düzenlenirken, lamina X, merkezi kanalın etrafında merkezi olarak yer almaktadır. I'den VI'ya kadar olan laminalar posterior gri boynuzu kaplar(13). Lateral boynuzda sadece lamina VII bulunur. Ventral boynuz da ise lamina VII ve IX bulunur (Şekil -11).



Şekil-11: Rexed Laminaları ve Omurilik gri maddesi(10)

Dorsal boynuzdaki laminalar: Lamina I (nucleus marginalis'li marjinal bölge) dorsal apekte bulunur. Lamina II, substantia gelatinosa'ya karşılık gelir. Lamina I ve II gelen zararlı ve ısı uyarılarını alır ve beyaz maddedeki spinotalamik yola gönderir. Lamina III ve IV titreşim ve basınç dokunma duyularının işlenmesine yardımcı olur. Kutanöz, kas, mekanik ve visseral nosiseptörlerden alınan duyuşal afferentler Lamina V'de işlenir. Ağrılı uyarılardan refleks geri çekilme olan fleksiyon refleksi, lamina VI tarafından işlenir.

Lateral boynuzdaki laminalar: Lamina VII, lateral gri boynuzda bulunur. Lateral boynuz yalnızca T1-L2'den itibaren mevcuttur. Yüze, boyuna, kalbe ve karın organlarına impulslar gönderen preganglionik sempatik nöronlardan oluşur.

Ventral boynuzdaki laminalar: Lamina VIII, yoğun şekilde boyanan sinir hücreleri içerir ve heterojen bir görünüme sahiptir. Lamina IX gerçek bir lamina değildir. Lamina VII ve VIII'deki bir dizi sütundur(2). Lamina VII ve VIII, propioseptif refleks afferentleri ve inen motor yolları için önemli bir hedef olan ara bölgeye katkıda bulunur(10).

Lamina X, merkezi kanalın etrafında merkezi olarak yer alır. Kordonun karşı tarafına geçen aksonlardan oluşurlar.

Omurilik beyaz maddesi: gri maddenin merkezi çekirdeğini çevreler ve esas olarak omurilik boyunca uzanan sinir liflerinden meydana gelir. Bu bölge, miyelinli sinir liflerinin varlığı nedeniyle soluk görüldüğü için beyaz olarak adlandırılır. Bu sinir liflerinin belirli görevleri vardır. Bu lifler asendan(yükselen) ve desendan(inen) yollar olarak bilinir. Yükselen yollar, afferent uyarıları omurilik üstü seviyelere taşır ve omuriliğe dorsal sinir kökleri aracılığıyla giren birincil afferent liflerden veya içsel omurilik nöronlarından türetilen liflerden oluşur. İnen yollar, omurilik nöronlarının aktivitesini kontrol eder ve serebral kortekste veya beyin sapı çekirdeklerindeki hücre gövdelerinden kaynaklanan lifleri içerir.

Omuriliğin beyaz maddesi üç büyük yapıya bölünmüştür: her biri bir dizi spesifik yol içeren dorsal, lateral ve ventral funiküller (Şekil-11)(10). Dorsal funikulus, dorsal boynuz ile dorsal medyan septum arasında yerleşir. Lateral funikulus gri maddenin dorsal boynuzu ile ventral boynuzu arasında yer alır. Ventral funikulus, ventral medyan fissür ile ventral köklerin ortaya çıktığı yer arasında yer alır. Yükselen ve alçalan yollar büyük ölçüde birbirlerinde ayrı ve düzenli yerleşmiştir, ancak yan yana ilerleyen yollar arasında örtüşmeler görülebilir(14).

Omuriliğin enine kesiti incelendiğinde, posterior funikülüsün fasciculus gracilis ve fasciculus cuneatus adı verilen iki bölgeden oluştuğu görülür. Anterior funikülüs, olivospinal, tectospinal, lateral vestibulospinal, medial vestibulospinal, anterior kortikospinal, anterior spinothalamik, spino-olivar, spino-tektal ve retikülospinal yolları içerir. Lateral funikülüs, anterior ve posterior spinoserebellar, lateral spinothalamik, spino-retiküler, lateral kortikospinal, rubrospinal ve lateral retikülospinal yolları içermektedir.

Beyaz maddedeki yollar ve özellikleri Tablo-3'te ayrıntılandırılmıştır.

Tablo-3: Omurilik inen-çıkan yollar ve özellikleri (15).

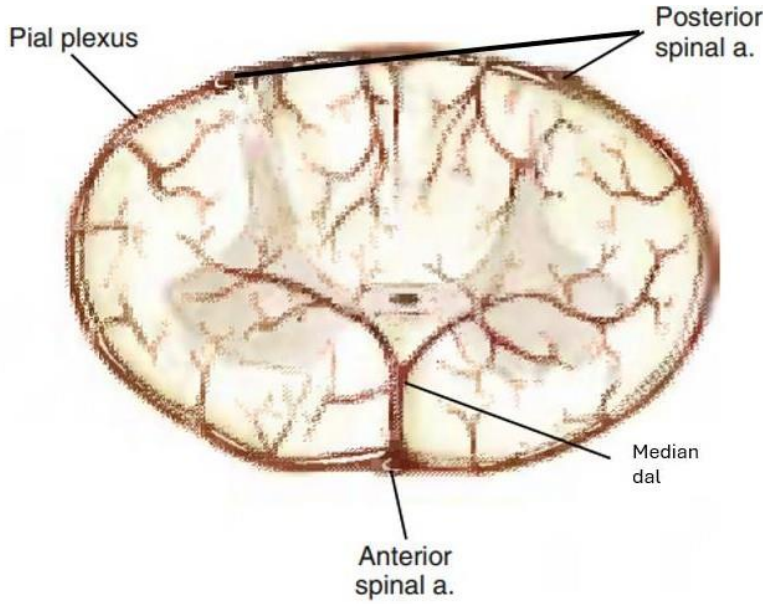
Yol	Omurilikteki yerleşimi	Özelliği	Fonksiyonu
-----	------------------------	----------	------------

Fasciculus cuneatus	Posterior funikulus	Çıkan	İnce dokunma, titreşim ve alt vücudun proriosepsiyonunu alır.
Fasciculus gracilis	Posterior funikulus	Çıkan	İnce dokunma, titreşim ve üst vücudun proriosepsiyonunu alır.
Spinotalamik yol	Anterior - Lateral funikulus	Çıkan	Kaba dokunma, ağrı, ısı duyusunu alır.
Spino-retiküler yol	Lateral funikulus	Çıkan	Ağrıya karşı davranışsal tepki duyusunu alır.
Kortikospinal yol	Anterior- Lateral funikulus	İnen	Kontrolateral kasların uyarısını sağlar.
Spinoserebellar yol	Posterior-Lateral funikulus	Çıkan	Bilinçsiz propriosepsiyon
Retikülospinal yol	Anterior-Lateral funikulus	İnen	Otomatik duruş ve yürüyüş kontrolüne katkıda bulunur
Rubrospinal yol	Lateral funikulus	İnen	Kontrolateral kaslarının kontrolü sağlar
Tektospinal yol	Anterior funikulus	İnen	Görsel, işitsel, duyuşal uyaranlara refleks baş hareketi oluşturur.
Vestibulospinal yol	Anterior funikulus	İnen	Baş ve boyun pozisyonu, denge, ağırlık merkezini oluşturur.
Spino-olivar yol	Anterior- Lateral funikulus	Çıkan	Bilinçsiz propriosepsiyon
Spino-tektal yol	Lateral funikulus	Çıkan	Baş ve gözlere gelen ağırlı uyaranları alır.

Omurilik, vertebral arterin longitudinal dalları ve diğer segmental damarlar tarafından kanlandırılır. Bu longitudinal arterler anterior ve posterior spinal arterlerdir. Anterior spinal arter ve bir çift posterior spinal arter omuriliği besler. Anterior spinal arter, kordonun ön üçte ikisini besler. Posterior spinal arterler, omuriliğin arka üçte birine besler.

Segmental arterler, vertebral, derin servikal, interkostal ve lomber arterlerin spinal dallarından kraniyokaudal dizilimde omuriliği kanlandırır. Bu damarlar, intervertebral

foraminalar yoluyla vertebral kanala girer ve longitudinal damarların dallarıyla anastomoz yaparak kordonun yüzeyinde bir pial pleksus oluşturur(2).



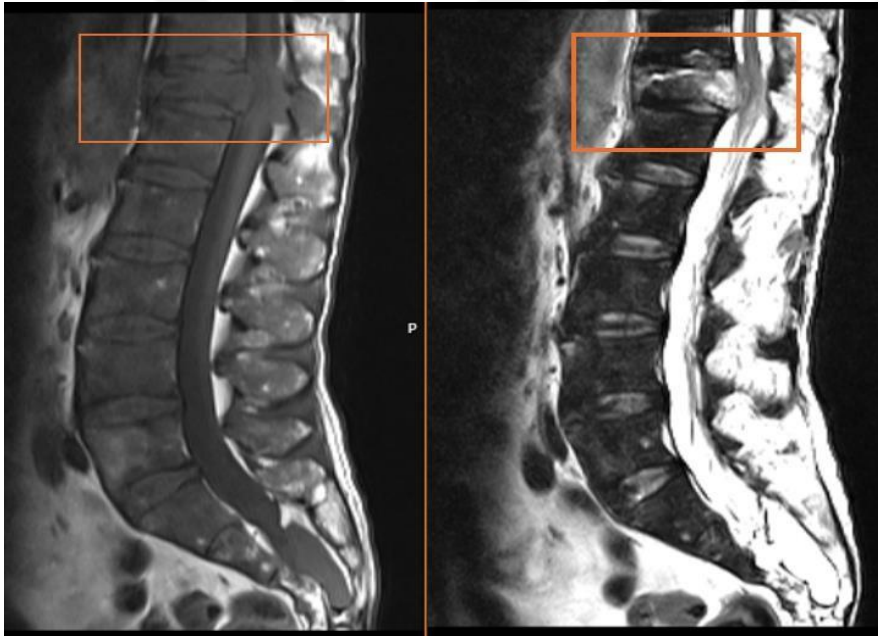
Şekil-12: Omurilik enine kesitte spinal arterler(6)

Omuriliği drene eden venler, altı longitudinal venden oluşan bir ağ sistemidir: bir anteromedian ven, bir posteromedian ven ve bir çift anterolateral ve posterolateral ven(16). Tüm bu kanallar, venöz vazokorona ven pleksusu oluşturmak üzere birbirine bağlıdır. Bu damarlardan gelen venöz kan, radiküler venlere boşalır. Bu radiküler venler son olarak segmental venlere boşalır. Segmental venler, kaval ve azygos sistemine boşalır.

8.1.3. Omurilik Yaralanması

Omurilik yaralanması (SCI), travma (örn. düşmeler, trafik kazaları) veya tümörler, dejeneratif hastalıklar, vasküler hastalıklar, enfeksiyonlar, toksinler ve doğum kusurları gibi travmatik olmayan nedenlerle omurilikte meydana gelen hasarı ifade eder(17). Omurilik yaralanması(SCI), motor, duyu ve otonomik fonksiyonların dejeneratif kaybından kaynaklanır(18). SCI, yaralanma seviyesinin altında duysal ve/veya motor işlevlerin komplet veya inkomplet kaybına neden olur. Omurilik yaralanması ve oluşan ikincil durumların uygunsuz yönetimi genellikle erken ölüme neden olur(17). SCI, yürüme, üst ekstremitte fonksiyonlarında bozulma, bağırsak/mesane disfonksiyonu veya özbakım ve giyinme gibi günlük aktiviteleri gerçekleştirme kapasitesi bozulur. Omurilik yaralanması, uzun süreli engelliliğin önemli bir nedenidir ve 2021 yılında 4,5 milyon yıldan fazla engellilikle geçirilen

yaşam süresinden (YLDs) sorumludur(17). Son otuz yılda küresel yaygınlığı milyon nüfus başına 236 vakadan 1298 vakaya çıkmıştır. Tahmini küresel yaralanma oranı her yıl 250.000-500.000 kişi arasındadır(19,20). Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 2021 yılında yaklaşık 15,4 milyon insanın SCI ile yaşamaktadır. Mevcut tedaviler sınırlıdır ve maliyetlidir. Hastaların sosyal hayata adaptasyonu amacıyla rehabilitasyon ve sosyal yaşama uyum tedavileri mevcuttur. Yaralanmanın mali yüküne ek olarak, hastalığın psikolojik ve sosyo-kültürel etkisi, düşük iyileşme oranı nedeniyle hastalar için yıkıcıdır. SCI'lı yetişkinlerde, işsizlik oranlarının %60'ı aşmasıyla ekonomik katılımda birçok engelle karşı karşıya kalmaktadır(17). Bu yaralanmalar yalnızca bireyler ve aileleri için sağlık kaybına ve sakatlığa neden olmakla kalmaz, aynı zamanda kaybedilen üretkenlik ve yüksek sağlık bakım maliyetleri yoluyla sağlık bakım sistemleri ve ekonomiler için bir yük oluşturur. Omurilik yaralanması son yıllarda küresel bir sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir(21).

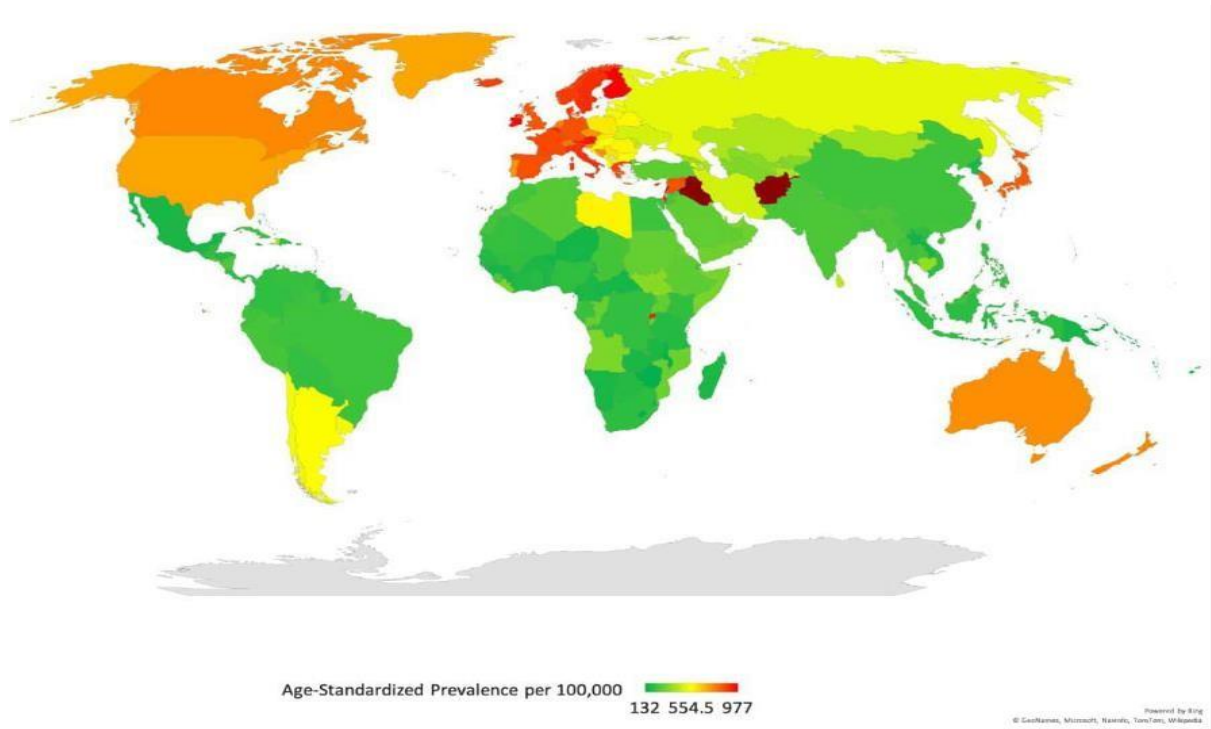


Resim-1: İntadural kemik tümörü nedeniyle omurilik yaralanması oluşan hastanın mrg görüntüleri.

Omurilik yaralanması en sık travma nedeniyle oluşur. Trafik kazaları, düşmeler ve intiharlar, dünya çapında omurilik yaralanmasının en sık sebebidir(21). Ülkeler arasında insidans ve prevalans açısından cinsiyet, yaralanma mekanizması ve lezyonların seviyesi ve şiddetine göre değişen belirgin farklılıklar vardır. Dünyada kıtalar arasında en yüksek insidans Avrupa'da bildirilmiştir(22). En yüksek insidans oranının Portekiz (milyonda 57,8 vaka) (23) ve Rusya'da (milyonda 44,0 vaka)(24) bildirildiği, en düşük insidans oranının ise İtalya'da (milyonda 14,7 vaka) rapor edildiği Avrupa'da da büyük farklılıklar mevcuttur. Dünya

çapındaki prevalansı ve insidansının doğru bir şekilde ölçülmesi zordur ve bölgeler arasında uygun değerlendirme yöntemlerinin bulunmaması, toplanan verilerde bilgilerin sınırlı ve kısıtlı olması ve gelişmekte olan ülkelere ve kırsal alanlardan gelen güvenilir verilerin azlığı nedeniyle tam olarak insidans ve prevalans belirlenmesi yapılamamaktadır.

Cinsiyetle ilişkilendirildiğinde, SCI'nın erkeklerde daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir. Bu durum, sosyal ve kültürel farklılıklarla açıklanabilir. Ayrıca, her yaş grubundaki erkeklerde yaralanmanın yüksek olması, daha yüksek travma riski taşıyan davranışlar ve yaralanma riskini artıran durumlarla daha fazla karşılaşılmasına bağlanabilir(21,22).



Şekil-13: Travmatik omurilik yaralanmasının global yaygınlığı. 2016 yılında ülkeye göre 100.000 kişi başına TSCI'nin yaşa göre standardize edilmiş yaygınlığını göstermektedir(21,25)

Servikal, torasik ve lomber veya sakral yaralanmaların insidansı önceki literatürde çok farklılık göstermektedir. Bunun en önemli nedeni bölgeler arasında sağlık sistemine ulaşımın ve kalitesinin farklılık göstermesidir. Genel olarak komplet servikal yaralanmalar en yaygın yaralanmadır, ancak dünya çapında yaralanma seviyesi ve şiddeti farklılık göstermektedir(25). Çin'de travmatik omurilik yaralanması nedeniyle hastaneye kaldırılan hastaların %5'inden azını servikal lezyonlar oluştururken, Türkiye'de bu oran %92'ye çıkmaktadır(26). Bu istatistikler daha çok yıllık sağkalımı göstermekte olup, yüksek servikal lezyonu(C1-4) olan hastaların olay yerinde mortalitesi yüksek olduğundan bir yıllık sağ kalımları düşüktür(25). Düşmeler lomber

yaralanmalarla, motosiklet ve otomobil çarpışmaları ise servikal yaralanmalarla ilişkilidir. Yaralanmanın şiddeti ülkelere göre değişiklik göstermektedir(21).

Yaşa göre dağılıma bakıldığında travmatik SCI daha çok genç yaşlarda görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde bimodal bir dağılım görülmektedir (ikinci-üçüncü dekat ve yedinci dekat da sık görülür). Gelişmekte olan ülkelere daha çok genç yaşlarda (ikinci ve üçüncü dekat) görülür. Mortalite risk faktörlerine bakıldığında yaş önemli bir faktördür. 75 yaş üzeri hastalarda 55 yaş üzerine göre yaralanma sonrası sağkalım daha düşüktür(26,27). Bunun travmanın akut evresi ile ilgili olmaksızın ilerleyen zamanda oluşan komplikasyonlarla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Yaşlı hastaların komplikasyon geliştirme olasılığı daha yüksektir ve genç hastalara kıyasla rehabilitasyon potansiyeli daha düşük olan genel olarak daha kötü prognoza sahiptirler(26,27).

Omurilik anatomisi nedeniyle oluşan yaralanmalar kompleks bir yapıya sahiptir. Omurilik zarar vermek için gereken yaralanmanın büyüklüğü sebebiyle, SCI genellikle çoklu organ yaralanmalarıyla birlikte ortaya çıkar. SCI'li bir hastanın ilk değerlendirmesi, Gelişmiş Travma Yaşam Desteği yönergelerine (ATLS yönergeleri) uygun olarak diğer travma hastalarıyla aynı protokoller doğrultusunda yapılır. SCI'nin belirgin belirtileri arasında felç, bradikardi ile hemodinamik instabilite, alt ekstremitelerde ağrılı uyaranlara yanıtsızlık ve paradoksal solunum yer almaktadır(28). Bu durumdaki hastaların havayolu korunmasının yanı sıra vertebral elemanların patolojik hareketlerinden kaçınılmalıdır. Ayrıca, bu hastalarda hipotansiyon (<90 mmHg sistolik), kısa süreler için bile olsa, ciddi sonuçlarla ilişkilendirildiğinden kaçınılmalıdır(28).

SCI'li hastalarda yaralanmayı tanımlamaya yardımcı olabilecek herhangi bir motor veya duysal anormalliği belirlemek için kapsamlı bir fizik muayene yapılmalıdır. Amerikan Omurilik Yaralanması Derneği (ASIA) sınıflandırma sistemi, SCI'li hastalarda fizik muayene bulgularını sınıflandırmak için genellikle kullanılan bir sistemdir. Ölçek bilateral olarak kas gruplarını değerlendirir ve bunu motor puan olarak yazılır. Duyusal skor olarak da dermatomal açıdan değerlendirilir. Bunlardan belirlenen skorlara göre beş farklı şekilde sınıflandırılabilir(29)(tablo-4). ASIA motor skoru ile ASIA duysal ölçeğin kombinasyonu, SCI sonrası hastanın nörolojik durumunun en iyi tanımını oluşturur.

Tablo – 4 : ASIA skorlaması

Grade	Sınıflama	Motor	Duyusal
A	komplet	Motor fonksiyon yok	Total defisit
B	inkomplet	Motor fonksiyon yok	İnkomplet defisit
C	inkomplet	Motor fonksiyon kısmi korunmuştur – yaralanma seviyesi altındaki kasların yarısından fazlasının derecesi 3/5'ten az kas gücü vardır.	İnkomplet defisit
D	inkomplet	Motor fonksiyon kısmi korunmuştur - yaralanma seviyesinin altındaki kasların yarısından fazlasının derecesi 3/5'ten fazladır.	İnkomplet defisit
E	Normal	Normal	Normal

Görüntüleme SCI tanısında önemli rol oynar. Görüntüleme omurganın yapısal özelliklerinin ve yaralanmasının değerlendirilmesinde ve bununla birlikte tedaviye yön vermekte önemlidir. Bilgisayarlı tomografi (BT), omurganın kemik yapısının değerlendirilmesini sağlar. BT, hızlı ve güvenilir olduğu için ilk görüntüleme yöntemi olarak kullanılır. Daha sonra, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), omurilik ve intervertebral disk ve omurganın bağları içerebilen yaralanmaların değerlendirilmesi ve epidural veya subdural hematoma olup olmadığının değerlendirilmesinde yararlıdır. MRI, omurilik hasarının değerlendirilmesinde "altın standart" görüntüleme yöntemi olarak kabul edilir(30)(Şekil-15).



Resim-2: Omurilik yaralanmasında görüntüleme A: bilgisayarlı tomografi B : MRI T2 sagittal C: MRI T2 aksiyal görüntüler

8.1.4. Omurilik Yaralanması Patofizyolojisi

SCI karşımıza daha çok travmatik yaralanmalarla çıkar. Travmatik SCI iki fazda gerçekleşir. İlk olarak, mekanik travmaya bağlı olarak gerçekleşen nöral parankim yıkımı olur ve bu düzeltilemez. Mekanik yaralanma doğrudan kan damarlarını, nöral yapıyı bozar. Primer hasar aşamasında yaralanmaların çoğu, künt yaralanmalarla sonuçlanan vertebra kırıklı çıkık yada kompresyon kırıkları ile ilişkilidir. Son epidemiyolojik veriler, travmatik omurilik yaralanmalarının çoğunun omuriliğin tam olarak kesilmesine yol açmadığını ortaya koymuştur. Genel olarak SCI şiddetinin ana belirleyicisi omurilik sıkışmasının süresi ve sıkışmanın şiddetidir(31). Sekonder hasar aşaması ilişkili bir dizi olay, sinir dokularında biyokimyasal, mekanik ve fizyolojik değişikliklerin başlamasıyla aktive olur(31).

8.1.4.1. Primer Faz

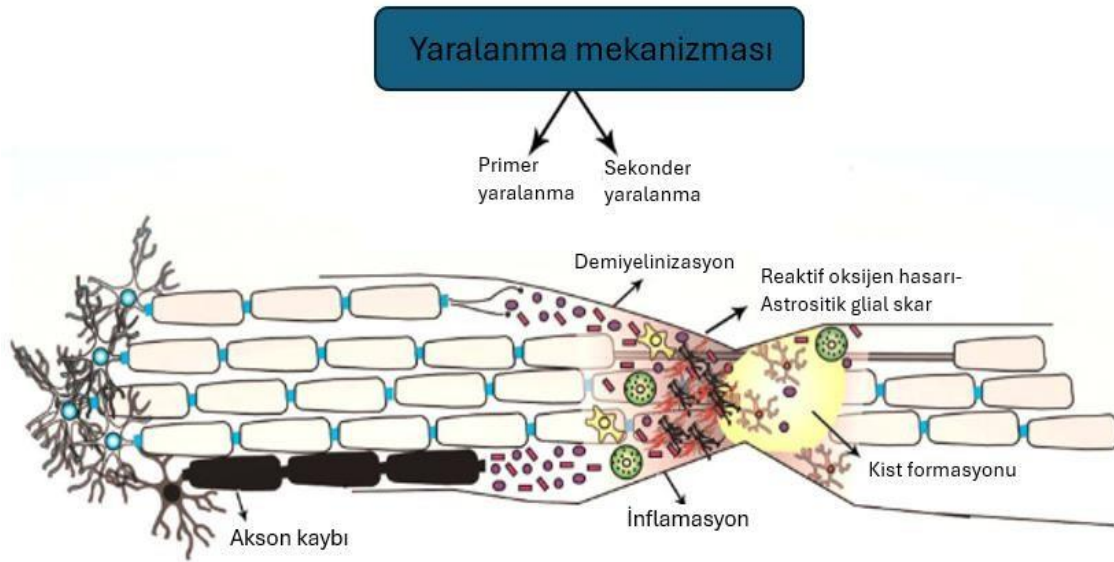
Omuriliğe etki eden fiziksel kuvvetler sonrasında oluşan yaralanmalar SCI'nın primer fazını başlatır. Primer fazda yaralanmayı takiben aksonların, nöral ve glial hücrelerin ve zarlarının mekanik olarak bozulmasına neden olur(31). Ayrıca kan damarlarının hasar görmesine ve gri madde içindeki mikro kanamalar oluştuğu görülür. Kan akışının kesilmesi hipoksi ve iskemi lokal enfarktüsüne yol açar. Bu, özellikle metabolik gereksinimi daha fazla olan gri maddeye zarar verir. Hasarlı bölgede bulunan nöronların miyelin kalınlığı azalır. Temel olarak primer hasarın aşamaları sinir parankiminin tahrip edilmesi, aksonal yapıların hasar görmesi, kanama ve glial membranın parçalanması şeklinde olur. Primer yaralanmanın neden olduğu kanama ve glial membran hasarı ilk aşamada tam fonksiyon kaybıyla sonuçlansa da zamanla lezyonun üstündeki ve altındaki segmentlerde kısmi fonksiyonun korunduğu inkomplet bir lezyon haline gelebilir(32). İntraspinal basıncın arteriyel kan basıncının üzerine çıkması, sekonder hasarın ana nedenlerinden biri olan sekonder iskemiye yol açabilir. Primer faz, sekonder fazı tetikleyerek omurga dokusunda daha fazla kimyasal ve mekanik hasara neden olur, yüksek hücre içi kalsiyum birikimi nedeniyle nöronal eksitotoksisiteye neden olur ve reaktif oksijen türlerinin konsantrasyonlarını ve glutamat düzeylerini artırır(19).

8.1.4.2. Sekonder Faz

Primer faz aşamasını takip eden ve birkaç haftadan ile aylar kadar sürebilecek çok spesifik bir patolojik süreci yansıtır. Sekonder fazın klinik belirtileri arasında hücre geçirgenliğinde artış, apoptotik sinyalleme, iskemi, vasküler hasar, ödem, eksitotoksisite, iyonik serbestleşme, inflamasyon, lipid peroksidasyonu, serbest radikal oluşumu, demiyelinizasyon, Wallerian dejenerasyonu yer alır. Fibrogial skarlaşma ve kist oluşumunu

ierleyen zamanlarda görülür. En belirgin mekanizmalar enerji eksikliği ve iskemi nedeniyle hücresel düzeyde kan akışının bozulmasıdır (21). Kan damarlarının bozulması omurilik dokusunda kanamaya neden olur, bunu monositlerin, nötrofillerin, T ve B lenfosit hücrelerinin ve makrofajların omurilik dokusuna istila etmesi izler. Bu fenomen aynı zamanda interlökin (IL)-1a, IL-1b, IL-6 ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α gibi inflamatuvar sitokinlerin yaralanmadan 6-12 saat sonra salınmasıyla da ilişkilidir. Bağışıklık hücrelerinin ve inflamatuvar sitokinlerin sızması nöronal inflamasyonu teşvik eder.

Sekonder faz yaralanmanın zamanına göre akut, subakut ve kronik fazlara ayrılabilir. Akut faz SCT'den hemen sonra başlar ve vasküler hasar, iyonik dengesizlik, nörotransmitter birikimi (eksitotoksisite), serbest radikal oluşumu, kalsiyum girişi, lipid peroksidasyonu, inflamasyon, ödem ve nekrotik hücre ölümünü içerir. Yaralanma ilerledikçe, apoptoz, hayatta kalan aksonların demiyelinizasyonu, Wallerian dejenerasyonu, aksonal ölüm, matris yeniden şekillenmesi ve yaralanma bölgesinin etrafında bir glial skarın evrimini içeren subakut yaralanma fazı başlar. Yaralanmanın kronik fazında kistik boşluk oluşumu, ilerleyici aksonal die-back ve glial skarın olgunlaşması gibi daha fazla değişiklik meydana gelir.



Şekil-14: Sekonder faz aşamasında omurilik hasar mekanizmaları(18)

8.1.4.2.1 Akut Faz

Primer yaralanma fazını takiben akut sekonder fazın başlangıcı, vasküler hasar, iyonik dengesizlik, eksitotoksisite, serbest radikal üretimi, artmış kalsiyum girişi, lipid

peroksidasyonu, inflamasyon, ödem ve nekroz gibi klinik özelliklerle kendini gösterir. Sekonder fazın akut aşamasında SCI hastaları, hipovolemi, nörojenik şok ve bradikardi sonucu sistemik hipotansiyona karşı özellikle hassastır. Bu hipotansiyon, intraspinal kan basıncını otoregülasyonunun kaybolması sonucunda omuriliğin hipoperfüzyonu ile sonuçlanır. Primer yaralanma sonrasında genelde anterior spinal arter korunur ancak merkezi besleyen arterlerde vazospazm görülür. Gri maddeden beyaz maddeye doğru gelişen hipoperfüzyona neden olur. Hipoperfüzyon aksiyon potansiyellerinin aksonlar boyunca yayılmasını yavaşlatır ve sonunda inhibe eder, böylece spinal şoka katkıda bulunur(33). Gri madde içindeki nöronların yüksek metabolik hızı onları iskemiye karşı özellikle hassas hale getirir. Gri madde içindeki kanamalar, iskemi ve nekroz, mikrogliya aktivasyonu, bağışıklık hücrelerinin mobilizasyonu ve tümör nekroz faktörü (TNF)- α ve interlökin (IL)- β gibi proinflamatuvar sitokinlerin salgılanması gibi inflamatuvar süreçleri tetikler.

Travmatik omurilik yaralanması sitotoksik ödem, iyonik ödem veya vazojenik ödem olarak bilinen bir duruma neden olur. Fizyolojik koşullar altında, Na^+/K^+ ATPazlar ve Ca^{2+} ATPazlar, hücre içi ve hücre dışı kompartmanlar arasında iyonik gradyanı korumak için ATP enerjisini kullanır. İskemi sırasında, ATP eksikliği nedeniyle bu yapı korunamaz. Su moleküllerinin aracılık ettiği aquaporin su kanalları yoluyla hücre içine pasif bir Cl^- akışı olur ve bu solüt ve su akışı hücrenin şişmesine ve hücre iskeleti bütünlüğünün kaybolmasına yol açarak hücre ölümüne neden olur. İyonik ve vazojenik ödem, kan-beyin bariyerinin geçirgenliğinin artmasına bağlıdır. Başlangıçta, interstisyel alandaki iyon ve su depolarının tükenmesi, transendotelyal iyon taşınımının artmasına ve iyonik ödeme neden olur(34). Daha sonra, kısmen endotel hücrelerinin sitotoksitesine bağlı ödeme ilişkili daha fazla endotel disfonksiyonu, kan-beyin bariyerin de plazmadan büyük moleküllerin geçmesine izin veren bir geçirgenlik gözeneği oluşumuna yol açar, bu da vazojenik ödemdir.

SCI'nin erken akut fazı yaralanmadan yaklaşık 2-48 saat devam eder. Bu aşamada ATP üretiminin azalması, organellerin bozulması ve plazma membranının lizisi nedeniyle nekrotik hücre ölümü görülür ve bu da intersellüler içeriğin ekstrasellüler boşluğa salınmasına ve lokal inflamatuvar sürecin indüklenmesine neden olur(31,35). Bu dönemde şiddetli sekonder hasar süreçleri indüklenir: serbest radikal üretimi, iyonik düzensizlik, glutamat aracılı eksitotoksitesite ve bağışıklık ilişkili nörotoksitesite. Bu süreçler ek aksonal yaralanmaya, hücre ölümüne ve lezyonun çevredeki korunmuş doku içinde yayılmasına neden olur.

Glutamat, merkezi sinir sistemindeki merkezi bir uyarıcı nörotransmitterdir ve NMDA reseptörü, α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropiyonik asit (AMPA) ve kâinat

reseptörleri gibi iyonotropik reseptörlerin yanı sıra metabotropik reseptörlere bağlanır. Bu reseptörler sadece nöronlarda bulunmaz, birkaç alt tipi astrositlerin ve oligodendrositlerin yüzeyinde tespit edilmiştir. SCI'nin deneysel modellerinde, glutamatın büyük miktarda salınması, onbeş dakika içinde glutamat reseptörlerinin aşırı ve irreversible aktivasyonuna yol açarak hücre ölümüne, yani eksitotoksisteye neden olur(36). Yaralanma sonrasında glutamat artışından çeşitli mekanizmalar sorumludur. İlk olarak, ekstrasellüler glutamat hücrelerin ölümü sonrasında apoptotik ve nekrotik süreçlerle oluşur(37). Ayrıca ATP yokluğu nedeniyle Na^+ bağımlı glutamat taşınmasının tersine dönmesi SCI sonrasında glutamatın başlıca mekanizmalarıdır.

Gri madde nöronlarındaki eksitotoksiste mekanizmaları öncelikli olarak iyonotropik glutamat reseptörleri ve NMDA reseptörleri ile ilişkilidir. NMDA reseptörlerinin aşırı aktivasyonu, iyonik dengesizliğe neden olur ve nekrotik veya apoptotik hücre ölümüne yol açan Ca^{2+} ve Na^+ akışına neden olur. İyonotropik glutamat reseptörleri aracılığıyla Ca^{2+} girişi, sitoskeletal bileşenlerin kalpain aracılı bozulmasına, lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve mitokondriyal failure dahil olmak üzere çeşitli ikincil hasar kaskadlarının aktivasyonu yoluyla hücre ölümüne yol açacaktır(38).

Aksonlarda düşük miktarda AMPA reseptörü bulunur. SCI'yı takiben glutamat toksitesinin ana nedenidir(39). Hem astrositler hem de oligodendrositler glutamat reseptörleri bulundurulur, bu nedenle akut sekonder faz aşamasında glutamat toksitesi sonrasında myelin kılıf kaybı ve akson iletiminde bozulmalar görülür.

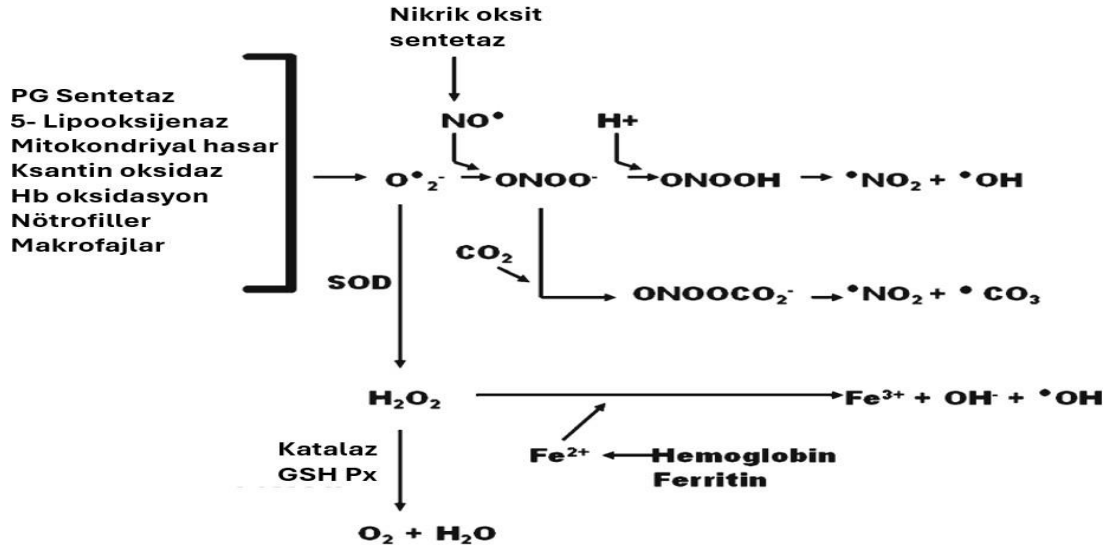
SCI'de özellikle glutamat eksitotoksitesi nedeniyle membranlarda iyon dengesizliği ve hücre içi Na^+ ve Ca^{2+} konsantrasyonlarında ilgili bir artışa ve hücre içi K^+ seviyelerinde bir azalmaya yol açar(39). Hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonlarının artması mitokondriyal solunumu da etkileyerek ATP üretimini engeller. ATP üretilmemesi nedeniyle, Na^+/K^+ ATPaz ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ transporter kanallarını etkinliği azalır ve bu nedenle hücre içi ve dışı iyonik homeostaz mekanizmasını engeller. Na^+/K^+ ATPaz disfonksiyonu, aksonal membranın depolarizasyonuna neden olarak voltaj kapılı Na^+ kanalları aracılığıyla yüksek bir Na^+ akışına neden olur. Ranvier düğümlerindeki voltaj kapılı Na^+ kanallarının yoğun olduğu nedeniyle, aksonları nöronların hücre bölmesine kıyasla daha fazla Na^+ akışına karşı daha savunmasız hale getirir. Pasif bir Cl^- ve su akışıyla birlikte gelen bu anormal Na^+ akışı, hücrelerin şişmesinden ve ödemden sorumludur. Uygunsuz hücre içi sodyum-potasyum dengesi sitotoksik ödemi şiddetlendirir. Yüksek hücre içi Na^+ konsantrasyonu, akson içi pH'ı yükselten Na^+/H^+ exchanger kanalı aktive eder ve bu da kalsiyum membran geçirgenliğini artırır.

Ca^{2+} çeşitli hücresel süreçlerde ikincil haberciler olarak görev yapan bir iyonudur. Hücre ölümünün başlatılması sırasında, yüksek hücre içi Ca^{2+} seviyeleri protein kinazları ve fosfolipazları aktive eder, ROS üretimini artırır ve mitokondriyal işlev bozukluğuna neden olur(40). Ayrıca yüksek Ca^{2+} düzeyleri akson için önemli olan hücre içi sitoskeletal proteinleri parçalayan non-lizozomal olmayan sistein proteazları aktive eder.

Mitokondriler hücrenin enerji deposu olarak işlev görse de SCI'de farklı fonksiyonlara hizmet etmektedir. ATP sentezine ek olarak, mitokondriler sitozolik Ca^{2+} seviyelerini tamponlamak ve korumaktan sorumlu önemli yapıdır. Ancak SCI'den sonra sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ilk 15-60 dakika içinde önemli ölçüde artar ve günlerce anormal derecede yüksek kalır. İlk aşamada, Ca^{2+} hücre içine girişi büyük ölçüde mitokondri tarafından tamponlanacak ve bu da ATP üretiminde artışa yol açacaktır(41). Bununla birlikte, mitokondrideki enerji üretim merkezi olan elektron transfer sisteminin (ETC) parçası olan Kompleks I'nin daha yüksek aktivitesinin yan etkisi ROS üretiminin artmasıdır. Bununla birlikte, kalsiyum konsantrasyonunun mitokondrideki reaktif oksijen türlerinin oluşumunu nasıl etkilediği mekanizması hala tartışılmaktadır(41,42). SCI'den sonra mitokondriyal fonksiyon bozulur; yaralı sıçan omuriliğinde yapılan çalışmalarda erken dönemlerde oksidatif hasar belirteçlerinde artış ve mitokondriyal fonksiyonda azalma gösterilmiştir ve bu fonksiyonda maksimum azalma 24 saat sonrasında gerçekleşir(42). Bunlar, hasarlı omurilikten izole edilen mitokondrilerdeki ETC komplekslerinin fonksiyonunda gözlenen bozulma ile ilişkilidir.

Mitokondri içinde Ca^{2+} 'nin aşırı birikimi, mitokondriyal gözeneklerin açılması yoluyla iç mitokondriyal zarın spesifik olmayan bir geçirgenleşmesini tetikler. Ayrıca bu olay proton gradyanının ciddi şekilde bozulmasına yol açar ve dolayısıyla ATP sentezini engeller. Bu gözeneklerin açılması ayrıca mitokondriyal matrikse su ve diğer moleküllerin akışını sağlayacak ve mitokondriyal zarların şişmesine ve parçalanmasına neden olacaktır. Bu faktörler, ATP seviyeleri yeterli olduğu sürece programlanmış hücre ölümünü, yani apoptoz, nekroptoz ve otofajiyi indükleyecektir, aksi takdirde nekroz meydana gelecektir.

Mitokondriyal serbest radikal oluşumuna sonrasında, SCI gelişimi sonrasında asidoz, ferritin ve transferin, hücre içi demir stoklarının salınmasını teşvik eder. Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'ye kendiliğinden oksidasyonu da süperoksit radikalleri üretir. Fe^{3+} 'nin hidrojen peroksit ile reaksiyonu, Fenton reaksiyonu adı verilen reaksiyon yoluyla oldukça reaktif hidroksil radikalleri üretir(43)(Şekil-17).



Şekil-15: Fenton reaksiyonu(43).

Oksijen, özellikle hücrelerdeki ROS ve serbest radikallerin ana kaynağıdır. Yüksek ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretimi, vücudun farklı organlarında lipid peroksidasyonu da dahil olmak üzere çeşitli zararlı etkilere neden olur. Lipid peroksidasyonu üç adımda gerçekleşir(19):

- 1- ROS, membranın çoklu doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer ve reaktif lipid türleri üretir.
- 2- Bu da diğer radikalleri inhibe eder, ek reaktif türler üretir.
- 3- Son olarak 4-hidroksinonenal (HNE) ve 2-propenal dahil olmak üzere diğer reaktif türleri üretir.

Lipid peroksidasyonu, SCI'den sonra meydana gelen muhtemelen en zararlı ROS ilişkili hasardır. ROS'lar hücre zarlarındaki çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşime girer. Lipit peroksidasyonu, hücredeki zar yapılarını daha da dengesizleştirerek iyonik kaskadı bozar. Na^+/K^+ ATPaz'ının inhibisyonuna katkıda bulunur ve bu da hücre içi Na^+ birikimini artırır. ROS ile ilişkili lipid peroksidasyonuna ek olarak, amino asitler SCI'yi takiben önemli RNS ile ilişkili oksidatif hasara uğrar(44). SCI'yi takiben lipid oksidasyonunun hücresel düzeyde mitokondriyal ve metabolik yetmezliğe neden olur. Bunun da nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne yol açan DNA değişikliği gibi bir dizi zararlı sonucu vardır(45).

Mitokondriyal hasar ve lipit peroksidasyonunu takiben, omurilikte güçlü inflamatuvar ve immünolojik tepkiler oluşur. SCI, beyin hasarından önemli ölçüde daha yaygın nöroinflamasyona ve çoklu organ yetmezliğine neden olur(46). SCI'deki inflamatuvar süreçler

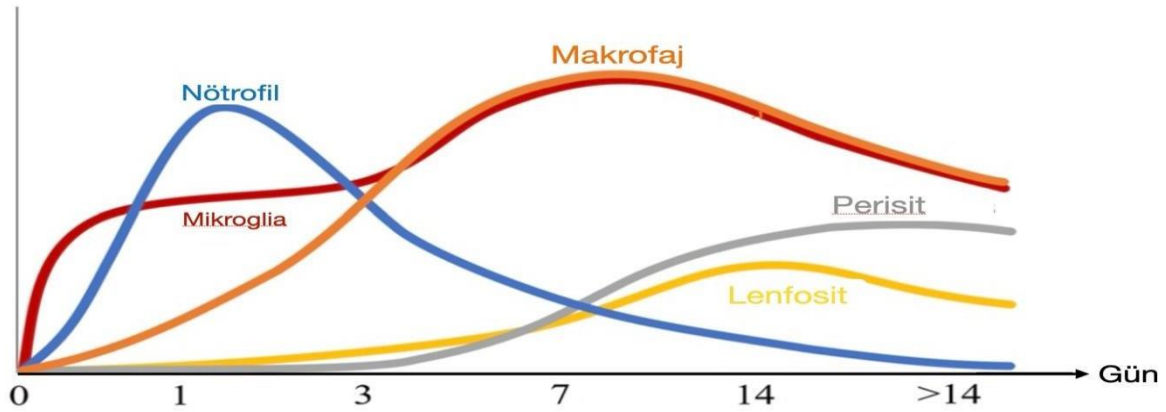
karmaşıktır ve nörotoksik veya nöroprotektif olan net etkileri genellikle sürelerine ve zamanlamalarına bağlıdır. SCI'den sonraki inflamatuvar yanıtlar mikroglia, nötrofiller ve makrofajlar gibi çeşitli hücreler ve ayrıca sitokinler, prostanooidler ve kompleman sistemi gibi moleküler bileşenleri içerir. Fizyolojik koşullarda astrositler, mikroglia, nöronlar ve oligodendrositler tarafından kompleman sistemi minimal düzeyde sentezlenir. SCI'yi takiben, kompleman sistemi hemen aktive olur ve ardından 1 gün içinde lokal olarak artar ve kronikleşerek devam eder. Kompleman sisteminin lokal salınımı, miyelin artıklarının temizlenmesi için lezyonda fagositik hücrelerin toplanmasını kolaylaştırır. Son çalışmalar kompleman sisteminin ilk 7 gün inhibisyonunun yararlı olduğunu ancak sonrasında yokluğunun artmış hücre infiltrasyonuna ve bozulmuş glial skar ile ilişkilendirilmiştir(47).

8.1.4.2.2. Subakut Faz

Subakut faz (yaralanmadan sonra 2 hafta), lezyon bölgesinde biriken hücresel kalıntıların yoğun fagositozunun devam etmesiyle karakterizedir(48). Bu dönemde, lezyonun çevresinde bulunan astrositler çoğalır ve hipertrofik hale gelir. Subakut faz, mitokondriyal disfonksiyon sonrasında nöroinflamasyon ile devam eder.

İnflamasyon SCI'nin erken fazlarında başlar, özellikle mikroglia hücreleri yaralanma sonrasında ilk 5 dakika içinde IL-1 β ekspresyonunu indükleyerek lökositlerin lezyon bölgesine infiltrasyonunu sağlar(49). Mikroglialar tarafından erken TNF- α ve IL-1'in üretimi, inflamatuvar hücrelerin yaralanma alanına gelmesini artırır. IL-1 β , yaralanmadan bir saat içinde yükselir, sekiz saat sonra zirve yapar ve en az yedi gün boyunca devam eder(Şekil-18). SCI'deki yanıtın sorumlu genel inflamatuvar hücre sınıfı mikroglia, nötrofiller, makrofajlar ve lenfositlerdir. Mikroglia, nötrofiller ve makrofajlar doğuştan bağışıklık sağlarken, lenfositler adaptif bağışıklık sunar. Nötrofiller, yaralanmadan hemen sonra hasar görmüş omuriliğe girer ve ilk 24 saat içinde zirveye ulaşır. Nötrofil aracılı fagositozdan sonra üretilen yan ürünler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) üreterek sitotoksik bir ortam yaratır. Monositlerden türeyen makrofajlar da omuriliği infiltre eder ve proteolitik enzimler, reaktif oksijen türleri (ROS) ve inflamatuvar sitokinlerle birlikte yaralanma mikroçevresine katkıda bulunur. Benzer şekilde, merkezi sinir sistemi (CNS) reaktif B ve T hücreleri de omuriliğe sızar ve akson hasarını ve miyelin kaybını teşvik ettiği öne sürülmüştür(44). Toplanan bağışıklık hücrelerinin büyük bir kısmı, ikincil yaralanmaların ilerlemesini teşvik eden TNF-alfa, interlökinler ve interferon gibi pro-inflamatuvar sitokinleri salgılar(50). Lenfositler genellikle yaralanma alanına daha geç, genellikle yaralanmadan bir hafta sonrasında gelir. Bu hücreler, adaptif bağışıklık için önemlidir ve aktivasyon durumuna

ve çevresindeki mikroçevreye bağılı olarak hem koruyucu hem de patolojik süreçlere katkıda bulunabilirler(51).



Şekil-16: SCI sonrasında inflamasyondan sorumlu hücrelerin günlere göre dağılımı(52)

Akut aksonal dejenerasyon (AAD), omurilik yaralanmasından sonraki ilk 48 saat içinde meydana gelir. Bu süreç, yaralanmadan sadece 15 dakika sonra mekanik stresle açılan geçici kanallardan hücre içine Ca^{2+} iyonlarının girmesiyle başlar. Yeni yapılan ex-vivo çalışmalar, yaralanmayı takiben ekstraselüler Ca^{2+} temizliğinin, aksonları akut aksonal dejenerasyondan koruduğunu göstermiştir(53). Williams ve ekibi, in vivo kalsiyum görüntüleme kullanarak, SCI sonrası aksonların yüksek düzeyde Ca^{2+} biriktirdiğini ve bunun akut aksonal dejenerasyon riskini artırdığını tespit etmişlerdir. Nörofilamentlerin immün boyanması ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bir sıçan modelinde kompresyon yaralanmasından sadece 1 gün sonra lezyon bölgesindeki dorsal kolonda aksonların yarısından fazlasının kaybolduğu görülmüştür. AAD fazında hasar gören aksonların proksimal ve distalde dejeneratif süreçler oluşacaktır. Hücre gövdesinden ayrılan distal güdük 24-48 saat içinde Wallerian dejenerasyon sürecine girer. Bu dejenerasyon süreçlerini demiyelinizasyon izler.

Oligodendrositler, omurilik yaralanması (SCI) sonrasında savunmasız hale gelir, bu da onları nekrotik ve apoptotik hücre ölümüne yatkın kılar. Araştırmalar, bu hücre ölümünün yaralanmadan sonraki 48 saat içinde zirveye ulaştığını göstermiştir. SCI'yi takiben glutamat seviyeleri oligodendrositler için toksik düzeylere çıkar ve bu da Ca^{2+} akışını artırarak hücre ölümüne yol açan sinyal yollarını aktive eder. Ayrıca, oligodendrositler yüksek metabolik aktiviteleri, düşük glutatyon seviyeleri, yüksek demir içeriği ve bol peroksizomları nedeniyle oksidatif stres hasarlarına karşı oldukça hassastır. Artan oksidatif stres ve demir düzeyi, sekonder hasara neden olan ferroptozis ile ilişkilendirilmiştir. Apoptotik süreçler, SCI'nin bir kemirgen modelinde en az 3 hafta boyunca oligodendrosit sayısında sürekli bir azalmaya neden

olur. Bu hücre kaybı, aksonal işlevi ve korunmayı riske atan demiyelinizasyona yol açar. Bir oligodendrosit birden fazla aksonu miyelinle kapladığından, tek bir oligodendrositin apoptozu, çevredeki korunmuş aksonların da demiyelinizasyonuna neden olabilir ve bu durum lezyon bölgesinin distalindeki nörolojik işlev kaybını daha da şiddetlendirebilir.

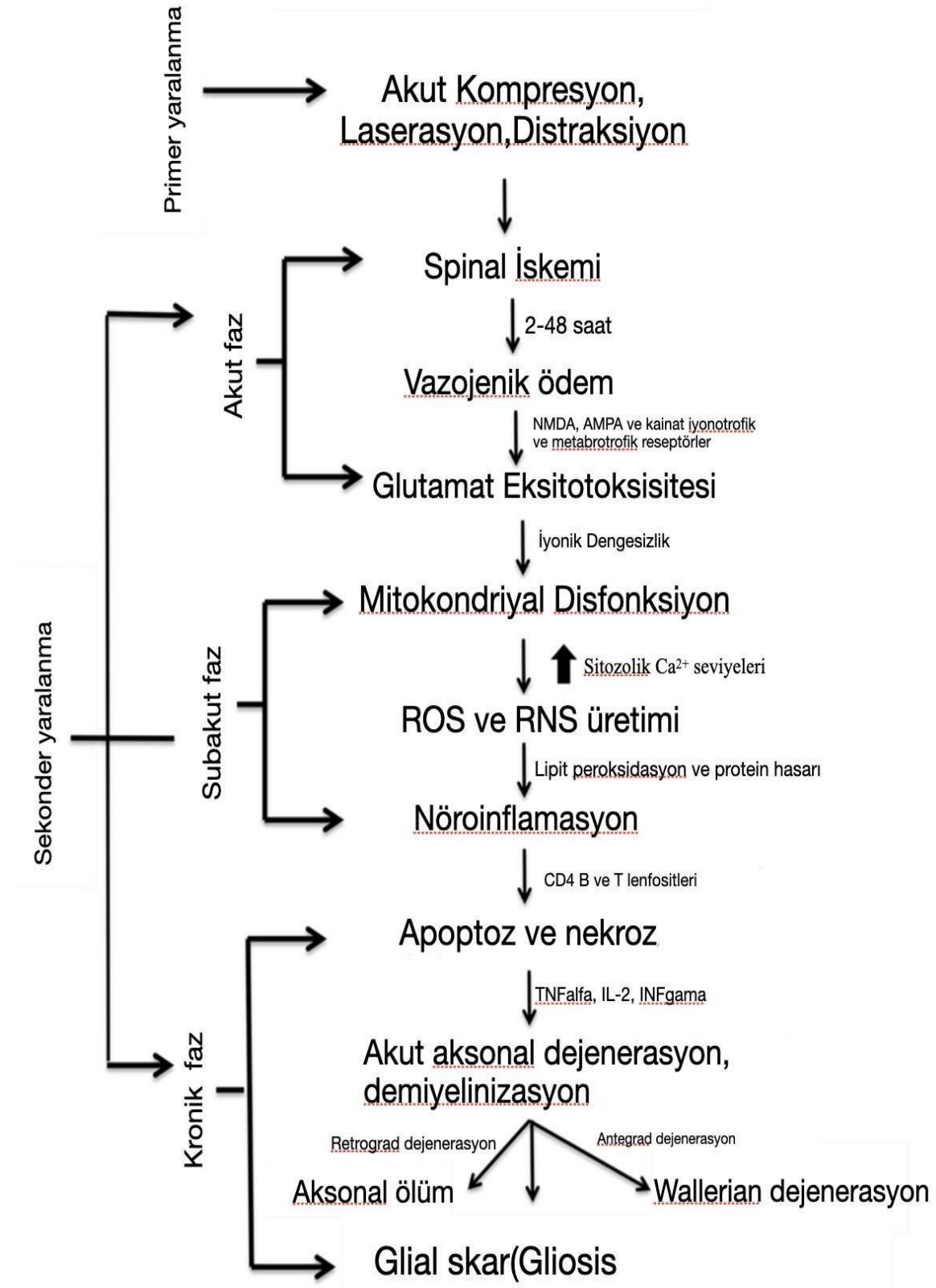
Astrositler, yaralanma bölgesini fiziksel olarak kapatan bir glial yara dokusunun oluşumunu başlatır. Fibroglial skar, lezyon içinde ve çevresinde gelişen çeşitli hücreler ve ekstraselüler matrinden (ECM) oluşur. SCI sonrası oluşan skar dokusu, genellikle "glial skar" olarak adlandırılır; bunun nedeni, bu dokuda çok sayıda astrosit bulunmasıdır. Ancak, skar dokusunda önemli miktarda perisitler ve fibroblastlar tarafından üretilen ekstraselüler matrinden (ECM) kaynaklanan bağ dokusu gibi glial olmayan bileşenlerin de dikkate alınması gerekir(54). Bu skar oluşumu, TGF- β (Transforming Growth Factor Beta) tarafından düzenlenir ve rejenerasyon gösteren aksonlar için fiziksel bir bariyer görevi görür(51).

Glial skar dokusu, lezyon bölgesinde rejenerasyonu engelleyebileceği gibi, aynı zamanda lezyonun etrafındaki canlı dokuyu koruma işlevi de görür(55). Glial skar oluşumu, iltihaplanma, reaktif gliyozis, apoptoz, otofaji ve diğer süreçler de dahil olmak üzere karmaşık bir dizi mekanizmanın sonucudur.

8.1.4.2.3 Kronik Faz

Subakut fazdan kronik faza geçiş, bir yandan astrosit skarının olgunlaşması, diğer yandan ise rejeneratif süreçlerin başlaması ile karakterizedir. Kronik faz, yaralanmadan yaklaşık 6 ay sonra başlar ve hastanın geri kalan hayatı boyunca devam eder.

Kronik fazın en önemli belirtisi, lezyon alanının giderek genişlemesi ve reaktif astrositler tarafından çevrelenmiş bir kistin oluşumudur. Kavitasyon süreci, devam eden nöronal ve oligodendroglial hücre ölümünün bir sonucudur. Lezyon alanında kist oluşumu, SCI'nin tipik özelliklerindendir. Kist oluşumu, devam eden apoptoz yanıtlarını ve astrositlerin TLR4/MyD88 sinyalleme aracılığıyla nekroptozise uğramasının bir sonucudur(56). Kist oluşumu, SCI hastalarının yaklaşık üçte birinde syringomyelia'ya yol açar(57). Syringomyelia, omurilik içinde bir kist (syrinx) veya boşluk oluşumuyla karakterize bir durumdur. Bu kist zamanla büyüyerek omuriliğe zarar verir.



Şekil-17: SCI fazlarında gerçekleşen yollar (51)

8.1.4.3 Omurilik Yaralanmasında Güncel Tedavi Seçenekleri

Omurilik yaralanması, hastaların kol ve bacak fonksiyonlarının, bağırsak gibi birçok organda fonksiyon kaybı ile karakterize olan uzun süreli sakatlık sebebidir. Bu durumun toplumsal maliyeti çok yüksektir. Bu maliyet ve sosyal problemlerin yaşanmaması için SCI tedavi ve yönetimi önemlidir.

Son yıllarda yayımlanan kılavuzlar, akut omurilik yaralanmalarının (SCI) tedavisinde en iyi uygulamaların belirlenmesinde ve tedavi yaklaşımlarındaki farklılıkların azaltılmasında önemli bir rol oynamıştır. Bu kılavuzlar arasında, Amerikan Nöroşirürji Derneği/Nöroşirürji Kongresi (AANS/CNS) tarafından hazırlanan öneriler yer almaktadır(58). Akut SCI'ye ilişkin en güncel kılavuz ise CNS tarafından yayımlanmış olup, bu kılavuz torakolomber omurga travması ve omurilik yaralanmasına odaklanmaktadır(59).

Sahada yapılan ilk müdahalede, öncelikle hava yolu açıklığının sağlanması, solunum ve dolaşımın güvence altına alınması önceliklidir; ardından SCI'nin erken tanınması ve zamanında müdahalelerin yapılabilmesi için hastaların hızla uzman merkezlere sevki amaçlanır(58). Son derece hassas olan omuriliğin daha fazla hasar görmesini önlemek için, şüpheli veya doğrulanmış yaralanması olan tüm hastalarda omurga immobilizasyonu uygulanmalıdır(58). Hastaların transport ve tetkik sürecinde mutlaka servikal kolar ve travma tahtası kullanılmalıdır. Hastalar mutlaka monitörlize izlenmelidir. Sistemik hipotansiyonun (sistolik kan basıncı <90 mmHg) oluşmasına, kısa süreli bile olsa, izin verilmemelidir çünkü bu durum, uzun vadede daha olumsuz nörolojik sonuçlara yol açabilir.

Omurilik yaralanmalı hastalar çoğunlukla multitravma hastası olduğundan hipovolemiye yatkındır. Bu nedenle bu hastalarda hipovolemik şok açısından alert olunmalıdır. Ayrıca sempatik sinir liflerinin hasar görmesi, periferik vazodilatasyona ve bradikardiye (nörojenik şok) neden olabilir. Resüsitasyon sonrasında, nörolojik hasarın düzeyini ve başlangıç fonksiyonlarını belirlemek için Amerikan Omurilik Yaralanması Derneği'nin (ASIA) Uluslararası Omurilik Yaralanması Nörolojik Sınıflandırma Standartlarına (ISNCSCI) göre bir muayene yapılmalı ve kayıt altına alınmalıdır(tablo-4). Muayene sonrasında görüntüleme yapılmalıdır.

Erken Cerrahi Dekompresyon

Omurilik yaralanması (SCI) sonrasında, omuriliğin üzerindeki sürekli mekanik baskı, kan akışını engelleyerek iskemik bir duruma yol açabilir. Bu durum, sinir dokusunun daha fazla

zarar görmesine ve hasarın genişlemesine neden olur. Erken cerrahi dekompresyon, omuriliğe uygulanan bu baskının ortadan kaldırılmasını sağlar, böylece hasarlı bölgeye olan kan akışını artırır. Bu işlem, ikincil yaralanmanın yayılmasını sınırlamayı amaçlar. Yapılan çalışmalar sonucunda erken cerrahi dekompresyonun hastanede yatış süresini kısalttığını ve daha iyi iyileşme skorları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir(60). Bu çalışmalar SCI tedavisinde daha erken cerrahilerin gerekliliğini vurgulayan ulusal bir aciliyet yaratmış ve SCI tedavisinin miyokard enfarktüsü ve iskemik inme gibi diğer kritik durumlarla benzer bir şekilde ele alınmasına neden olmuştur.

Steroid Kullanımı

Metilprednizolon (MPSS), inflamasyonu azaltan ve oksidatif stresi hafifleterek omurilik yaralanmalarında sinir hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen güçlü bir sentetik glukokortikoiddir. Yapılan Ulusal Akut Omurilik Yaralanması Çalışmaları (NASCIS) serisinde, yüksek dozda ve 48 saat boyunca uygulanan MPSS tedavisinin, ciddi enfeksiyon komplikasyonları (sepsis ve zatürre gibi) riskini artırdığı ve bu komplikasyonların, olası nörolojik faydaların önüne geçtiği gösterilmiştir(61). Ancak, daha kısa süreli bir tedavi olan 24 saatlik IV MPSS (30 mg/kg bolus + 5.4 mg/kg/saat 23 saat süreyle), daha az komplikasyon ile birlikte, yaralanmadan sonraki ilk 8 saat içinde uygulandığında nörolojik iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir.

Bu bulgular, tedavi süresi ve zamanlamasının, özellikle nörolojik iyileşme açısından kritik olduğunu göstermektedir. MPSS'nin daha kısa süreli uygulanması, komplikasyon riskini azaltarak, özellikle erken müdahale ile sinir hücrelerine fayda sağlamaktadır.

Kan basıncı düzenlemesi

Omurilik yaralanmalarında (SCI), hasar gören bölgedeki kan damarlarının yaralanması ve ödem, o bölgeye giden kan akışını sınırlayarak çevredeki dokuların oksijensiz kalmasına ve iskemik hasar oluşmasına neden olabilir. Bu nedenle, kan basıncını artırma stratejisi, hasarlı dokuların daha iyi beslenmesini sağlayarak bu bölgelerin korunmasına yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadır.

Amerikan Nöroşirürji Derneği (AANS) ve Merkezi Sinir Sistemi (CNS) kılavuzları, SCI sonrası ilk 7 gün boyunca ortalama arteriyel basıncın (MAP) 85-90 mmHg seviyesinde tutulmasını önermektedir(62). Bu seviyelerde kan basıncının korunmasının, hastaların omurilik yaralanma derecelerinde (AIS- Amerikan Omurilik Yaralanması Derneği sınıflandırması) uzun

vadede daha iyi iyileşme sağladığı kanıtlanmıştır. Bu yaklaşımın uygulanabilmesi için genellikle invaziv yöntemlerle kan basıncı takibi, intravenöz sıvı tedavisi ve sürekli vazopressör ilaçları kullanımı gerekmektedir.

Bununla birlikte bu şekilde ayrıntılı kan basıncı monitörizasyonu hastaların mobilizasyonunu zorlaştırır. Erken mobilizasyon ise, kardiyovasküler ve solunum problemlerinin yanı sıra bası yaralarının oluşumunu önlemede kritik bir öneme sahiptir. Bu sürecin güvenli bir şekilde yönetilebilmesi için multidisipliner bir yaklaşım gerekmektedir.

Tablo-5: SCI’da tedavi yöntemleri ve öneriler

Konu	Level	Öneri
Hipotansiyon	Level III	Hipotansiyonun düzeltilmesi için sistolik kan basıncının mümkün olan en kısa sürede 90 mm Hg'nin üzerine çıkarılması önemlidir. MAP 7 gün boyunca 85-90 mm Hg arasında tutulması önerilir.
Monitörizasyon	Level III	SCI hastalarının yoğun bakım şartlarında takibi önerilir.
Erken Dekompresyon	Level III	Erken dekompresyon postoperatif daha iyi sonuçlarla ilişkilidir ve önerilir.
Steroid tedavisi	Level I	Bazı yazarlar tarafından önerilmemekle birlikte kısa süreli uygulanmasının komplikasyon riskini azaltarak iyileşmeyi artırdığı gösterilmiştir.

Diğer Hedefe Yönelik Stratejiler

Erken dekompresyon, ortalama arteriyel basınç (MAP) artırımı ve intravenöz metilprednizolon (IV MPSS) tedavisi gibi mevcut yaklaşımların yanı sıra, omurilik yaralanması (SCI) sonrası gelişen sekonder hasarı hedefleyen yeni nöroprotektif stratejiler de preklinik çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Bu sekonder hasar, yaralanma anından sonra sinir dokusunda gelişen enflamasyon, oksidatif stres ve hücresel yıkım süreçlerini kapsar. Yeni tedavi stratejilerinde, bu süreçleri durdurmayı ya da yavaşlatmayı hedefleyen tedaviler üzerinde çalışmaktadır.

Bu moleküler ve farmakolojik tedavi süreçleri Tablo-6’te özetlenmiştir.

Tablo-6: SCI'de kullanılan hedef ajanlar

Terapötik ajan	Hedef molekül	Mekanizma
Diazoksit	K-ATP kanalı	İskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak apoptozu engeller, nöronların hayatta kalmasını sağlar.
Glibenklamit	Ca kanalları	Kalsiyum bağımlı hücre ölümünde etkilidir.
Levatiresetam	SV2A	Glutamat eksitotoksitesini, lipid peroksidasyonunu ve hücre ölümünü azaltır; astrosit işlevini iyileştirir.
Riluzol	Na ⁺ kanalı	Glutamat eksitotoksitesini ve inflamasyonu azaltır, nöropatik ağrıyı ve motor fonksiyon kaybını iyileştirir.
Progesteron	Progesteron	Aksonal gerileme ve nöron ölümünü azaltır, ancak çelişkili sonuçlar vardır.
Omega-3	Bilinmiyor	Oksidatif stresi, apoptozu ve inflamasyonu azaltır.
Minosiklin	Birden fazla reseptörde etkilidir	Davranışsal iyileşme, serbest radikaller ve lipid peroksidasyonunu azaltır.
Hipotermi	Bilinmiyor	Enflamasyonu, hücre ölümünü ve ödemi azaltır. Çelişkili sonuçlar mevcuttur.

8.2. Ferroptoz

Hücre ölümü, yaşam sürecinin kaçınılmaz ve önemli bir parçasıdır. Geleneksel olarak apoptoz ve nekroz olarak ikiye ayrılmıştır. Ancak son çalışmalar, otofaji ve nekroptoz gibi kendine özgü biyolojik süreçlere ve patofizyolojik özelliklere sahip yeni programlanmış hücre ölümü modlarının da var olduğunu göstermiştir. 2012'de Dixon, lipid reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimiyle karakterize edilen, demire bağımlı ve apoptotik olmayan bir hücre ölümü şekli olan ferroptoz kavramını ortaya atmıştır(63).

Ferroptoz, tipik nekrozda görülen sitoplazma ve organel şişmesi veya hücre zarının yırtılması gibi özelliklere sahip olmadığı gibi, apoptozda görülen hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin oluşumu gibi özellikleri de göstermez. Ayrıca, otofajideki gibi klasik çift katmanlı membran yapılarının (otofajik vakuoller) oluşumu da yoktur. Morfolojik olarak, ferroptoz mitokondrilerin belirgin büzülmesi, membran yoğunluğunun artması ve mitokondriyal kristallerin azalması veya kaybolması ile karakterizedir; bu özellikler onu diğer hücre ölümü modlarından ayırır. Hücre içindeki serbest demir veya demir içeren

enzimler, oksijen ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA) içeren lipidlerle reaksiyona girerek yüksek düzeyde membran lipid peroksitleri üretir. Bu, ferroptozun diğer hücre ölümü türlerinden ayırt edici özelliğidir(64).

Biyokimyasal açıdan, hücre içi glutatyon (GSH) seviyeleri ve glutatyon peroksidaz 4 (GPX4) aktivitesi azalır. Bu durumda, lipid peroksitler GPX4 tarafından metabolize edilemez ve Fe^{2+} , lipidleri Fenton reaksiyonuna benzer şekilde oksitleyerek yüksek miktarda reaktif oksijen türü (ROS) üretir; bu da ferroptozu tetikler. Genetik olarak, ferroptoz birden fazla gen tarafından kontrol edilen bir biyolojik süreçtir. Özellikle demir homeostazı ve lipid peroksidasyonu metabolizmasındaki genetik değişiklikleri içerir, ancak bu sürecin spesifik düzenleyici mekanizmaları daha fazla araştırılmalıdır(65).

8.2.1. Ferroptozu Etkileyen Mekanizmalar

Ferroptoz, demire bağımlı lipid peroksidasyonunun yol açtığı, kontrol altında olan bir hücre ölümü türüdür. Ferroptozun oluşumunu yöneten mekanizmalar şunlardır:

8.2.1.1. Demir Metabolizması

TFR1(transferrin reseptörü 1), hücrelere demir alımında temel rol oynar. Transferrin ile bağlanan Fe^{3+} , TFR1 aracılığıyla hücreye alınır ve STEAP3 tarafından Fe^{2+} ya indirgenir. Bu süreç, hücre içi demir dengesini korur ve TFR1'in işlevi bu denge için kritik öneme sahiptir. Hücresel süreçler, serbest demir seviyelerini değiştirerek ferroptoz duyarlılığını etkileyebilir(66). Transferrin ve reseptörü, demir alımını artırarak ferroptoz katkıda bulunur. Hücre içindeki serbest demir, Fenton reaksiyonu aracılığıyla reaktif oksijen türleri (ROS) üretir. Demir birikimi, lipid peroksidasyonunu artırarak ferroptozu yatkınlığı yükseltir(65).

8.2.1.2. Lipid Peroksidasyonu

Hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu, ferroptozun kritik bir adımıdır(65). Ferroptoz, demir bağımlı lipid ROS birikimi ile tetiklenir ve lipid metabolizması bu süreçle yakından ilişkilidir. Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA'lar) lipid peroksidasyonuna karşı hassastır ve ferroptoz için temel bileşenlerdir(67). PUFA'lar, ferroptoz sinyalini iletmek için membran fosfolipidlerine esterleşmeli ve oksitlenmelidir. Araştırmalar, araşidonik asit (AA) veya türevlerini içeren fosfatidiletanolaminin (PE) hücrelerde ferroptozu açan kilit fosfolipid olduğunu göstermiştir. Asetil-CoA sentetaz uzun zincirli aile üyesi 4 (ACSL4) ve lizofosfatidilkolin asiltransferaz 3 (LPCAT3), PE'nin biyosentezinde ve yeniden yapılandırılmasında yer alarak PUFA'ları aktive eder ve hücre membranı özelliklerini etkiler.

ACSL4 ve LPCAT3'ün ekspresyonunu azaltmak, hücrelerde lipid peroksit birikimini engelleyerek ferroptozu baskılar(68). PUFA-PE, lipoksijenaz (LOX) tarafından oksitlenerek hücrelerde ferroptozu yol açar. Lipid hidroperoksitlerin birikimi, hücre zarının bütünlüğünü bozarak hücre ölümüne yol açar.

8.2.1.3. Glutasyon (GSH) Düzeylerinin Azalması

GSH, hücre içi önemli bir antioksidandır. Sistem Xc^- , fosfolipid çift katmanlarında yaygın olarak bulunan bir amino asit taşıyıcıdır ve hücrelerin antioksidan savunmasında kritik bir rol oynar. Bu sistem, SLC7A11 ve SLC3A2 alt birimlerinden oluşan bir heterodimerdir(69). Sisteme bağlı olarak, hücreler dış ortamdan sistein alırken, glutamati dışarı atar. Alınan sistein, hücre içinde indirgenerek glutasyon (GSH) üretiminde kullanılır. GSH, glutasyon peroksidaz enzimlerinin yardımıyla reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin etkisini azaltır.

Sistem Xc^- 'un inhibe edilmesi, sistein alımını engelleyerek GSH üretimini düşürür, bu da GPX aktivitesini azaltır, hücrel antioksidan savunmayı zayıflatır ve lipid bazlı reaktif oksijen birikimi ile ferroptozu yol açar. Ayrıca, P53 proteini SLC7A11'in ifadesini baskılayarak sistein alımını azaltabilir, böylece GPX4 aktivitesi düşer, lipid peroksitlerin birikimi artar ve ferroptoz süreci tetiklenir(65).

8.2.1.4. Glutasyon Peroksidaz 4 (GPX4) İnhibisyonu

GPX4 ferroptozun oluşumunda kilit bir rol oynar ve lipid peroksit oluşumunu engelleyerek bu sürecin ana düzenleyicisidir. GPX4, glutasyonu (GSH) okside glutasyon (GSSG) hâline dönüştürür ve sitotoksik lipid peroksitleri (L-OOH) karşılık gelen alkollere (L-OH) indirger. GPX4 aktivitesinin inhibisyonu, ferroptozun bir göstergesi olan lipid peroksitlerin birikimine yol açabilir. GPX4 ekspresyonu azalmış hücrelerin ferroptozu daha duyarlı olduğunu, GPX4 ekspresyonunun artmasının ise ferroptozu engel olduğunu göstermiştir(70).

8.2.1.5. Mitokondriyal Disfonksiyon

Ferroptoz, mitokondriyal dış membranda yer alan voltaj bağımlı anyon kanalları (VDAC) aracılığıyla düzenlenir. VDAC'lar, hücre içinde iyon ve metabolit taşınımını sağlayan transmembran kanalları olup, enerji üretimi ve hücrel metabolizmanın düzenlenmesinde kilit rol oynar(71). Ferroptoz sürecinde, bu kanalların işlevi önemli bir yere sahiptir. Mitokondrilerdeki işlev bozuklukları ve artmış mitokondriyal ROS üretimi, ferroptozun indüksiyonunda rol oynayabilir(65).

Yagoda ve çalışma arkadaşları, erastin'in VDAC'lara etki ederek mitokondriyal disfonksiyona yol açtığını, bunun sonucunda hücrede oksidan üretiminin arttığını ve bu oksidanların demir aracılı hücre ölümüne (ferroptoz) neden olduğunu göstermiştir. Bu durum, VDAC'ların ferroptozdaki düzenleyici rolünü vurgulamaktadır(72).

8.2.1.6. p53 Yolu

Tümör baskılayıcı protein **p53**, ferroptozu modüle edebilir. p53, **SLC7A11** gibi antioksidan savunma genlerinin ekspresyonunu düzenleyerek Sistemi Xc⁻ etkileyebilir. Bazı araştırmalar, P53'ün aktivasyonunun hücrelerin antioksidan kapasitesini azaltarak ferroptozu neden olabileceğini göstermektedir(73). P53, SLC7A11 gen ekspresyonunu düşürerek sistin alımını engelleyebilir ve bu da GPX4 enziminin aktivitesini azaltarak lipid peroksidasyonuna ve ferroptozu yol açar. Ayrıca, P53-SAT1-ALOX15 yolu üzerinden lipid peroksidasyonunu artırarak ferroptozu katkıda bulunabilir. Diğer yandan, bazı çalışmalar P53'ün ferroptozu karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini öne sürmektedir. P53 indükleyicisi nutlin-3 ile tedavi edilen hücrelerin ferroptozu direnç gösterdiği bulunmuştur(74). Bu koruyucu etkinin, GSH metabolizmasını düzenleyen ve hücre içi glutatyon seviyelerini artıran CDKN1A (P21) aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.

8.2.1.7. Koenzim Q10 (CoQ10) ve FSP1(Ferroptoz Baskılayıcı Protein 1)

FSP1, GPX4'ten bağımsız olarak CoQ10'u indirger. CoQ10, lipid peroksidasyonunu önleyen lipofilik bir antioksidandır(75). Bu süreçte, COQ10 (ubikinon-10) indirgenir ve lipid peroksidasyonunun yayılmasını durduran lipofilik bir antioksidan işlevi görür. FSP1 ekspresyonu ile ferroptoz direnci arasında pozitif bir ilişki saptanmış, FSP1'in akciğer kanseri hücrelerinde ve fare tümör modellerinde ferroptozu karşı direnç sağladığı gösterilmiştir.

8.2.1.8. Otofaji

Ferritinofaji, ferritinin otofajik yıkım sürecini ifade eden bir mekanizmadır ve hücre içindeki serbest demir seviyelerinin artmasına neden olarak ferroptozu katkıda bulunabilir. Normal fizyolojik koşullarda, ferritinofaji hücre içi demir homeostazını sağlamakta önemli bir rol oynar. Ancak, bu sürecin aşırı aktivasyonu hücre içi demir birikimine, yani demir aşırı yüklenmesine yol açabilir. Artan demir seviyeleri, hücrede lipid peroksidasyonu sürecini tetikler ve bu lipid peroksidasyonuna birikimi, ferroptoz adı verilen demire bağımlı hücre ölüm mekanizmasının başlatılması için kritik bir faktördür. Dolayısıyla, ferritinofaji, demir metabolizmasını ve hücre içindeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini düzenleyerek

8.2.2. Ferroptoz Yolağının Etkili Olduğu Hastalıklar

Pankreas Kanseri: Yapılan çalışmalara göre, artesunat, Cotylenin A (CN-A) ve sulfasalazin gibi bileşikler pankreas kanseri hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimini artırarak ferroptoz adı verilen bir hücre ölüm mekanizmasını tetiklemektedir(77). Bu süreç, MIAPaCa-2 ve PANC-1 gibi pankreas kanseri hücre hatlarında hücre çoğalmasını durdurarak tümör büyümesini engelleyebilir(65).

39

güçlü bir şekilde indükler(78). Sorafenib'in bu etkisi, HCC hücrelerinde demir birikimini artırıp lipid peroksidasyonunu başlatarak gerçekleşir, böylece kanser hücrelerinin ölümü sağlanır(79).

Mide Kanseri: Erastin adlı ilaç, mide kanseri hücrelerinde ferroptozu neden olur ve bu süreçte CDO1 enzimi önemli bir rol oynar. CDO1, hücrelerde sistein seviyesini azaltarak GSH sentezini sınırlar(80). GSH eksikliği, hücre içi oksidatif stresin artmasına ve lipid peroksidasyonu ile ferroptozun başlamasına yol açar. Bu süreç, kanser hücrelerinin ölmesini sağlar.

Kolorektal Kanseri (CRC): Kolorektal kanser hücrelerinde P53 proteini, ferroptozu düzenleyebilir ve bazen bu süreci engeller. Ancak, P53'ün kaybı, ferroptozu daha duyarlı hale gelmesine neden olabilir(81). Sisplatin ve ferroptoz indükleyicisi erastin gibi ilaçların kombinasyonu, kolorektal kanser hücrelerinde daha etkili bir hücre ölümüne yol açabilir ve bu kombinasyon tedavide yeni bir yaklaşım sunar.

Meme Kanseri: Üçlü negatif meme kanseri (TNBC), diğer meme kanseri türlerine kıyasla daha agresif bir seyir izler ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. TNBC hücreleri, hayatta kalmak için sistine bağımlıdır ve bu nedenle Xc- sisteminin aktivitesinin engellenmesi, sistin alımını azaltarak ferroptozu tetikler(82). Bu mekanizma, TNBC tedavisinde yeni hedefler sunar. Ferroptoz indükleyicileri, TNBC'nin hücre ölümünü artırmak için kullanılabilir.

Akciğer Kanseri: Akciğer adenokarsinomları, demir-kükürt kümesi biyosentezinde önemli bir rol oynayan NFS1 enziminin aşırı üretimi ile ferroptozu karşı direnç geliştirebilir. Ancak, NFS1 inhibisyonu ve ROS birikimi sonucunda hücreler ferroptoz ile karşılaşır(83). Ayrıca, P53 proteininin aktivasyonu, ferroptozu duyarlılığı artırarak kanser hücrelerinde daha etkili bir hücre ölümünü başlatır.

Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom (ccRCC): Bu kanser türü, hücre içi GSH seviyesine bağımlıdır. GSH sentezinin inhibisyonu, bu hücrelerde oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu yoluyla ferroptozu tetikleyebilir(81). Ferroptoz, ccRCC tümörlerinin büyümesini yavaşlatmada etkili bir strateji olabilir.

Adrenokortikal Karsinomlar (ACC): ACC'ler son derece saldırgan kanserlerdir ve genellikle mevcut tedaviler yetersiz kalır. Bu kanserlerde ferroptozu duyarlılık artmıştır ve GPX4 adlı bir enzimin artan ifadesi bu süreci düzenler(84). Ferroptoz indükleyicileri, ACC tedavisinde mitotandan daha etkili ve daha az toksik bir alternatif sunabilir, bu da hastalar için yeni tedavi seçenekleri oluşturabilir.

8.2.2.2 Ferroptoz ve Nörolojik Hastalıklar

Merkezi sinir sistemi veya periferik sinir sistemi bölgelerinde demir birikiminin yaygın olduğunu göstermektedir. Bu birikim genellikle hücre içi demir dengesizliğinden kaynaklanır ve demirle ilişkili Fenton reaksiyonları yoluyla oksidatif strese neden olur. Demir birikimi, lipid peroksidasyonu ile birlikte, nörolojik hastalıkların gelişiminde önemli bir rol oynar. Ayrıca, bu süreçlerde GSH (glutatyon) ve GPX4 (glutatyon peroksidaz 4) seviyelerinin azalması da gözlemlenmiştir(85).

Alzheimer Hastalığı (AH): Alzheimer hastalığı, bilişsel işlev bozukluğu ile karakterize en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Alzheimer hastalarında hipokampus bölgesinde yüksek demir seviyeleri görülür(86). Beyindeki demir dengesizlikleri, ROS üretimini artırarak hücrelerde oksidatif hasara yol açar. Bu durum, özellikle nöronlar gibi hassas hücrelerde yıkıcı etkilere neden olur. Farelerde yapılan çalışmalarda, GPX4'ün yıkımının nörodejeneratif değişikliklere ve nöron kaybına yol açtığı, ayrıca E vitamini eksikliğinin bu durumu kötüleştirdiği bulunmuştur(87). Ferroptozun engellenmesi, Alzheimer hastalarının prognozunu olumlu yönde etkileyebilir.

Parkinson Hastalığı (PD): Parkinson hastalığının temel patolojik özelliği, dopaminerjik nöronların dejenerasyonu ve substantia nigra bölgesinde yüksek demir birikimidir. Bu demir birikimi, nöronal hasarı ve oksidatif stresi artırır(88). Deferoksamin (DFO) gibi demir şelatörleri, oksidatif stresi azaltarak dopamin aktivitesini artırır ve motor fonksiyon bozukluklarını hafifletir(89). DFO'nun erken evre Parkinson hastalarında nöronlar üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bilinmektedir.

Huntington Hastalığı (HD): Huntington hastalığı, demir birikimi ve glutamat-GSH dengesizlikleriyle karakterize edilen ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. HD hastalarında plazma GSH seviyeleri düşük olup, ferroptoz ile ilişkili GPX aktivitesi azalır. Fer-1 gibi ferroptoz inhibitörleri ve demir şelatörleri, HD'deki nöronlar üzerinde koruyucu etkiler gösterir(90).

Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS): ALS, beyin sapı, omurilik ve serebral korteksteki motor nöronları etkileyen bir hastalıktır. ALS hastalarının omuriliğinde belirgin bir demir birikimi tespit edilmiştir. Bu hastalarda artan lipid peroksidasyonu ve azalan GSH seviyeleri,

motor nöron dejenerasyonunu hızlandırır(91). GSH seviyesindeki düşüş, ferroptozun hızlanmasına katkıda bulunur ve motor fonksiyon kaybını şiddetlendirir.

Friedreich Ataksisi (FRDA): FRDA, mitokondride demir birikimi ile yakından ilişkili otozomal resesif kalıtsal bir nörodejeneratif hastalıktır. Bu hastalıkta, lipid peroksit ve ROS seviyeleri artarken, GSH seviyeleri azalır. Bu durum, FRDA hastalarının oksidatif strese karşı daha hassas olduğunu ve ferroptoz mekanizmasının hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir(92).

Özetle, nörodejeneratif hastalıklarda demir birikimi ve ferroptoz, nöronlarda oksidatif strese bağlı hasarın artmasına yol açmakta ve hastalığın ilerleyişini hızlandırmaktadır. Bu hastalıkların tedavisinde demir şelatörleri ve ferroptozu hedef alan yaklaşımlar potansiyel tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır.

8.2.2.3. Ferroptoz ve İnme

İskemik inme, tüm inme vakalarının yaklaşık %80'ini oluşturur. Şiddetli iskemik ve oksijen yetersizliği durumlarında, beyin bazı bölgelerinde (bazal gangliyonlar, talamus ve beyaz cevher gibi) demir birikimi artar(93). Araştırmalar, iskemik inme geçiren farelerde sinir hücrelerinde GSH seviyesinin azaldığını, lipid peroksidasyonunun arttığını ve GPX aktivitesinin düştüğünü gösteriyor(94). Ayrıca, ferroptoz inhibitörlerinin kullanımı, iskemik inme hastalarının iyileşme sürecine önemli bir katkı sağlar. Hemorajik inme çalışmaları ise N-asetilsistein (NAC) adlı maddenin, beyin hücrelerindeki zararlı lipidleri etkisiz hale getirerek ferroptozu karşı koruma sağladığını ortaya koyuyor(65,95).

8.2.2.4. Ferroptoz ve Travmatik Beyin Hasarı(TBI)

TBI (travmatik beyin hasarı) hastaları için geliştirilen hiçbir nöroprotektif tedavi klinik olarak etkili sonuçlar göstermemiştir. TBI'nın karmaşık mekanizmalarını ve uzun vadeli etkilerini anlamak büyük önem taşır(96). Travmatik beyin hasarının patofizyolojisinde demir birikimi, düzensiz demir metabolizması, ferroptozla ilişkili genlerin düzenlenmesi, GPX aktivitesinin azalması ve ROS birikimi gibi biyolojik süreçler eşlik eder. Ferroptoz inhibitörü Fer-1'in uygulanması, demir birikimini, nöronal dejenerasyonu ve yaralanmayı önemli ölçüde azaltır ve hastaların prognozunu iyileştirir, böylece ferroptozu hedefleyen TBI tedavisi için

deneysel bir temel sağlar(97). TBI sonrası ferroptozun oluştuğu bilinse de, ferroptozun TBI'nın kronik aşamalarındaki kesin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır(96).

Travmatik beyin hasarı (TBI) için geliştirilen nöroprotektif tedavilerin şu ana kadar klinik etkinlik gösteremediği bilinmektedir. TBI'nın karmaşık mekanizmalarını ve uzun vadeli etkilerini anlamak bu nedenle kritik önem taşımaktadır. TBI'nın patofizyolojisi demir birikimi, düzensiz demir metabolizması, ferroptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonu, glutatyon peroksidaz (GPX) aktivitesinin azalması ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikimi gibi biyolojik süreçlerle karakterizedir. Yapılan çalışmalarda, ferroptoz inhibitörü Fer-1'in uygulanmasının demir birikimini, nöronal dejenerasyonu ve doku hasarını önemli ölçüde azalttığı ve hastaların prognozunu iyileştirdiği gösterilmiştir, bu da ferroptozla yönelik TBI tedavileri için deneysel bir temel oluşturmaktadır. TBI sonrası ferroptozun rolü iyi tanımlanmış olmasına rağmen, ferroptozun TBI'nın kronik evrelerindeki spesifik etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

8.2.2.5 Ferroptoz ve Akut Böbrek Yetmezliği (AKI)

Akut böbrek hasarında (AKI) ferroptozun inflamatuvar yanıtlarda rol oynadığını ve ACSL4'ün AKI'de ferroptozu başlatan ana faktör olduğunu ortaya konmuştur. ACSL4 inhibisyonunun, iskemi/reperfüzyon (I/R) kaynaklı böbrek hasarını önleyerek böbrek dokusunu koruduğu gösterilmiştir. Linkermann ve ark. ferroptozun in vivo olarak akut tübüler nekroz ve iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarında fonksiyonel olarak anlamlı olduğunu bulmuş ve bir ferroptoz inhibitörünün, yeni bir üçüncü nesil ferrostatinin (16-86) bu hasara karşı koruduğunu göstermiştir(98).

8.2.2.6. Ferroptoz ve Omurilik Yaralanması

Omurilik yaralanması (SCI), iki aşamalı patolojik süreci içerir: primer ve sekonder yaralanma. Primer yaralanma, travma anında meydana gelen ve genellikle geri dönüşü olmayan hücresel hasarı ifade ederken, sekonder yaralanma, primer hasarın tetiklediği ve bir dizi biyokimyasal ve hücresel değişikliklerle ilerleyen, potansiyel olarak geri döndürülebilir bir süreçtir. Sekonder yaralanma süreci, akut, subakut ve kronik aşamalardan geçer ve bu aşamalar inflamatuvar yanıt, serbest radikal oluşumu ve programlanmış hücre ölümü (PCD) gibi hücresel ve moleküler olayları içerir.

SCI patofizyolojisinde, programlanmış hücre ölümü mekanizmaları arasında otofaji, nekroptoz, piroptoz ve ferroptoz gibi süreçler yer almaktadır(99). Son kanıtlar, ferroptozun SCI sırasında önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. Özellikle demir aşırı yüklenmesi,

reaktif oksijen türleri (ROS) birikimi, lipid peroksidasyonu ve glutamat birikimi gibi ferroptozla ilişkili temel özelliklerin SCI patolojik süreçlerinde belirgin şekilde ortaya çıktığı tespit edilmiştir(100). Bu bulgular, ferroptozun SCI'nin sekonder yaralanma aşamasında kritik bir rol oynayarak, nöroinflamasyon ve hücre ölümüne katkıda bulunduğunu ve dolayısıyla tedavi stratejilerinde hedeflenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Omurilik hasarında ferroptoz ilişkili bölümler tablo-7'de anlatılmıştır.

Tablo-7: Omurilik yaralanması ve ferroptoz ilişkili yollar

Ferroptoz İlişkili Bölüm	Etki Mekanizması
Demir metabolizması	Yaralanma bölgesinde hasar sonrasında eritrosit yıkımı ve bunun sonucunda demir birikimi olur. Artan demir birikimi ROS birikimine neden olur. Ayrıca artan NO seviyeleri demir metabolizmasını bozarak ROS birikimini artırır. Bu da mitokondriyal işlev bozukluğu ve ferroptozu tetikler(100,101).
Lipit metabolizması	Yağ asitleri, SCI sonrası oluşan oksidatif stres yanıtında önemli bir rol oynar. Ferroptoz sırasında, demir ve reaktif oksijen türleri (ROS) etkileşime girerek hücre hasarına yol açar. Ayrıca, kısa zincirli yağ asitleri (SCFA) gibi moleküllerin, lipid metabolizmasını etkileyerek SCI üzerindeki iyileşme süreçlerine katkı sağladığı belirtilmiştir(100,102).
Cystine/glutamate antiporter (System Xc-)	GSH'nin üretimi ve kullanımı, ferroptozun kontrolünde kritik bir rol oynayan GPX4 enzimi tarafından düzenlenir. Bu enzim, hücredeki oksidatif stresi azaltarak ferroptozu engeller. Araştırmalar, GPX4 seviyelerinin azalmasının omurilik hasarıyla ilişkili olduğunu ve E vitamini gibi ferroptoz inhibitörlerinin bu süreci yavaşlatabileceğini göstermektedir(103). Bu bulgular, omurilik hasarının Ferroptozla karşı koruyucu olan Xc-GSH-GPX4 sistemiyle bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

8.3. Ebselen

Ebselen, oksidatif stresle savaşan ve hücreleri serbest radikal hasarına karşı koruyan bir bileşik olarak dikkat çeker. Bu bileşik, vücutta doğal olarak bulunan glutatyon peroksidaz enzimini taklit eder ve bu sayede hücrelerdeki zararlı molekülleri etkisiz hale getirir. Ebselen'in

bu etkileri, hem laboratuvar ortamında (in vitro) hem de canlı modellerde (in vivo) yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir(104). Bu özellikleri sayesinde, ebselen günümüzde kalp hastalıkları, artrit, inme, ateroskleroz ve kanser gibi birçok hastalığın tedavisinde araştırılmaktadır(105).



Şekil-19: Ebselen 2D molekül yapısı(106)

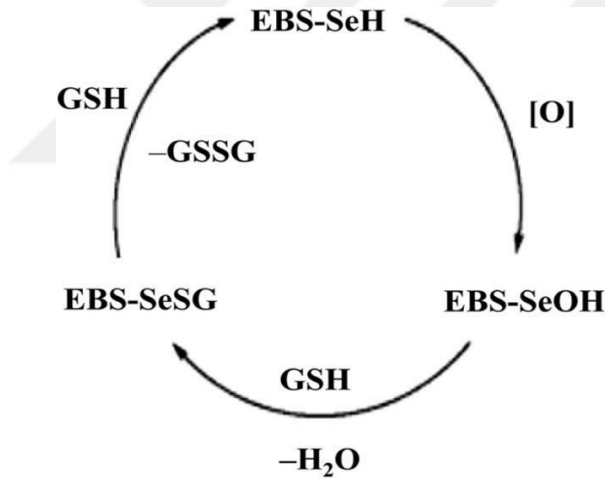
Ebselen'in kimyasal yapısı, 2-fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on olarak adlandırılır ve bu yapı, bileşiğin hidroperoksitleri indirgeyerek zararlı etkilerini azaltmasını sağlar. İlk kez 1984 yılında keşfedilen bu özellikleri sayesinde Ebselen, yıllar içinde hücre ve doku sağlığı üzerindeki olumlu etkileri açısından geniş çapta araştırılmıştır. Antioksidan savunma mekanizmasını destekleme yeteneği, onu hastalık tedavilerinde umut vadeden bir seçenek haline getirmiştir.

Ebselen'in özellikleri sadece glutatyon peroksidaz aktivitesiyle sınırlı değildir. Aynı zamanda fosfolipid hidroperoksitleri de etkisiz hale getirebilir ve bu sayede hücre zarlarını oksidatif hasardan korur. Araştırmalar, Ebselen'in düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) üzerinde koruyucu etkiler gösterdiğini, bu molekülleri oksidatif hasara karşı koruduğunu ortaya koymuştur(107). Ayrıca, bu bileşik sadece glutatyon değil, diğer tiyol bileşikleriyle de etkileşime girebilir ve bu durum onu çok yönlü bir savunma aracı haline getirir. Bu özellikler, Ebselen'in oksidatif strese bağlı birçok hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyelini ortaya koymaktadır.

8.3.1. Ebselen Molekül Yapısı

Ebselen olarak bilinen 2-Fenilbenzo[d][1,2]-selenazol-3(2H)-on, ilk kez Lesser ve Weiss tarafından 1924'te sentezlendi(108)(Şekil-21). Diğer adları SPI1005, DR3305, PZ-51'dir.

Ebselen, güçlü elektrofil, selenyum içeren bir bileşik olup, hücreleri oksidatif strese karşı koruma yeteneğiyle bilinir(109). Kimyasal yapısı sayesinde, proteinlerdeki belirli sistein gruplarıyla etkileşime girerek etki gösterir. Ebselen, vücutta doğal olarak bulunan glutatyon peroksidaz enzimine benzer şekilde çalışarak reaktif oksijen türlerini (ROS) etkisiz hale getirir(110). Bu mekanizma, aktif bölgedeki selenyum molekülünün oksidasyon durumundaki değişikliklere dayanır. İlk aşamada, ROS, dinlenme halindeki selenol formunu (EBS-SeH) selenenik aside (EBS-SeOH) oksitler. Daha sonra, selenenik asit, glutatyon (GSH) aracılığıyla selenenil sülfid ara ürünü (EBS-SeSG) oluşarak tekrar aktif selenol forma indirgenir. Bu süreç, Ebselen'in ROS'ları nötralize etme kapasitesinin temelini oluşturur ve oksidatif hasarı azaltmaya yardımcı olur(111)(Şekil-22).



Şekil-20: Ebselen'in ROS inaktivasyon döngüsü(111)

Ebselen, glutatyon peroksidaz aktivitesini taklit etmesinin yanı sıra, hücrelerin antioksidan savunmasında kritik rol oynayan tioredoksin sistemiyle de etkileşime girer(112). Bu bileşik, tioredoksin redüktaz (TrxR) için ideal bir substrat olarak görev yapar ve TrxR'nin hidrojen peroksit (H₂O₂) gibi reaktif oksijen türlerini nötralize etme yeteneğini artırır. Ayrıca, ebselen dehidroaskorbik asit (DHA) redüktaz aktivitesini taklit ederek, DHA'nın yeniden askorbik aside dönüşümünü destekler ve böylece hücrelerin oksidatif hasara karşı

korunmasında önemli bir rol oynar(112). Ebselen'in bu farmakolojik etkileri, büyük ölçüde güçlü antioksidan ve hücre koruyucu özelliklerine dayanmaktadır.

Son dönem hayvan çalışmaları, Ebselen'in çeşitli hastalık modellerinde güçlü antiinflamatuvar etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur(113). Antioksidan özellikleri nedeniyle, lipit peroksidasyonu, ateroskleroz gelişimi, tromboz oluşumu gibi süreçleri baskılar ve hücre koruyucu özellikler gösterir(114,115). Yağda çözünen bir yapıya sahip olması, Ebselen'in hücre içine kolaylıkla girmesine olanak tanır. Ebselen, glutatyon tiyolünü oksitleme ve hidrojen peroksidi suya indirgeme yeteneğiyle, glutatyon peroksidaz benzeri bir mekanizma ile lipit peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder(115).

Ebselen, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu sitotoksikite ve DNA hasarına karşı etkili bir koruma sağlar. İskemi ve reperfüzyon hasarında artan H_2O_2 , süperoksit, hidroksil radikali ve peroksinitrit gibi reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin zararlı etkilerini hızla nötralize eder(113). Bu özellikleri sayesinde Ebselen, inme, artrit, organ nakli sonrası komplikasyonlar, astım, diyabete bağlı ateroskleroz ve nefropati gibi birçok klinik durumda potansiyel tedavi edici bir ajan olarak araştırılmaktadır. Ayrıca, sinir hücrelerinde inhibitör etkiler göstererek nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde de umut vadetmektedir(116).

8.3.2. Ebselen'in Kullanım Alanları

Süperoksit anyonu, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS), hücrede lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına yol açarak hücre yaşlanmasını hızlandırır. Bu süreç, diyabet, felç, Parkinson ve Alzheimer gibi nörolojik hastalıkların yanı sıra kıkırdak bozulmasıyla ilişkili diğer hastalıklara katkıda bulunur(111). Ayrıca, ROS kaynaklı oksidatif stres, apoptozu tetikleyen önemli bir faktördür. Serbest radikalleri etkisiz hale getiren antioksidan bileşikler, bu nedenle tıbbi açıdan büyük önem taşır. Ebselen, serbest radikalleri temizleme kapasitesinin yanı sıra iyi kan-beyin bariyeri geçirgenliği ve oral alımdan sonra hızlı emilim özellikleri ile öne çıkmaktadır. Bu özellikleri Ebselen'i, oksidatif stresin neden olduğu hastalıkların tedavisinde etkili bir ilaç adayı haline getirmektedir.

Çeşitli araştırmalar, Ebselen'in iskemi ve reperfüzyon sonucu oluşan nöronal hücre ölümünü azalttığını ortaya koymuştur. Ebselen, glutathion peroksidaz (GPx) benzeri etkisi ve anti-lipoperoksidatif özellikleri ile nöronların yapısını koruyarak oksidatif stres seviyesini düşürür(117). Ebselen, kan-beyin bariyerini geçebilen nispeten küçük bir lipofilik moleküldür ve bu da onu serebral iskemi tedavisi için iyi bir aday yapar. Rodent modellerinde, Ebselen'in

hem gri hem de beyaz maddede ve beyin ventroposterior nukleus (VPN) bölgesinde iskemik hasara karşı önemli bir koruma sağladığı gösterilmiştir(118).

Bipolar bozukluk tedavisinde yaygın kullanılan lityum, yüksek toksisite ve yan etkilere neden olabilir. Lityum, inositol monofosfataz (IMPase) enzimini inhibe ederek etki gösterir(111,119). Son araştırmalar, Ebselen'in de IMPase'yi inhibe ettiğini ve lityumun etkilerini taklit ettiğini göstermiştir. Bu nedenle Ebselen, lityuma göre daha güvenli bir alternatif olabilir(111).

Ebselen, glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesini taklit edebilme yeteneği sayesinde, GPx seviyelerinin düşük olduğu diyabete bağlı hastalıkların tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir(115). Bu sayede ebselen, GPx eksikliğini dengeleyerek diyabet kaynaklı ateroskleroz ve nefropati gibi sorunların tedavisinde etkili bir çözüm sunabilir.

Kalp hastalıklarında ROS, RNS ve oksidatif stres önemli bir rol oynamaktadır. Ebselen, sıçanlarda yapılan çalışmalarda GPx aktivitesini artırarak kalp üzerinde koruyucu etkiler göstermiştir(120). Kronik hipertansiyon sürecinde Ebselen, damar ve endotel yapısını korurken, diyabetik hastalarda hipergliseminin neden olduğu artan ROS seviyelerini düşürerek endotel fonksiyon bozukluğunu önlemektedir(121).

Ksenobiyotik bileşikler, hücrelerde farklı yollarla toksik etkilere neden olabilir. Özellikle ROS üretimini artıran ksenobiyotikler, Ebselen'in antioksidan özellikleri sayesinde etkili bir şekilde zararsız hale getirilebilir(122). Örneğin, Ebselen, kadmiyum, demir, metilciva (MeHg) ve cisplatin gibi metallerin neden olduğu hücre toksisitesini azaltmada oldukça başarılıdır ve bu metallerin hücrelere verdiği oksidatif hasarı engeller.

Ebselen, birçok mikroorganizmaya karşı etkili bir antimikrobiyal bileşik olarak bilinmektedir. Laboratuvar çalışmaları, Ebselen'in **Plasmodium berghei** ve **P. falciparum** türlerine karşı anti-malarial özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Ebselen, **P. berghei**'de metionin ve adenosin alımını engelleyerek enfeksiyonun yayılmasını önler. Ayrıca, klorokine dirençli **P. falciparum** türlerinde parazitin aseksüel evrelerinin gelişimini durdurarak etkili bir savunma sağlar(123).

Ebselen'in etkisi olan hastalıklarla ilgili olarak özet tablo-8'de verilmiştir.

Tablo-8: Ebselen'in kullanım alanları (111)

Hastalık	Ebselen'in yararlı özelliği
----------	-----------------------------

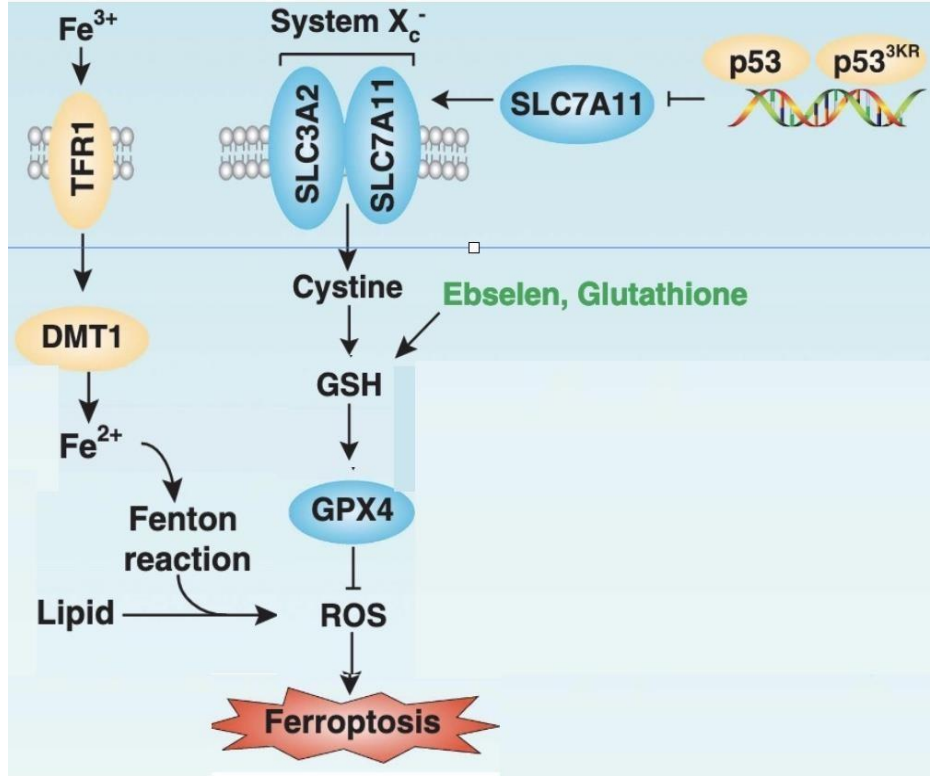
Alkol ilişkili göz problemleri	Etanolün neden olduğu nörotoksisiteyi azaltır.
Demiyelinizasyon ilişkili beyin hasarı	Asetilkolin aktivitesinin azaltılması
Artoz ilişkili eklemler	Proteoglikan degradasyonunu engeller.
Akut akciğer yaralanması	Oksidatif stresi azaltır.
Metil-civa ilişkili sitotoksiste	Oksidatif stresi baskılar.
Kadmiyum ilişkili sitotoksiste	Oksidatif stresi azaltır.
İnflamasyon ilişkili karsinogenez	Proinflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu düzenler.
Diyabet ilişkili ateroskleroz ve nefropati	GPx1 eksikliğini etkili bir şekilde giderir
Diyabetin vasküler komplikasyonları	Serbest radikalleri temizler.
Cryptococcus neoformans ve Candida albicans enfeksiyonu gibi fırsatçı patojenler	Pma1p'nin aktivitesini engeller.
Anti-malaryal aktivite	Plazmodiumları seçici inhibe eder.
Anti astmatik aktivite	Oksidan oluşumunun ve iNOS indüksiyonunun baskılanması
Anti-trombotik aktivite	Oksidatif stresi azaltır.
Kronik demir yükü	Oksidatif stresi azaltır.
Oksidatif stresle ilişkili trombotik olaylar	Pıhtı oluşumunu ve vasküler tıkanıklığını azaltır

8.3.3. Ebselen ve Ferroptoz

Ferroptoz, son dönemde hücre ölümünün apoptotik olmayan bir türü olarak tanımlanmış ve hem akut hem de kronik hastalık süreçlerinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Anti-ferroptotik ilaçların faydalı etkileri üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmakla birlikte, bu alanda yeni ilaçların keşfi hala büyük bir bilimsel öneme sahiptir.

Ebselen, güçlü antioksidan özelliklere sahip olan, lipidde çözünebilen bir seleno-organik bileşiktir. Glutatyon peroksidaz benzeri etkiler göstererek lipid peroksidasyonunu engeller. Bu sayede, hücre zarındaki lipidlerin oksidatif hasara uğramasını önleyerek, ferroptozu inhibe edebilir(124,125)(Şekil-23). Ebselen'in etkileri yalnızca glutatyon peroksidaz (GPx) benzeri aktivitesine değil, aynı zamanda Nrf2 yolu üzerinden endojen antioksidan savunmaları artırma yeteneğine de dayanmaktadır(126). Özellikle hem enzimatik olmayan hem

de enzimatik lipid peroksidasyonunu durdurma yeteneği, ebselen'i etkili bir anti-ferroptotik ajan haline getirir.



Şekil-21: Ebselen'in ferroptoz yolağına katıldığı basamaklar (124)

Lipid peroksidasyonunun engellenmesi, ferroptozun durdurulmasını sağlar ve bu da hücre hasarını azaltabilir. Omurilik yaralanması gibi durumlarda, ferroptozun inhibisyonu, hasarın ilerlemesini önleyerek nöronlar üzerinde koruyucu bir etki yaratabilir. Ferroptoz inhibisyonu omurilik hasarının sekonder hasar evresinde nöroprotektif olarak görölmektedir(97).

8.3.4. Ebselen ve Omurilik Yaralanması

Çeşitli çalışmalar, Ebselen'in sıçanlarda travmatik beyin hasarı sonrasında nörolojik fonksiyonları doza bağlı olarak belirgin şekilde iyileştirdiğini ve travmatik beyin yaralanmalarında etkili bir tedavi sećeneđi olabileceğini göstermişt(111,127). Ayrıca, Ebselen'in omurilik hasarından sonra oluşan ikincil patokimyasal süreçler üzerinde nöroprotektif ve onarıcı etkiler sunduğu bildirilmişt(128). Bu etkiler, özellikle oksidatif stresin

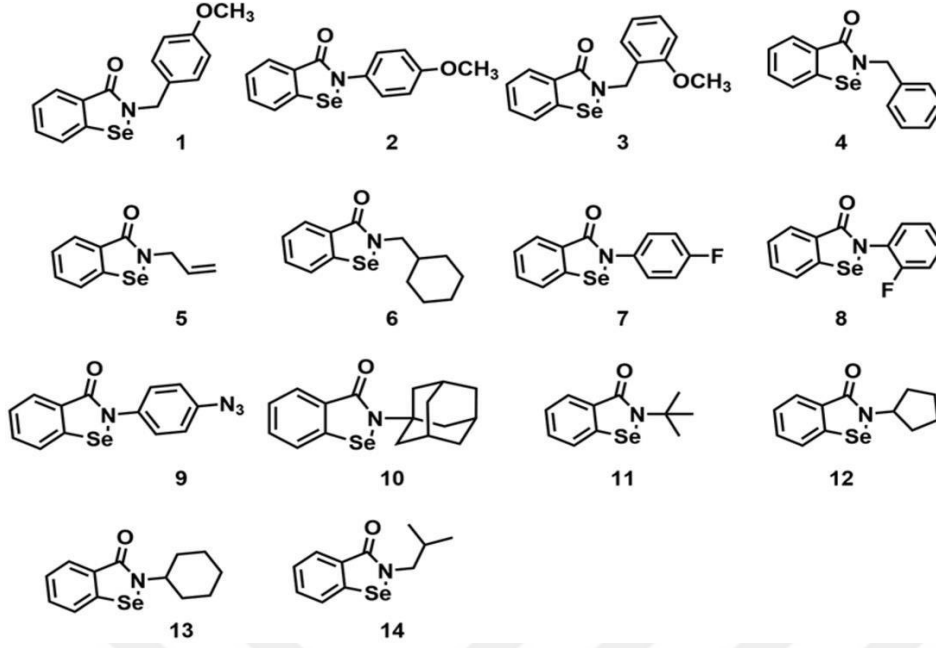
azalması, etkilenen nöronların sayısındaki düşüş ve hücrelerin morfolojik yapılarındaki düzelme şeklinde gözlemlenmiştir(127).

Ebselen, mitokondri kaynaklı oksidatif hasarı ve mitokondri aracılı nöronal apoptozu önemli ölçüde engelleyebilir. Aynı zamanda, ferroptozla bağlı hücre ölümünü durdurarak omurilik yaralanmalarında hücresel ve motor fonksiyonları iyileştirebileceği öne sürülmüştür(127). Bununla birlikte, Ebselen'in omurilik yaralanmalarında uzun vadeli etkileri henüz tam olarak değerlendirilmemiştir.

8.4. Ebselen Türevleri

Ebselen (EBS) olarak bilinen 2-Fenil-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on, selenosistein içeren enzim GPx'in aktivitesini taklit eden bir organo-selenyum bileşiğidir(111,129). Ebselen, kan-beyin bariyerini geçebilen nispeten küçük bir lipofilik moleküldür ve bu da onu serebral hastalıkların tedavisi için iyi bir aday haline getirmektedir(105). Ayrıca Ebselen'in serbest radikallerin oksidasyonunu engelleyerek hücre içi oksidasyon reaksiyonlarını azalttığı gösterilmiştir. Oksidasyonu inhibe etmesi ferroptoz içinde engelleyici rol oynadığının göstergesidir(129–131).

Ebselen'in bazı klinik çalışmalarda önemli hücresel toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir, bu da terapötik pencereyi genişleterek daha az toksik olabilecek türevleri keşfetmeyi önemli kılmaktadır(132,133).



Şekil-22: Ebselen'in ilk üretilen türevleri(116)

Ebselen'in daha önce sentezlenmiş 14 adet farklı organo-selenyum türevi mevcuttur(116)(Şekil-24). Daha da çeşitlendirmek için yedi yeni heterosiklik türevin eklenmesiyle yeni türevler oluşturuldu(116). Bu yeni heterosiklik bileşikler, Sucheck laboratuvarında geliştirilen aynı iki aşamalı süreç kullanılarak sentezlendi. İlk önce çeşitli birincil aminler kullanılarak bir dizi benzamid üretildi. Sentez daha sonra selenyum karbon bağına oluşturmak için termal olarak indüklenen bakır aracılı çapraz bağlanmayı kullanarak yeni türevleri oluşturmuş oldu(116).

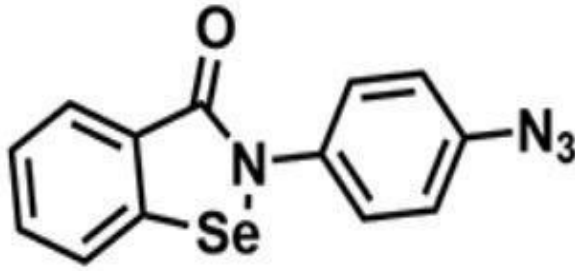
Bu üretim sonrasında 14 temel ebselen türevine toplamda 13 tane daha eklenmiş oldu. Toplamda 27 adet farklı ebselen türevi oluşturulmuş oldu(116). Landgraf ve ark(116). yaptıkları çalışmada Ebselen türevlerinin oksijen-glikoz yoksunluğu/reperfüzyon (OGD/R) iskemi modelinde artırılmış ve muhtemelen daha seçici bir nöroprotektif etki sunma kabiliyetini araştırmışlardır. Ayrıca Ebselen bileşiklerinin GPx benzeri aktivitesi ile nöroprotektif bir bileşik olarak işlev görme yetenekleri arasında bir bağlantı olup olmadığını değerlendirmişlerdir(116).

8.4.1. Ebselen 9 Molekül Yapısı ve Özellikleri

Landgraf ve ark(116). çalışmasında en iyi nöroprotektif etkileri 5,9,23 ve 27 numaralı Ebselen türevlerinde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca ilginç bir şekilde bileşik 9, bileşik 27, 23 ve 5'e (sırasıyla % 84, 80 ve 73) kıyasla hücre canlılığını önemli ölçüde artırdı. Bu gözlem, bu bileşiklerin umut verici nöroprotektif etkiler gösterdiğini göstermektedir. Ayrıca Ebselen 9 ve

27, aktive edilmiş mikroglia ortamına maruz bırakılan SH-SY5Y hücrelerinde önemli ölçüde artmış hücre canlılığı göstermiştir(116).

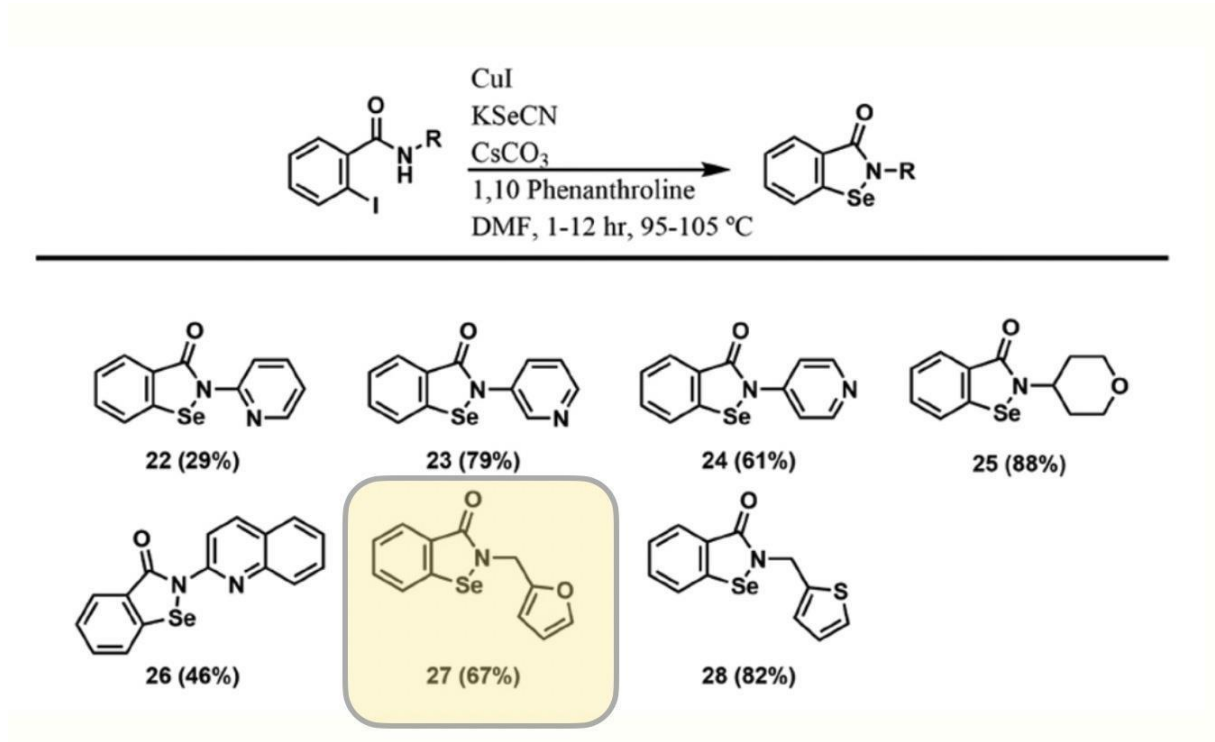
Ebselen 9 nöroprotektif etkisi klasik Ebselen ile karşılaştırıldığında daha üstün olarak görülen bir bileşiktir(116). Klasik Ebselenden farkı azid grubunun eklenmiş olmasıdır. Buradaki azido-benzoat bileşiğinin para- formunda olması ile elektron verici konuma gelmesinin toksisiteyi azalttığı düşünülmektedir(116).



Şekil-23: Ebselen 9 moleküler yapısı(116)

8.4.2 Ebselen 27 Molekül Yapısı ve Özellikleri

Ebselen 9 nöroprotektif etkisi klasik Ebselen ile karşılaştırıldığında daha üstün olarak görülen bir bileşiktir(145). Ebselen 27, Landgraf ve arkadaşlarının ürettiği yeni heterosiklik türevlerindendir. Bakır aracılı çapraz bağlanma ile üretilir.



Şekil-24: Ebselen 27'nin üretildiği reaksiyon ve molekül yapısı(116)

Ebselen 9 ve Ebselen 27, daha fazla hidrojen bağı alıcısına ve artan polar yüzey alanına sahiptir; bu da onların hücreler arası çevreyle klasik Ebselen'den daha fazla etkileşime girmesine olanak tanıyarak aktivitelerinin artmasına yol açar(116).

Ebselen 9 ve 27, nöroinflamatuvar yoldaki iki nörotransmitter olan TNF-a ve LPS kaynaklı NO salınımının önemli ölçüde inhibisyonun göstermişlerdir(116). Ayrıca bileşiklerin nöroprotektif etkisi, Keap1-Nrf2 yolağının düzenlenmesiyle ilgili olabilir(116). Bu iki bileşik Landgraf ve ark. tarafından hayvan deneylerinde kullanılmak üzere umut verici bulunmuştur(116).

9. HİPOTEZ

Çalışmamızda, Ebselen'in omurilik yaralanmasında tedavi amaçlı kullanıldığında, ferroptozu engelleyerek oksidatif stresi azaltabileceği ve böylece hücre ölümünü kontrol altına alarak hasarın ilerlemesini durdurabileceği düşünülmektedir. Bu sayede, omurilik yaralanmasına bağlı olarak gelişen sekonder hasar süreçlerinin önlenebileceği öngörülmektedir.

İkinci hipotezimizde ise, Ebselen'in yüksek dozlarda toksisiteye neden olabileceği göz önünde bulundurularak, daha önce hücre kültürü çalışmalarında başarılı bulunan 9 ve 27 numaralı Ebselen türevlerinin daha düşük toksisiteye sahip olabileceği varsayılmaktadır. Bu

türevlerin, spinal kord hasarı modelinde Ebselen'e göre daha iyi iyileşme ve fonksiyonel geri kazanım sağlayabileceği düşünülmektedir.

10. GEREÇ ve YÖNTEM

10.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Özellikler

Omurilik yaralanması araştırmalarında hayvan modelleri, özellikle de sıçanlar, çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu modeller, hasarın nasıl oluştuğunu ve iyileşme sürecini anlamak, ayrıca yeni tedavi yöntemlerini denemek için kullanılır.

Sıçanlar bu tür çalışmalarda en çok tercih edilen hayvanlardır(134). Bunun birkaç nedeni var:

1. Ucuz ve bakımı kolay olmaları
2. Anatomilerinin iyi bilinmesi
3. Enfeksiyon kapma risklerinin daha az olması
4. Fonksiyonlarını ölçmek için iyi yöntemlerin olması

Sıçan modelleri, omurilik yaralanmalarında nöronal bağlantılardaki değişikliklerin incelenmesi ve rejeneratif mekanizmaların nasıl aktive edildiğinin anlaşılmasında önemli bir rol oynar(135). Ayrıca, yaralanma bölgesinde kistik boşluklar gelişmesi gibi insan patolojisine benzer özellikler göstermesi, bu modellerin kullanımını daha da değerli kılar(135). Sıçanlar, düşük maliyetli olmaları, bakım kolaylığı, iyi bilinen anatomik yapıları ve fonksiyonel analizlerin kolay uygulanabilir olması gibi avantajlara sahiptir.

Bu nedenle, çalışmamızda omurilik hasar modeli oluşturulurken Sprague-Dawley sıçanlar kullanılacaktır.



Resim-3: Anestezi altında bir Sprague-Dawley Sıçan

Çalışma 3 zamanlı deney grupları üzerinden toplamda 15 grup ve 99 hayvan olacak şekilde kurgulanmıştır. Araştırma kapsamında oluşturulması planlanan gruplar aşağıda sunulmuştur;

1. Kontrol /Sham Grubu 24 saat (n=5, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
2. Kontrol /Sham Grubu 72 saat (n=5, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
3. Kontrol /Sham Grubu 6 hafta (n=5, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
4. Spinal Kord Hasarı (SCI) Grubu 24 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
5. Spinal Kord Hasarı (SCI) Grubu 72 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
6. Spinal Kord Hasarı (SCI) Grubu 6 hafta (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
7. SCI + Ebselen Grubu 24 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
8. SCI + Ebselen Grubu 72 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
9. SCI + Ebselen Grubu 6 hafta (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
10. SCI + Ebselen 9 Grubu 24 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)

11. SCI + Ebselen 9 Grubu 72 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
12. SCI + Ebselen 9 Grubu 6 hafta (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
13. SCI+ Ebselen 27 Grubu 24 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
14. SCI+ Ebselen 27 Grubu 72 saat (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)
15. SCI+ Ebselen 27 Grubu 6 hafta (n=7, yetişkin Sprague Dawley erkek/dişi sıçan)

Çalışmada gerekli minimum hayvan sayısını belirlemek üzere güç analizi ve örneklem büyüklüğü hesaplamaları yapılmıştır. Geçmiş çalışmalarda elde edilen verilere dayanarak 24. saatin sonunda SCI grubu için öngörülen demir seviyesi ortalaması 30 $\mu\text{mol/g}$ ve standart sapma 4; SCI+ Ebselen grubu için öngörülen demir seviyesi ortalaması 24 ve standart sapma 4; tip1 hata α : 0.05, tip2 hata β : 0.020 olduğunda her bir grupta en az 7 deney hayvanı olmak üzere toplamda 99 adet Sprague-Dawley sıçan gerektiği güç analiziyle hesaplanmıştır, ancak yapılacak işlemin mortalitesinin yüksek olması dolayısıyla deney sonunda istatistiksel analize elverişli veri kalabilmesi için öngörülen mortalite oranı doğrultusunda gruplar yedişer hayvan olarak tasarlanmıştır(136). Literatürdeki benzer çalışmaların benzer sayıda hayvanla yapıldığı görülmektedir. Yapılan power analizlerde de gerekli hayvan sayısı grup başına 7 hayvan olarak saptanmıştır.

Deney modeli tasarlanırken, hayvanlarda üst ekstremité felcine neden olabilecek üst torakal ve servikal bölgelerdeki hasar modelleri hariç tutulmuştur, çünkü bu seviyelerde yapılan hasarlar hayvanlarda yüksek ölüm oranlarına yol açabilmektedir(137). Bu nedenle, deneyde T8 seviyesinde hasar verilmesi kararlaştırılmıştır; bu seviyede yapılan hasar, yalnızca alt ekstremité motor fonksiyonlarını etkileyerek felç oluşturur. Bu yaklaşım, motor fonksiyon kaybını değerlendirmeyi kolaylaştırır ve çalışmamızın klinik uygulamalar için daha uygun veriler sunmasını sağlar.

Deney sırasında çevresel faktörlerin etkisini azaltmak için, omurilik hasarı ve tedavi uygulamaları Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapılacaktır. Hayvanların bakımı ve ihtiyaçları, deneyin gerektirdiği minimum müdahaleler doğrultusunda, bu tür çalışmalarda tecrübe sahibi olan ekibimiz tarafından sağlanacaktır. Hayvanların bakımında, yaraların tedavisi ve spontan idrar çıkışı olmayan sıçanlara günde iki kez mesane masajı yapılacaktır.

10.2. Omurilik Hasarı Oluşturma Yöntemi

İdeal bir hayvan modeli, insanlardaki omurilik hasarını gerçeğe en yakın şekilde yansıtmalı ve uygulanması kolay olmalıdır. Sıçanlar, uygun maliyetli olmaları ve bu alanda yaygın olarak kullanılan hasar modellerine sahip olmaları nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıkça tercih edilen bir modeldir.

Sıçanlarda omurilik hasarı modelleri genellikle üç ana kategoriye ayrılır: kontüzyon, kompresyon ve transeksiyon modelleri. **Kontüzyon modelleri**, kısa süreli ve geçici bir travma ile hasar oluşturur ve bunun için ağırlık düşürme veya pnömatik ya da elektromanyetik impaktörler kullanılır. **Kompresyon modelleri**, daha uzun süreli basınç uygulamasıyla meydana gelen hasarları içerir ve ayarlı forseps ya da klips ile gerçekleştirilir. **Transeksiyon modellerinde** ise omurilik, tek veya çift taraflı kesilerek yaralanma yaratılır.



Resim-4: Klip-Kompresyon yönteminde kullanılan klipler ve anestezi altında laminektomi sonrasında omuriliği klip kompresyon yöntemi ile hasar verilmesi

Klip-kompresyon yöntemi; damar klipleri sayesinde, kullanılan klipin gücüne göre 35-50 gram bir kuvvet uygulayarak akut hasar yaratılan bir yöntemdir. En sık kullanılan ve tekrar edilebilirliği en iyi olan yöntemdir. Klip-kompresyon modeli insandaki omurilik yaralanmalarının mekanizmasını yansıtmaları açısından ve bu doğrultuda deneysel

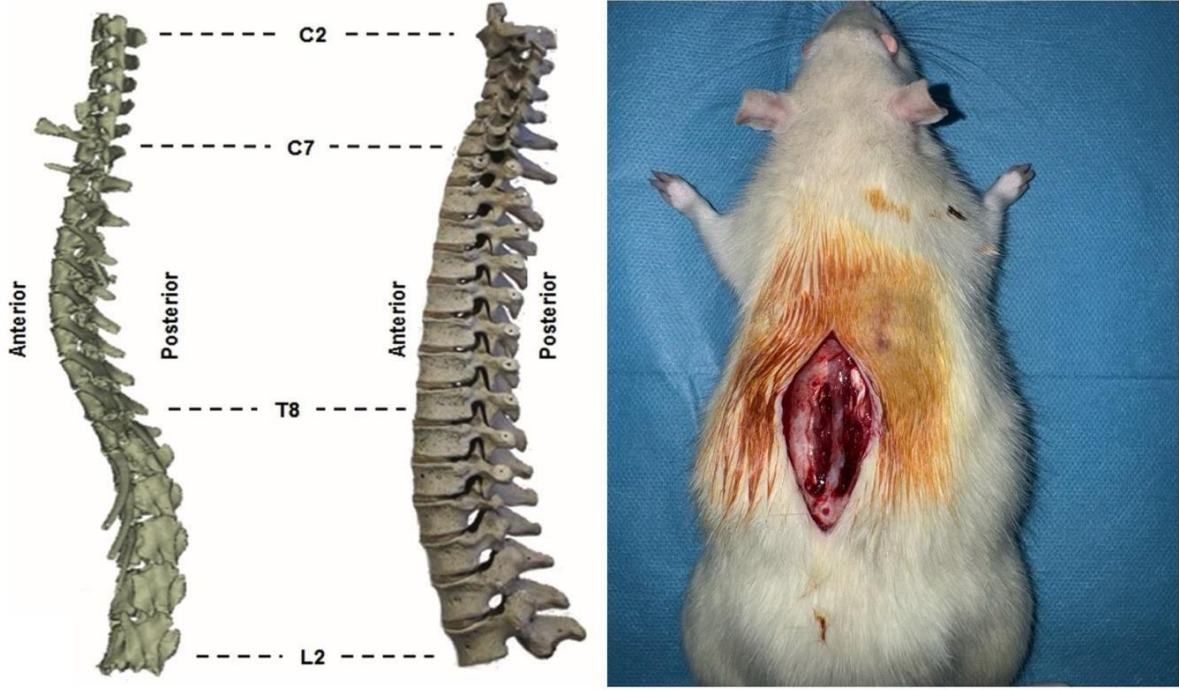
çalışmadan elde edilecek verilerin kliniğe aktarılabilirliği açısından geçerli bir model konumundadır(138).

10.3. Cerrahi Yöntem

Çalışmamızda kullanılan cerrahi araçlar şunlardır: No. 11 bistüri, mikro küret, otomatik künt cilt retraktörü, mikro-Adson forsepsi, düz ve kavisli uçlu mikro rongeur, Adson forsepsi, doku örnekleme için Woodson elevatörü, mikro makas ve anevrizma klipsi.

Sıçanlara anestezi uygulaması olarak ketamin-ksilazin kombinasyonu tercih edilmiştir. Ketamin (40–90 mg/kg) ve ksilazin (5–10 mg/kg) protokolü, operasyon süresi boyunca 45-90 dakika arası yeterli anestezi süresi sağlamaktadır. Hayvan seçimi cinsiyet bağımsız olarak yapılmış, 240-420 gram ağırlığındaki 8-12 haftalık erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçanlar kullanılmıştır. Anestezi sonrası cerrahi alan tıraşlanmış ve hayvanlar operasyon masasına sabitlenmiştir.

Hayvan uygun pozisyonda sabitlendikten sonra, omurilik hasarının verileceği seviye belirlendi. Alt ekstremitelerde fonksiyonel iyileşmenin gözlenmesine imkân tanınması ve parapleji oluşturması amacıyla çalışmamızda T8-T10 seviyesini tercih ettik. Hasar oluşturulacak seviyeyi belirlemek için T13 omurunun çıkıntısını anatomik bir referans noktası olarak kullanılmıştır. Cilt insizyonu bu çıkıntıdan başlayarak kraniale doğru yaklaşık 3 cm uzunluğunda yapıldı ve bu insizyonun orta noktası T8-T10 seviyesine denk gelmektedir. Sonrasında, paraspinal kaslar dikkatlice omurganın posterior kemik elemanlarından ayrıldı.

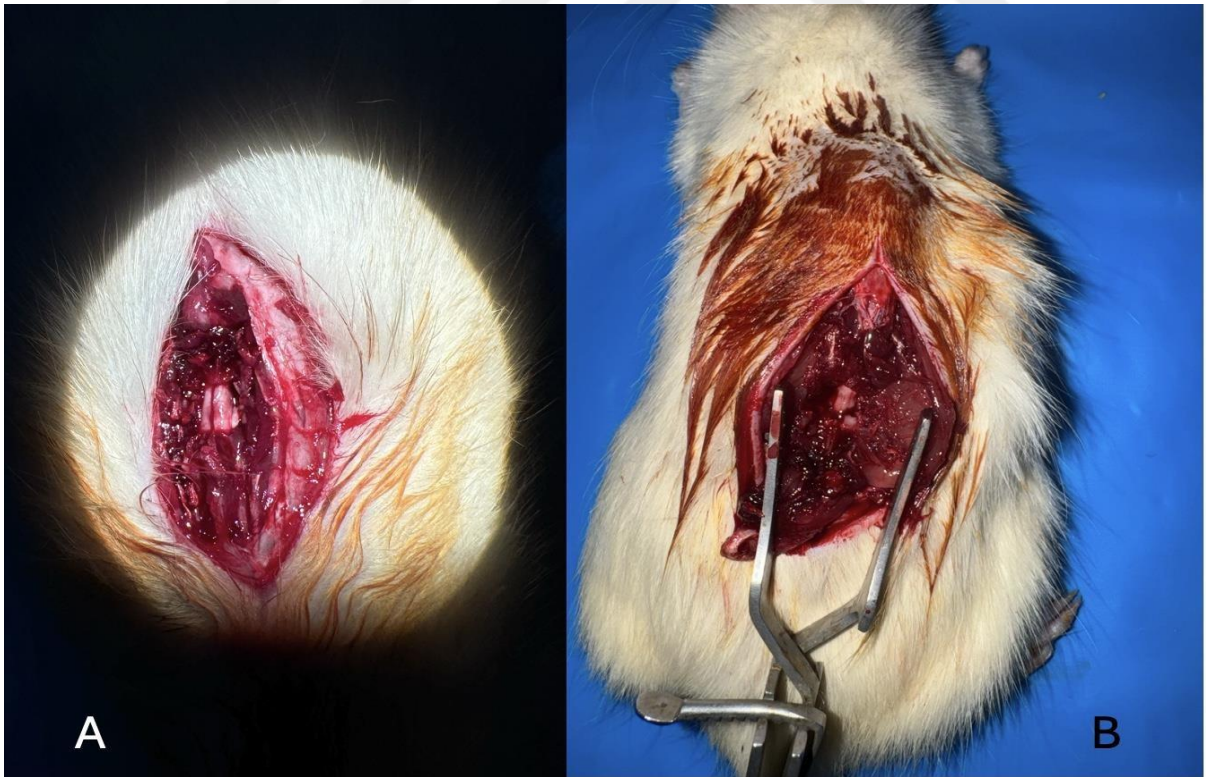


Resim-5: Sıçan anatomik yapısı(139) ve anestezi altında posterior elemanları ayrılmış cerrahi alan

Paraspinal kasların posterior elemanlardan ayrılması aşamasında öncelikle spinöz çıkıntılar belirlendi ve bu çizgi referans olarak kullanıldı. Daha sonra 11 numaralı bisturi yardımıyla spinöz uzantıların her iki tarafında keskin bir ilk hareket ile kasların sıyrılmasına başlandı. Bu ilk keskin sıyrma işleminden sonra mikroküret yardımı ile sıyrılma künt olarak tamamlandı. Paraspinal kaslarda yeterli sıyrma işlemi sağlandıktan sonra, bu katmana künt bir deri retraktörü yerleştirilerek devam edildi. Ardından uygun seviyedeki spinöz süreçlerin çıkarılması ile devam edildi. Üst ve alt vertebraların eklemleşen faset eklemlerinin arasından laminektomiye başlandı (Resim-4). Yeterli laminektomi elde edildikten sonra, seviye kontrolü yapılarak klip, spinal kordu çepeçevre saracak şekilde yerleştirildi (Resim-4). Klipin yerin konfirme edildikten sonra süre başlatılarak 60 saniyenin sonunda klip çıkarıldı. Hasarın olduğu klip uygulanan alanda ekimoz oluşmasının gözlemlenmesi ile kontrol edildi(140).



Resim-6: Cerrahi aşamaları: A: Paraspinal kasların ayrılması sonrasında spinöz proseslerin ortaya konması B: Laminektomi aşaması C: Hemo-klip yerleştirilmesi



Resim-7: Klip-kompresyon yöntemi sonrasında omurilikte oluşan hematoma mikroskopa altında(A) ve klinik görünümü(B)

10.4. Ebselen ve Türevlerinin Hazırlanması ve Uygulanması

Ebselen ticari formda hazır preparat olarak temin edildi. Ebselen 9 ve 27 temini Dr. Suheck ve ekibi tarafından üretildi ve tarafımıza gönderildi (Şekil-27).

Standard Material Transfer Agreement For the Transfer of Biological Materials Between Non-profit Organizations

The Provider and Recipient identified below hereby agree to be bound by the terms set forth in the attached Exhibit A, and Exhibit B if applicable, to govern the transfer of the Original Material described herein. Each party represents that it has made no changes to the attached Exhibit A or Exhibit B as published by the Association of University Technology Managers and available on their website, except as modified by the checked boxes in Exhibit B.

☒ If checked, this Agreement is also subject to additional terms and conditions set forth on the attached Exhibit B. In the event of a conflict between any specific terms or conditions in Exhibit A and Exhibit B, Exhibit B shall govern.

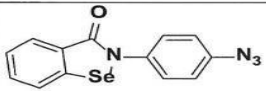
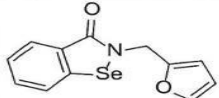
Provider (the organization providing the Original Material)	Recipient (the organization receiving the Original Material)
Name: University of Toledo Address: 2801 W. Bancroft Street Toledo, OH 43606	Name: Ege University Address: Kozım Dink, Barınca, İzmir 35100

Provider Scientist	Recipient Scientist
Name: Steven Suheck, Ph.D. Title: Professor	Name: Bunyamin Kilicli Title: Research Asistant

Original Material (description of the material being transferred)	Shipping Address
Per Attachment A	Name: Bunyamin Kilicli Address: Kozım Dink, Barınca, İzmir, 35100 ortopedi ve travmatoloji servisi 1.kat Sekreterlik

Provider Authorized Signatory	Recipient Authorized Signatory
Signature Frank J. Calzonetti, Ph.D. Print Name Vice President for Research Title Date	Signature: Doç.Dr. A. Murat ÖZTÜRK E.Ü.T.E. Ort ve Trav. A.B.D Dip. Tes. No: 104799 Print Name: Anıl Murat Öztürk Title: Asisstant Professor Date: 18.06.2021

Attachment A (Ege University)

Lot Number	Structure	Name/Formula/Exact Mass	Amount (mg)
TSN-02-190		2-(4-azidophenyl)benzo[d][1,2]selenazol-3(2H)-one Chemical Formula: C ₁₃ H ₈ N ₄ OSe Exact Mass: 315.9863	100
ADL-01-24		2-(furan-2-ylmethyl)benzo[d][1,2]selenazol-3(2H)-one Chemical Formula: C ₁₂ H ₉ NO ₂ Se Molecular Weight: 278.17	100

Şekil-25: Suheck/Langraf ve ark. tarafından üretilen ve tarafımıza uygun şartlarda gönderilen Ebselen 9 ve 27'nin transfer formu ve bileşik yapıları

Ebselen molekülü sıçanlarda uygulanması ile ilgili; uygulanacak olan Ebselen ticari formda hazır preparat olarak temin edildi. Ebselen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) öncelikle %0.01 oranında dimetil-sülfoksit (DMSO) ile çözündürülmüştür. Ardından %0,9 NaCl çözeltisinde çözünmüş halde hayvan başına 10 mg/kg olacak şekilde, omurilik hasarıyla eş zamanlı sıçanlara intraperitoneal yolla verildi. Çalışmamızda temel amaç moleküllerin ferroptoz ve sekonder hasara etkilerini göstermek olduğundan, daha önceki çalışmalarda kullanılmış etkili ve güvenli doz aralığı gösterilmiş dozu seçilmiştir(127,141,142). 24. Saatte sakrifiye edilen gruplarda toplam tek doz uygulanırken, 72. saat ve 6. hafta takip edilen gruplara hasar anında verilen Ebselen'e ek olarak 24. Saatin sonunda bir doz daha Ebselen yapılmıştır. Tüm sakrifiye edilen gruplara benzer şekilde 0. ve 24. saat olmak üzere toplam 2 doz Ebselen uygulaması yapıldı.

Ebselen türevleri (Ebselen 9 ve Ebselen 27), klasik ebselen ile aynı şekilde hazırlandı. Her iki molekülde hayvanlara klasik Ebselen ile aynı dozda 10 mg/kg olacak şekilde uygulandı. Omurilik hasarı ile eş zamanlı bir doz uygulandı. 24. saatte sakrifiye edilen hayvanlara tek doz, uygulama yapılırken 72. saatte ve 6. haftada sakrifiye edilen hayvanlara 24. saatin sonunda ek bir doz daha Ebselen 9 ya da Ebselen 27 uygulaması yapıldı.

10.5. Sıçanların Cerrahi Sonrasında Bakım ve Takibi

Operasyon sonrası yara yerleri usulüne uygun şekilde kapatıldıktan sonra povidon-iyodin ile dezenfekte edildi. Yara yerlerine pansuman yapılmasına gerek görülmedi. Postoperatif dönemde, subkutan hidrasyon sağlandıktan sonra her hayvan ayrı kafeslerde bası yaralarını önlemek amacıyla bol talaş bulunan alanlara konularak oda sıcaklığında gözlem altına alındı. Yem bölmesinden pellet tüketiminin zor olabileceği öngörülerek, yemler doğrudan kafesin içine yerleştirildi.

Postoperatif dönemde kısa takip süreli hayvanlarda mortalite beklenen düzeyde olsa da uzun takip süreli hayvanlarda planlanan sakrifikasyon zamanından önce ölümlerin erken süreçlerde olduğunu gözlemledik. Genellikle birinci hafta içinde ölen hayvanlarda n büyük nedeninin ameliyat sırasında oluşan kanama olduğunu düşündük. Ayrıca, ilk postoperatif günde hayvanların ağız yoluyla beslenmeye başlamaması da mortalite açısından önemli bir göstergedydi(140).

Hayvanların takibinde, paraplejiye ek olarak idrar ve sindirim sistemlerinde de omurilik hasarına bağlı fonksiyon kaybı oluşabileceği beklentisiyle, her gün günde iki kere (sabah ve akşam) mesane masajı yapıldı. Bu işlem, mesanede biriken idrarın dışarı çıkmasını sağlamak için basınç uygulanarak gerçekleştirildi. Bazı hayvanlarda mesane kontrolü zamanla geri kazanıldı ve bu durumda, idrarın böbreklere geri kaçmasını önlemek amacıyla mesane masajı durduruldu. Ayrıca 6 hafta takip edilen sıçanlarda bası yarası oluşmasını engellemek amacıyla hayvanlara pozisyon değişikliği ve haftada iki kere kafes temizliği uygulandı.

Ameliyat sonrası ağrı yönetimi için, 24. ve 72. saatlerde sakrifiye edilecek hayvanlara günde bir kez kas içi enjeksiyon şeklinde analjezi verildi. 6 hafta takip edilecek hayvanlarda ise ağrı kontrolü ilk yedi gün boyunca sürdürüldü.

10.6. Sıçanların Sakrifiye Edilmesi ve Örnek Alımı

Hayvanlar sakrifikasyon için hazırlandığında, ketamin-ksilazin anestezisi uygulandı. Daha önceki operasyon bölgesinden tekrar girilerek laminektomi yapılan bölgede hasar verilen omuriliğe ulaşıldı. Laminektomi sahası kranial ve kaudale genişletilerek bu bölgeden yaklaşık 1 cm'lik bir parça uygun şekilde çıkarıldı. Ardından hayvanlar supin yatırılarak kalpten 2 cc kadar kan alındı. Son olarak, servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifikasyon işlemi tamamlandı.

10.7. Fonksiyonel Değerlendirme ve Lokomotor Aktivite Ölçümü

Omurilik yaralanmasından sonra fonksiyonel iyileşmeyi değerlendirmek için güvenilir ve geçerliliği kanıtlanmış bir yöntem kullanmak önemlidir. Bu tür değerlendirmeler, genellikle açık alanda yapılan lokomotor testlerle gerçekleştirilir. 1954 yılında Tarlov ve Klinger tarafından geliştirilen ilk değerlendirme yöntemi, zaman içinde çeşitli değişikliklere uğramıştır. Günümüzde en yaygın kullanılan yöntem ise 1995 yılında Basso, Beattie ve Bresnahan tarafından geliştirilen ve onların isimlerinin baş harfleriyle anılan BBB Lokomotor Skalası'dır(143). Bu skala, farklı gözlemciler arasında da yüksek uyum sağlamasıyla dikkat çeker.

Çalışmamızda, omurilik yaralanması sonrasında oluşan davranışsal değişiklikleri değerlendirmek amacıyla BBB davranış testi uygulanmıştır (Tablo-9).

Tablo-9: BBB skor tablosu

1.İyileşmenin Erken Evreleri(Arka ekstremitte hareketleri)	
0	Arka ekstremitte gözle görünür bir hareket olmaması

1	Tek eklemde belli belirsiz hareket olması (özellikle diz/kalça)
2	Tek bir eklemde belirgin hareket olması ve ikinci bir eklemdeki belli belirsiz bir hareket görülmesi
3	İki farklı eklemde belirgin hareketinin görülmesi
4	Ayak bileği, diz ve kalça eklemine her birinde belli belirsiz bir hareket olması
5	Üç eklemde herhangi ikisinde belli belirsiz bir hareket varken üçüncü eklemde belirgin hareket olması (ayak bileği, diz, kalça)
6	Üç eklemde ikisinde belirgin hareket varken üçüncü eklemde belli belirsiz hareket olması (ayak bileği, diz, kalça)
7	Her üç eklemde belirgin hareket olması
2. İyileşmenin Orta Evreleri (Adımlamada Koordinasyon)	
8	Ağırlığını taşımadan sürünmesi veya yere bastığı ayağına yük vermemesi/ pençenin plantar yerleşmesi
9	Ayağını sadece duruş fazında yük verecek şekilde plantar pozisyonda basması veya plantar basmadan ayağını dorsal pozisyonda ara sıra/sık sık/ sürekli bir şekilde adımlaması
10	Ön arka ekstremiteler koordinasyonu olmadan aralıklı olarak ağırlık vererek plantar pozisyonda adım atması
11	Sık sık veya sürekli olarak alt üst ekstremiteler koordinasyonu olmaksızın ağırlık vererek plantar adımlar atması
12	Ara sıra alt-üst ekstremiteler koordinasyonu yakalayacak şekilde sık sık veya sürekli şekilde ağırlık vererek plantar adımlar atması
13	Alt-üst ekstremiteler koordinasyonu sık sık yakalayacak şekilde devamlı olarak ağırlık vererek plantar adımlar atması
3. İyileşmenin Geç Evreleri (İnce Hareketler)	
14	Sürekli alt-üst ekstremiteler koordinasyonu, sürekli ağırlık vererek plantar adımlar atması, adım atarken genel olarak rotasyon postüründe olması VEYA ara sıra dorsal adımlama ile alt üst ekstremiteler koordinasyonunun sürekli olması
15	Sürekli alt-üst ekstremiteler koordinasyonu, buna eşlik eden adımlama esnasında ayağın yerden kalkmaması veya öne hareket sırasında ayağın bazen yerden kalkması, genel olarak ekstremiteler gövdeye paraleldir.

16	Sürekli alt-üst ekstremite koordinasyonu, buna eşlik eden adımlama esnasında ayağın yerden sık sık kalkması, ekstremitenin pozisyonu ilk kontakt esnasında paralel ve yerden kalktığı aşamada ise rotasyondadır
17	Sürekli alt-üst ekstremite koordinasyonu, buna eşlik eden adımlama esnasında ayağın yerden sık sık kalkması, ekstremitenin pozisyonu ilk kontakt esnasında ve yerden kalktığı aşamada paraleldir
18	Sürekli alt-üst ekstremite koordinasyonu, buna eşlik eden adımlama esnasında ayağın yerden sürekli kalkması, ekstremitenin pozisyonu ilk kontakt esnasında paralel ve yerden kalktığı aşamada ise rotasyondadır
19	Sürekli alt-üst ekstremite koordinasyonu, buna eşlik eden adımlama esnasında ayağın yerden sürekli kalkması, ekstremitenin pozisyonu ilk kontakt esnasında ve yerden kalktığı aşamada paraleldir. Kuyruk yerdedir.
20	Sürekli koordine bir yürüyüş, sürekli ayağın yerden kalkması, sürekli koordine yürüyüş, sürekli ayağın yerden kalkması ekstremita hem basışta hem yerden kalktığı esnada paraleldir. Gövde instabilitesi vardır. Kuyruk yukardadır.
21	Koordine yürüyüş, sürekli ayağın yerden kalkması, ekstremitenin baskın pozisyonu basış fazı boyunca paralel şekildedir, gövde stabilitesi vardır, kuyruk hep yukarıdadır.

Çalışmamızda grupları üç farklı zaman diliminde değerlendirildi. 24 saatlik ve 72 saatlik takip yapılan gruplarda biyokimyasal veriler elde edildi. Bu gruplar "akut" ve "subakut" olarak adlandırıldı ve bu kısa sürelerde fonksiyonel bir iyileşme beklenmedi. Fonksiyonel gelişim değerlendirmesi 6 hafta süren takiplerde yapıldı. 6 haftalık çalışma gruplarında, her haftanın sonunda BBB skorları kaydedildi.

10.8. Biyokimyasal Değerlendirme

Ferroptoz, demir birikimi ve lipid peroksidasyonu gibi süreçlerle ilerleyen, demir bağımlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu süreçte lipid, GSH ve demir metabolizmasında etkilenmeler meydana gelir.

Ferroptozun değerlendirilmesi için demir seviyeleri, lipid peroksidasyon göstergeleri (4-HNE ve MDA), GPX4 ve GSH aktiviteleri gibi biyokimyasal parametreler ölçülür. Ayrıca, ferroptozla ilişkili FPN, TfR1 ve ACSL4 düzeylerinin ölçülmesi de değerlendirme yöntemleri arasında yer alır.

10.8.1. Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemleri

10.8.1.1. Lipit Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, lipit hidroperoksitleri, malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) gibi reaktif ürünlerin oluşumuna yol açan serbest radikal aracılı lipit oksidasyonudur(144). MDA ve 4-HNE hücrelerde sinyal molekülleri olarak veya makromoleküller ile reaksiyona girerek sitotoksik etki gösterebilirler. Bu ürünler proteinler ve DNA ile reaksiyona girerek stabil ürünler oluşturabilir, bu da çeşitli patolojik süreçlerde özellikle ferroptoz gibi yollara katkıda bulunur. Ferroptoz mekanizmalarında önemli olan değişkenin artmış lipoksigenaz aktivitesi ile fosfolipidlerin yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu olduğu gösterilmiştir(145).

MDA(Malondialdehit asit) ölçümü: MDA, 4-HNE ve 15(S)-8-iso-PGF2a gibi lipid peroksidasyon ürünlerinin analizi, oksidatif stresin biyomarkerları olarak önem taşır. MDA analizi için yaygın olarak kullanılan tiyobarbitürik asit (TBA) testi pratik ve yaygın bir yöntemdir, ancak düşük spesifitesi nedeniyle sınırlamaları vardır. Bu nedenle, HPLC, GC-MS ve LC-MS/MS gibi florometrik yöntemler, daha yüksek spesifite ve hassasiyet sağladıkları için tercih edilmektedir. Bu teknikler, lipid peroksidasyon ürünlerinin daha doğru ölçülmesini mümkün kılar(146).

Çalışmamızda deney gruplarında lipid peroksidasyonu tespit etmek için MDA düzeyi kit kullanılarak 553 nm’de florometrik olarak ölçülmüştür.

4-HNE ölçümü: MDA, 4-HNE lipit peroksidasyonunun en sık ölçülen biyobelirteçleridir. Birçok hastalıkta sağlıklı kişilere göre daha yüksek düzeyleri ölçülür.

4-HNE düzeyi Western Blot yöntemiyle tayin edilmiştir.

GPX4 düzeylerinin ölçümü: Ferroptoz, glutatyon peroksidaz 4 (GPx4) eksikliği nedeniyle hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda ortaya çıkan düzenlenmiş bir hücre ölümü mekanizmasıdır. Bu süreçte, lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitler (LOOH) GPx4 enzimi tarafından indirgenir. Bu indirgeme reaksiyonu, GPx4'ün glutatyon (GSH) kullanarak LOOH'ları daha zararsız bileşiklere dönüştürmesi ile gerçekleşir(147). GPx4 veya GSH seviyelerindeki yetersizlik, lipid peroksidasyonunun kontrolsüz hale gelmesine ve sonuç olarak ferroptotik hücre ölümüne yol açar. Bu yüzden GPX4 seviyesi, ferroptozun bir göstergesi olarak kullanılır; düşük seviyelerde olması, artan ferroptotik aktiviteye işaret eder.

Çalışma gruplarına ait dokularda GPX4 protein analizi Western Blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

ACSL4 düzeylerinin ölçümü: ACSL4 enzimi CoA'yı spesifik çoklu doymamış yağ asitlerine, özellikle araşidonik asit (AA) ve adrenik asite bağlar. Bu sayede ACSL4, ferroptoz ve yağ asidi metabolizmasında merkezi rol oynar. ACSL4, AA ve adrenik asidin CoA ile bağlanmasını katalizleyerek hücre membranlarında bu yağ asitlerinin esterleşmesine ve fosfolipid peroksidasyonuna yol açar(148). Bu da ferroptotik hücre ölümünü tetikler. ACSL4 ferroptoz için gereklidir ve GPX4 ile ferroptotik süreçleri düzenler. Bu nedenle ACSL4 geni ferroptoz için biyobelirteç olarak kullanılır.

ACSL4 düzeyleri çalışmamızda Western Blot yöntemiyle tayin edilmiştir.

GSH düzeylerinin ölçümü: GSH, GPx4 enziminin substratıdır ve ferroptoz önlenmesi için oldukça önemlidir. GSH sentezinin ilk basamağını düzenleyen gamma-glutamilsistein sentetaz (GCL) enziminin susturulması, GSH eksikliğine ve lipid peroksidasyonu (LPO)'na bağlı hücre ölümüne yol açar. Ayrıca sistin/glutamat antiporter sistemi (sistem Xc-), GSH sentezi için gerekli sisteini sağlar. GSH'ın ferroptoz önlenmesindeki rolü net bir şekilde ortaya konmuştur(147).

Çalışmamızda dokulardaki GSH seviyesi GSH Assay kit kullanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

10.8.1.2. Demir Metabolizmasının Değerlendirilmesi

Erastin, ferroptozu tetikleyen ve demire bağımlı hücre ölümünü başlatan bir bileşiktir. Hücre içindeki demir seviyelerinin artması, Erastin'in etkisiyle hücre ölümünü daha da artırırken, demir şelatörü olan deferoksamin (DFO) bu süreci durdurabilir. Bu da ferroptozun demire bağlı bir süreç olduğunu gösterir. Ayrıca, demirin, hücre içinde ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini artırarak ferroptozla katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Anormal derecede yüksek demir seviyelerine sahip patolojik nöronlar, sistein eksikliği durumunda ferroptozla daha yatkın hale gelebilir(63). Yani demir, ferroptoz için gerekli bir bileşen olsa da tek başına yeterli değildir.

Çalışmamızda, demir metabolizmasının ferroptozla olan ilişkisini anlamak amacıyla deney gruplarında demir seviyeleri ve bu seviyelerin kontrolünde rol oynayan bazı proteinlerin düzeyleri değerlendirildi. Bu kapsamda demir seviyesi, TfR1 ve ferroportin düzeyleri ölçüldü.

Demir düzeylerinin ölçümü: Demir, hücrelerde ferröz (Fe^{2+}) ve ferrik (Fe^{3+}) iyonik formlarında bulunabilen temel bir kofaktördür. Fe^{3+} çözülebilir form değildir ve besinlerden alınır. Transferrin(Tf) ve Tf reseptörleri Fe^{3+} 'nin hücrelere taşınmasını sağlar. Transferrin reseptörleri (TfR1 ve TfR2) aracılığıyla Fe^{3+} yüklü transferrin hücre içine alınır. Fe^{3+} , endozomda STEAP3 enzimi tarafından Fe^{2+} 'ye indirgenir. Fe^{2+} emilebilir demir formudur. DMT1 proteini Fe^{2+} 'yi endozomdan sitoplazmadaki labil demir havuzuna taşır. Hücrede "labil demir havuzu" olarak bilinen serbest demir, oldukça reaktif olup hidrojen peroksitle Fenton reaksiyonuna girerek reaktif oksijen türleri oluşturur. Fenton reaksiyonu, demir iyonlarının Fe^{2+} ve Fe^{3+} formları arasında dönüşmesini içerir ve bu süreçte hidrojen peroksit veya lipid hidroperoksitler kullanılarak hidroksil ve peroksil radikalleri oluşturulur. Farklı yollarda kullanılan demirin hücre içinde bu reaksiyonlara katılımı ferroptozu tetiklemektedir(149).

Dokulardaki demir düzeyi "Iron Assay Kit" kullanılarak kolorimetrik olarak 593 nm'de ölçüldü.

Transferrin reseptör-1 (TfR-1) düzeyinin ölçümü: TfR-1 ve TfR-2 hücreye demir iyonunun alımında görevli reseptörlerdir. Yapılan uygulamaların hücre içi demir içeriğine olan etkisini değerlendirmek amacıyla TfR-1 düzeyleri ölçülmektedir. TfR-1 düzeyinde artış hücre içi demir seviyelerinin yükselmesine ve ferroptozu tetiklediği düşünülmektedir.

Çalışmamızda ferroptotik ölümü doğrulamak amacıyla TfR1 protein analizi Western Blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Ferroportin(FPN) düzeylerinin ölçülmesi: Ferroportin, tek bilinen memeli demir dışı aktarıcısıdır. Hücre içi demir seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. FPN eksikliği hücre içinde demir birikimine neden olarak ferroptozu artırır. Deney gruplarında ferroportin düzeylerinin değerlendirilmesi, spinal kord hasarı kaynaklı demir metabolizması değişiminin gösterilmesi ve ferroptozun doğrulanması açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle deney gruplarına ait dokularda FPN protein analizi Western Blot yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Western Blot Çalışmaları

Çalışmamızda deney hayvanlarından alınan dokular üzerinde yapılan analizlerde Western Blot yöntemi kullanıldı. İlk adımda, her grup kendi içinde birleştirilerek dokular homojen hale getirildi. Bu homojenize dokularda protein miktarı belirlendi ve ardından proteinler SDS-PAGE(Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamit jel elektroforezi) yöntemi ile

ayrıştırıldı. Son olarak, elde edilen örneklerde ticari antikorlar kullanılarak protein analizleri gerçekleştirildi.

Doku Homojenizasyonu ve Protein Miktar Tayini

Alınan omurilik dokuları gruplara ayrıldıktan sonra, proteaz inhibitörü içeren bir tampon kullanılarak parçalandı. Sonrasında +4 derece sıcaklıkta, 5000 devirde 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan üst kısım, doku protein miktarının belirlenmesinde kullanıldı.

Doku protein miktarını belirlemek için toplam protein ölçümü BCA (bikinkoninik asit) kiti ile yapıldı. Ölçüm, 562 nm dalga boyundaki bir mikrolaka okuyucu kullanılarak gerçekleştirildi. Referans olarak sığır serum albümin konsantrasyonları alındı, bu değerlerle karşılaştırmalı olarak absorbans ölçümleri yapıldı ve çizilen standart eğri grafiği kullanılarak numunelerdeki protein miktarı belirlendi.

SDS-PAGE Elektroforezi

SDS-PAGE elektroforezi için, proteinlerin ayrışması amacıyla %10'luk ayırıcı ve %4'lük sabitleyici jel kullanıldı. Örnekler, 20 µg'lık miktarlarda yükleme tamponuna konularak 100°C'de beş dakika süreyle ısıtıldı. Isıtmanın ardından, örnekler elektroforez kuyucuklarına yerleştirildi ve önce %4'lük sabitleyici jelin geçilmesi için 40 volt, ardından %10'luk ayırıcı jelin geçilmesi için 150 volt uygulanarak yürütme işlemi tamamlandı.

10.8.2. Biyokimyasal Verilerin Değerlendirilme Zamanı

Biyokimyasal analiz amacıyla, 24 saat, 72 saat ve 6 haftalık gruplardan omurilik örnekleri toplandı. Bu süreç, hayvan deneylerinin farklı gruplar halinde sürdüğü 10 ay boyunca devam etti. Alınan örnekler, numaralandırılarak 2 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi ve kuru buz dolu taşıma kaplarına alındı. Daha sonra dokular, Ege Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda -80°C'de saklanmak üzere donduruldu. Biyokimyasal analizler, hayvan deneylerinin tamamlanmasının ardından gerçekleştirildi.

10.9. Sonuçların Değerlendirilmesi

10.9.1. Elde Edilen Sonuçların İşlenmesi

Çalışmamızda biyokimyasal analiz için kullanılan doku örnekleri, analizler tamamlandıktan sonra atık yönetimi kurallarına uygun şekilde imha edildi. Elde edilen veriler, tablolama programları kullanılarak bulut veri paylaşım platformlarına yüklendi ve araştırmacı ekip üyeleri arasında paylaşıldı. Fonksiyonel skora için yapılan video kayıtları da aynı şekilde bulut tabanına kaydedildi.

10.9.2. Verilerin Gözlemciler Arası Uyumu

Fonksiyonel iyileşme parametreleri, gözlemciye bağlı değişiklikler gösterebileceği için gözlemci yanlılığı riski taşır. Bu riski azaltmak amacıyla, fonksiyonel değerlendirmeler (BBB skoru) iki farklı gözlemci tarafından yapıldı. Gözlemcilerin verdikleri puanlar birebir örtüştüğünde, veriler doğrudan analize dahil edildi. Eğer puanlar birebir örtüşmezse, gözlemciler birlikte video kayıtlarını izleyerek ortak bir karar verdiler ve bu şekilde son veriler elde edilip analize dahil edildi.

10.9.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen ham veriler Excel dosyası olarak SPSS 26.0 programına aktarıldı ve istatistiksel analizler bu program aracılığıyla yapıldı. Kategorik veriler için frekans tabloları oluşturuldu, sürekli veriler için ise ortalama ve standart sapma hesaplandı. Gruplar arasında karşılaştırma yaparken One-way ANOVA, iki grup arasında karşılaştırma yaparken ise bağımsız örneklem t-testi kullanıldı. Tüm analizlerde hata payı 0,05 olarak belirlendi ve p değeri 0,05'in altındaysa sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

11. BULGULAR

11.1 Biyokimyasal Sonuçlar

11.1.1 Fe²⁺ Düzeyi Ölçümleri

Ferroptoz, demire bağlı oksidatif hasar ve hücre hasarı ile karakterize kontrollü bir hücre ölümü yolağıdır. Ferroptozun demir şelasyonu ile baskılandığı ortamlarda demirin azalması beklenmektedir. Fe²⁺ seviyesi analizleri bu bakış açısıyla değerlendirilmiştir.

24 saat(sa) sham grubu (0.050 ± 0.008) ile kıyaslama yapıldığında 24 saat SCI (0.954 ± 0.305) grubunda Fe²⁺ seviyelerinin anlamlı olacak şekilde arttığı gözlemlendi ($p=0.0122$). Benzer ilişki hem 72 saatlik gruplarında da saptandı ($p=0.0017$). Hasar yaratılan omurilikte Fe²⁺ seviyelerinin her 2 zaman diliminde arttığı ortaya konuldu. Fe²⁺ miktarının SCI 24sa ($0.954 \pm$

0.305) ve SCI 72sa (1.5955 ± 0.356) takip sürelerinde düzeylerinin artış göstermiş olduğu görüldü($p=0.19$).

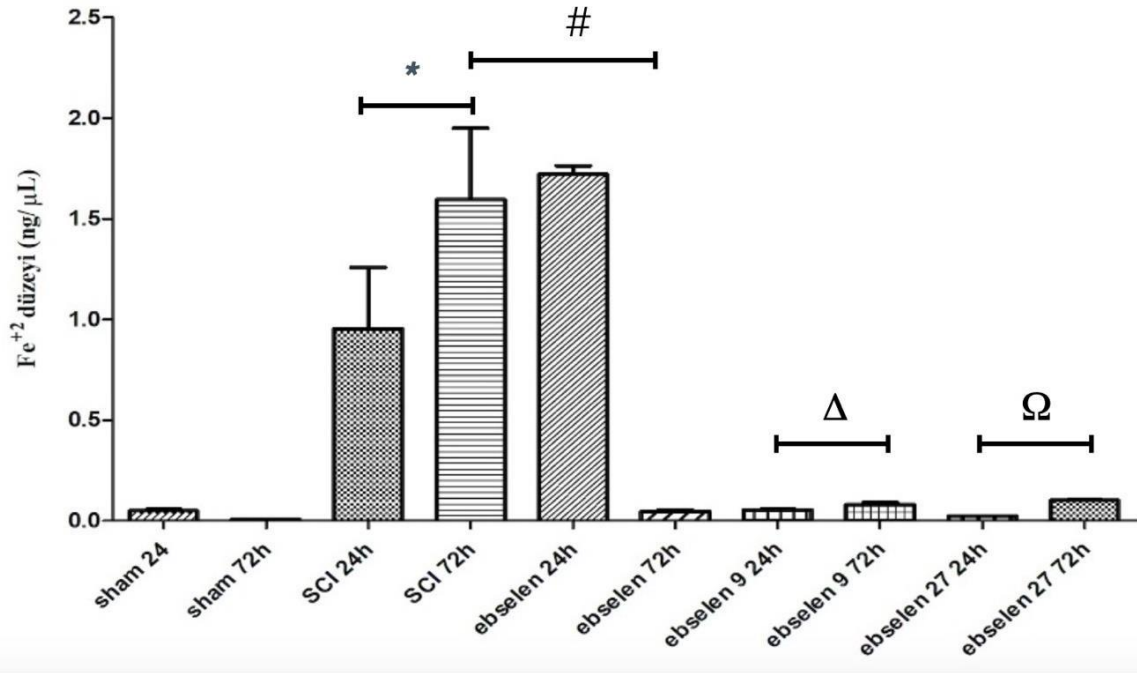
24sa SCI grubu (0.954 ± 0.305) ve 24sa Ebselen (1.7215 ± 0.043) grubunun karşılaştırmalı analizinde Ebselen grubunda Fe^{2+} seviyesinde artış olduğu görüldü ($p=0.0255$). 24sa SCI ve 72sa SCI değerlendirildiğinde demir şelasyonu yapılmadığı için Fe^{+2} düzeyleri artmaktadır. 72sa Ebselen (0.048 ± 0.006) ve 72sa SCI (1.595 ± 0.355) grubu karşılaştırmasında ise Fe^{+2} seviyesinde anlamlı bir düşüş olduğu ($p=0.0019$) görüldü. Ebselen'in demir şelasyonu etkisi hasarın ilk 24 saatlik kısmında başlamamaktadır. Ancak 72 saatlik zaman dilimine bakıldığında hasar grubuna kıyasla daha anlamlı seviyede demir şelasyonu olduğu ortaya konuldu(**$p=0.0019$**).

24sa Ebselen 9 grubu (0.055 ± 0.004) ve 24sa SCI grubu (0.954 ± 0.305) karşılaştırmalı analizinde Ebselen 9 grubunda Fe^{2+} seviyesinde düşüşün anlamlı olduğu görüldü($p=0.013$). 72 sa Ebselen 9 (0.080 ± 0.011) ve 72sa SCI (1.595 ± 0.355) grubunda bu düşüş anlamlı olarak devam etmektedir($p=0.0021$). Bu sonuçlar ile Ebselen 9'un demir şelasyonu etkisinin ilk 24 saatlik periyotta başlayıp 72 saatte de devam ettiği görüldü.

24sa Ebselen 27 grubu (0.023 ± 0.001) ve 24sa SCI grubu (0.954 ± 0.305) karşılaştırmalı analizinde Ebselen 27 grubunda Fe^{2+} seviyesinde düşüşün anlamlı olduğu görüldü($p=0.011$). 72sa Ebselen 27 (0.101 ± 0.004) ve 72 sa SCI (1.595 ± 0.355) grubunda bu düşüş anlamlı olarak devam etmektedir(**$p=0.0023$**). Bu sonuçlar ile Ebselen 27'nin demir şelasyonu etkisinin ilk 24 saatlik periyotta başlayıp 72 saatte de devam ettiği görüldü.

24sa Ebselen 9 (0.055 ± 0.004) ve 24sa Ebselen grubu (1.7215 ± 0.043) karşılaştırmalı analizinde Fe^{2+} seviyesinde düşüşün anlamlı olduğu görüldü (**$p=0.0006$**). 72sa Ebselen 9 (0.080 ± 0.011) ve 72sa Ebselen grubu (0.048 ± 0.006) karşılaştırıldığında düşüşün anlamlı olmadığı görüldü($p=ns$).

24sa Ebselen 27 (0.023 ± 0.001) ve 24sa Ebselen grubu (1.7215 ± 0.043) karşılaştırmalı analizinde Fe^{2+} seviyesinde düşüşün anlamlı olduğu görüldü (**$p=0.0006$**). 72sa Ebselen 27 ve 72sa ebselen grubu karşılaştırıldığında düşüşün anlamlı olmadığı görüldü ($p=ns$).



Şekil-26: Fe²⁺ düzeylerinin çoklu çapraz analizleri * $p < 0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p < 0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; Δ $p < 0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; Ω $p < 0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

11.1.2 MDA Düzeyleri Ölçümleri

Ferroptoz sürecinde, lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin artması beklenir. Bu bilgi temel alınarak, çalışmanın ilk aşamasında Sham grubu ile SCI grubunun MDA düzeyleri karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma, omurilik hasarının lipid peroksidasyonunu (ve dolayısıyla ferroptoz sürecini) tetikleyip tetiklemediğini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

24sa sham (4.837 ± 0.079) ve 24sa SCI (8.005 ± 0.626) grubu karşılaştırıldığında 24 saatlik SCI grubunda MDA düzeylerinin anlamlı bir şekilde daha yüksek olduğu görüldü ($p=0.0014$). 72sa sham (5.567 ± 0.759) ve 72sa SCI (7.918 ± 0.11) grubu karşılaştırıldığında ise yine aynı şekilde SCI grubunda anlamlı şekilde MDA seviyeleri daha yüksek bulundu ($p=0.0164$). Bu sonuçlar ile, hasar uygulanan gruplarda, lipid peroksidasyonunun arttığı ortaya konuldu.

Analizin sonraki aşamasında Ebselen alan grup, tedavi almamış omurilik hasarı uygulanmış grup ile karşılaştırıldı. 24sa Ebselen grubu (7.756 ± 0.226) ile 24sa SCI grubu (8.005 ± 0.626) grubu karşılaştırıldığında MDA seviyeleri arasında anlamlı bir fark olmadığı

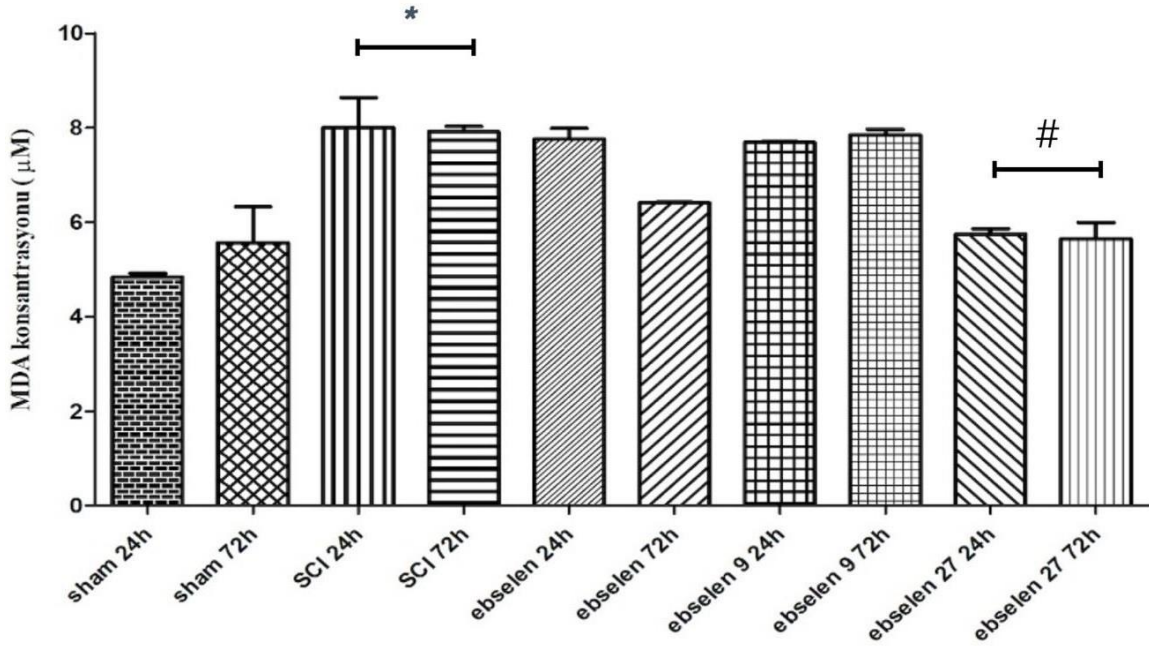
saptandı(**p=ns**). Aynı karşılaştırma 72sa Ebselen (6.414 ± 0.008) ve 72sa SCI (7.918 ± 0.11) grupları arasında yapıldığında ise MDA seviyesinin 72sa Ebselen grubunda anlamlı fark olmadığı saptandı (**p=0.1**). Bu veriler, Ebselen'in MDA düzeyini travmanın ilk 24 ve 72 saatinde etkin şekilde azaltmadığını göstermektedir.

Sonraki aşamada Ebselen türevleri karşılaştırıldı.

24sa SCI (8.005 ± 0.626) ve 24sa Ebselen 9 (7.689 ± 0.007) grupları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında MDA seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gösterildi (**p=ns**). 72sa SCI (7.918 ± 0.11) ve 72sa Ebselen 9 (7.843 ± 0.118) grupları karşılaştırıldığında, her iki grup arasında MDA seviyeleri açısından anlamlı bir fark bulunmadığı gösterildi (**p=ns**). Ebselen 9'un Ebselen gibi MDA düzeyini travmanın ilk 24 ve 72 saatinde etkin şekilde azaltmadığını göstermektedir.

24sa SCI (8.005 ± 0.626) ve 24sa Ebselen 27 (5.743 ± 0.124) grupları karşılaştırıldığında, MDA'nın Ebselen 27 grubunda anlamlı şekilde düştüğü gösterildi (**p=0.007**). 72sa SCI (7.918 ± 0.11) ve 72sa Ebselen 27 (5.640 ± 0.355) grupları karşılaştırıldığında, MDA'nın Ebselen 27 grubunda anlamlı şekilde düştüğü gösterildi(**p=0,019**). Ebselen 27'nin MDA düzeyini travmanın ilk 24 ve 72 saatinde etkin şekilde azalttığı gösterilmiştir. Sekonder hasarı etkin şekilde azalttığı gösterilmiştir.

Ebselen 9 ve 27 gruplarının karşılaştırılmalı analizlerinde 24sa Ebselen 9 (7.689 ± 0.007) 24sa Ebselen 27 (5.743 ± 0.124) grubu karşılaştırıldığında MDA düzeylerini Ebselen 27'nin anlamlı düzeyde düşürdüğü gösterildi(**p=0,014**). 72sa Ebselen 9 (7.843 ± 0.118) 72sa Ebselen 27 (5.640 ± 0.355) grubu karşılaştırıldığında MDA düzeylerini Ebselen 27'nin anlamlı düzeyde düşürdüğü gösterildi(**p=0,022**).



Şekil-27: MDA düzeylerinin çoklu çapraz analizleri; * $p < 0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p < 0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

11.1.3 GSH Ölçümleri

Ferroptoz yolağı GSH tüketerek ilerlemektedir. Ferroptozun baskılanması, GSH seviyelerinin yükselmesi ile sonuçlanmaktadır. Çalışma verileri GSH seviyeleri açısından analiz edildiğinde;

24sa SCI (18.814 ± 0.684) grubuyla 24sa Sham grubu (69.143 ± 2.632), 72sa SCI (17.393 ± 6.878) grubu ile 72sa Sham grubu (50.466 ± 0.199) karşılaştırıldığında; her iki zaman grubunda da hasarın etkin şekilde verildiğini doğrulayacak şekilde GSH seviyeleri azalmış bulunmuştur ($p=0,0001$, $p=0,0013$).

24sa Ebselen (119.220 ± 0.467) ve 24sa SCI (18.814 ± 0.684) grupları karşılaştırıldığında 24sa Ebselen grubunda anlamlı olacak şekilde GSH seviyeleri yükselmiştir ($p=0,0000005$). 72sa Ebselen (35.459 ± 0.267) ve 72sa SCI (17.393 ± 6.878) karşılaştırıldığında Ebselen grubunda yine anlamlı düzeye GSH seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür ($p=0.023$).

24sa Ebselen 9 (133.372 ± 3.236) ve 24sa SCI (18.814 ± 0.684) grupları karşılaştırıldığında 24sa Ebselen 9 grubunda anlamlı olacak şekilde GSH seviyeleri yükselmiştir ($p=0,0000002$). 72sa Ebselen 9 (103.809 ± 0.88) ve 72sa SCI (17.393 ± 6.878)

karşılaştırıldığında Ebselen 9 grubunda yine anlamlı düzeye GSH seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (**p=0.00001**).

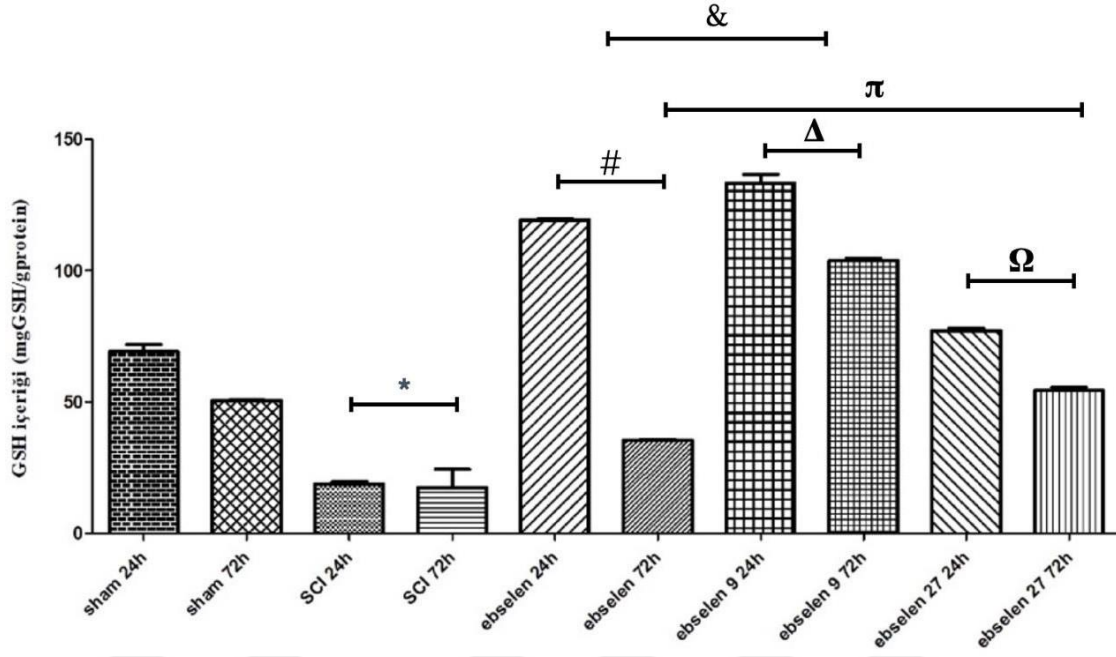
24sa Ebselen 27 (77.104 ± 0.89) ve 24sa SCI (18.814 ± 0.684) grupları karşılaştırıldığında 24sa Ebselen 27 grubunda anlamlı olacak şekilde GSH seviyeleri yükselmiştir(**p=0,000007**). 72sa Ebselen 27 (54.281 ± 1.298) ve 72sa SCI (17.393 ± 6.878) karşılaştırıldığında Ebselen 27 grubunda yine anlamlı düzeye GSH seviyesinin yüksek olduğu görülmüştür (**p=0.0008**).

24sa Ebselen (119.220 ± 0.467) ve 24sa Ebselen 9 (133.372 ± 3.236) grupları karşılaştırılmalı analizinde 24sa Ebselen 9 grubunda anlamlı olacak şekilde GSH seviyelerini daha fazla yükselmiştir(**p=0,007**). 24sa Ebselen (119.220 ± 0.467) ve 24sa Ebselen 27 (77.104 ± 0.89) grupları karşılaştırılmalı analizinde 24sa Ebselen grubu lehine GSH seviyeleri anlamlı şekilde yükselmiştir(**p=0.00003**).

72sa Ebselen (35.459 ± 0.267) ve 72sa Ebselen 9 (103.809 ± 0.88) grupları karşılaştırılmalı analizinde Ebselen 9 grubunda anlamlı olacak şekilde GSH seviyeleri yükselmiştir(**p=0,00003**). 72sa Ebselen 27 (54.281 ± 1.298) ve 72sa Ebselen (35.459 ± 0.267) grupları karşılaştırılmasında Ebselen 27 lehine gruplar arasında anlamlı düzeyde artış olmuştur(**p=0,019**).

Ebselen 9 ve Ebselen 27 kendi aralarında karşılaştırılmalarında 24saat ve 72 saat takiplerde Ebselen 9 istatistiksel olarak anlamlı GSH artışı sağlamıştır (**p=0,000009**, **p=0,00019**).

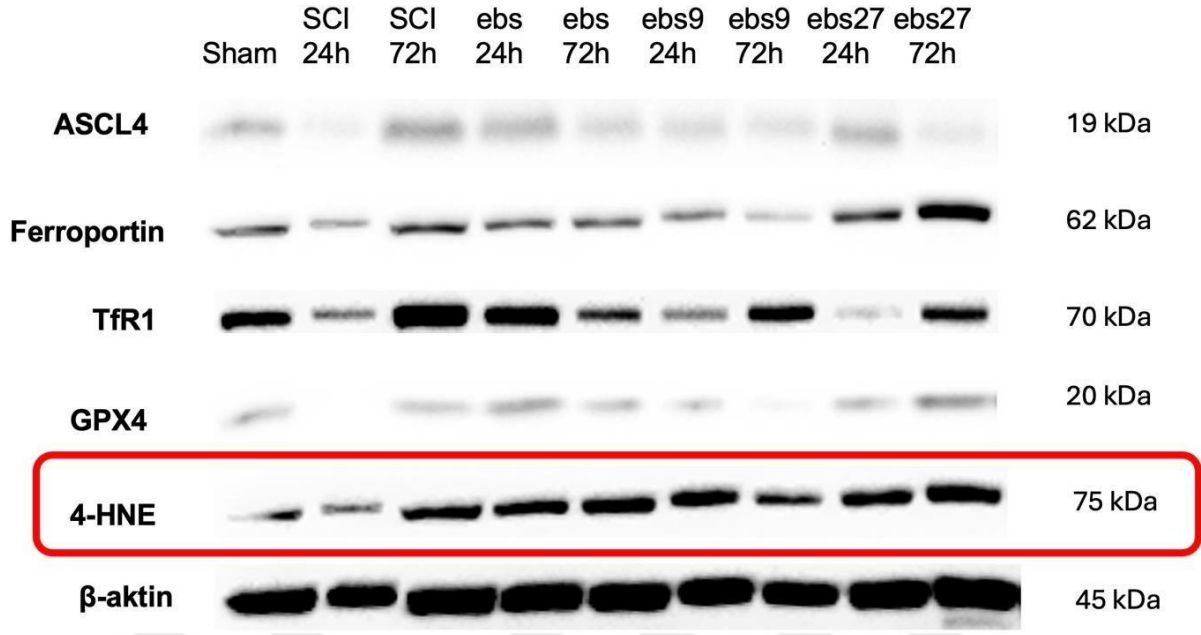
Bu veriler Ebselen ve türevleri uygulamasının tedavi uygulanmamış gruba nazaran GSH seviyesini her iki zaman ekseninde de anlamlı şekilde yüksek tuttuğu, ortaya koymuştur. Bu veriler hem Ebselen ve türevleri antioksidan etkinliğini GSH aracılığı ile yaptığını desteklemekte, hem de ferroptoz açısından önemli bir enzim olan GPX4'ün aktivitesini arttırma potansiyeli olduğunu göstermektedir. **Ebselen 9 ise Ebselen 27'ye her iki zaman diliminde üstünlük sağlamıştır.**



Şekil-28: GSH seviyesi ölçümlerinin çapraz analizleri; * $p < 0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p < 0.05$; Ebselen tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; Δ $p < 0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; Ω $p < 0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar; & $p < 0.05$; Ebselen 9 tüm gruplar vs. Ebselen tüm gruplar; π $p < 0.05$; 72sa Ebselen 27 vs. 72sa Ebselen

11.1.4. 4-HNE Düzeyi Ölçümleri

4-HNE bir lipid peroksidasyon ürünüdür. Artmış seviyeleri artmış lipid peroksidasyonunu işaret eder. Ferroptotik yolağın baskılanması durumunda 4-HNE seviyelerinin azalması beklenmektedir. 4-HNE seviyeleri ile ilgili analizler bu doğrultuda yorumlanmıştır. 4-HNE, yarı ömrü oldukça kısa olan bir radikal olduğu için çalışmada 4-HNE modifiye protein düzeyleri değerlendirilmiştir. Buna göre protein ekspresyonundaki değişim sham grubu ile kıyaslanarak değerlendirmeye alınmıştır.



Şekil-29: 4-HNE ölçümleri elektroforez görüntüleri

Hasar sonrası SCI grubunda sham grubuna oranla artmış 4-HNE seviyeleri tespit edilmiştir. Bu durum hasar oluşturulan omurilikte lipid peroksidasyon mekanizmalarının devreye girdiğini doğrulamaktadır.

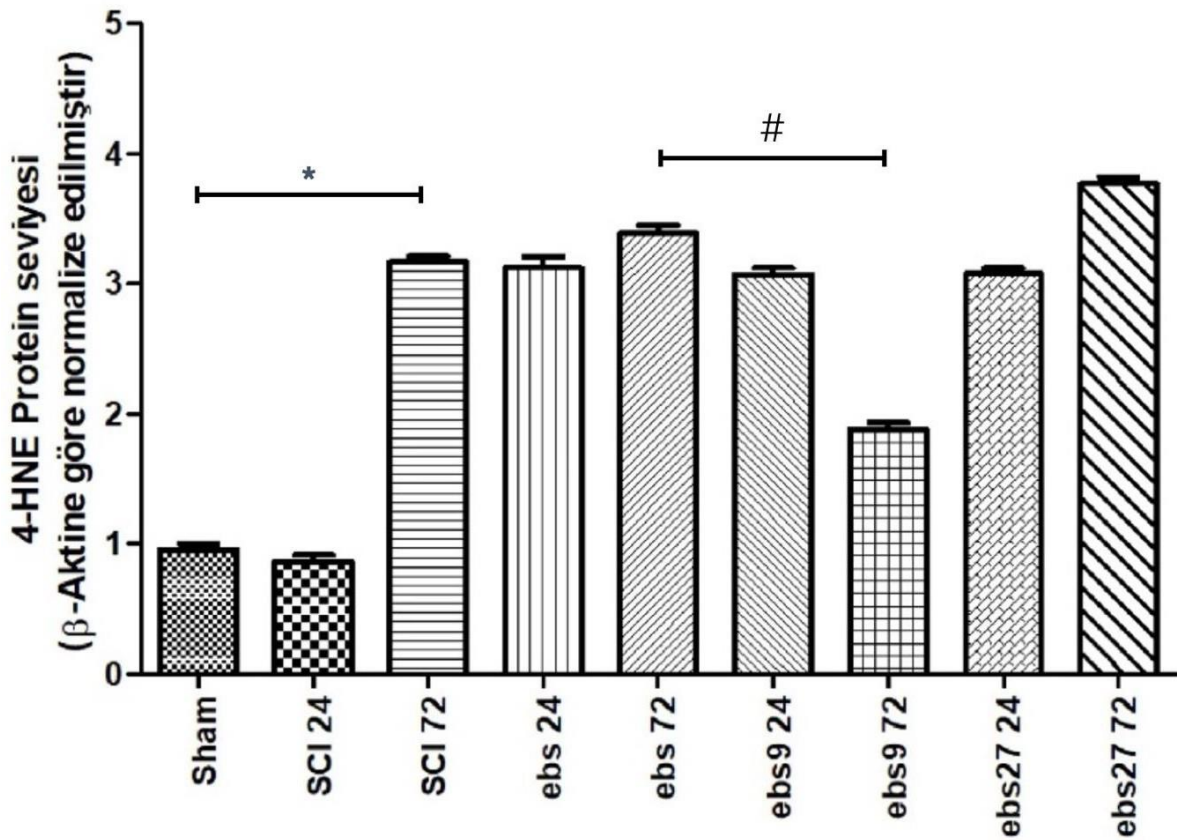
24sa Ebselen (3.121 ± 0.126) ve 24sa SCI (0.864 ± 0.073) grubu karşılaştırıldığında SCI grubunda 4-HNE seviyelerinin anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,00007$). 24sa Ebselen 9 (3.067 ± 0.076) ve 24sa SCI (0.864 ± 0.073) grubu karşılaştırıldığında SCI grubunda 4-HNE seviyelerinin anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,00008$). 24sa Ebselen 27 (3.076 ± 0.058) ve 24sa SCI (0.864 ± 0.073) grubu karşılaştırıldığında SCI grubunda 4-HNE seviyelerinin anlamlı olarak düşük saptanmıştır ($p=0,00008$). 24sa Ebselen'in 24sa Ebselen 9 ve 24sa Ebselen 27 ile karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı bir 4-HNE düşüşü saptanmamıştır ($p=ns$).

Bu veriler ışığında ilk 24 saatlik periyotta Ebselen ve türevleri 4-HNE baskılanmasında etkin rol oynamamışlardır ve birbirlerine üstünlükleri yoktur.

72sa Ebselen (3.389 ± 0.082) ve 72sa SCI (3.166 ± 0.067) grubu karşılaştırıldığında Ebselen grubunda 4-HNE seviyelerinde artış görülmüş olup anlamlı değildir ($p=0.25$). 72sa Ebselen 9 (1.876 ± 0.081) ve 72sa SCI (3.166 ± 0.067) karşılaştırıldığında Ebselen 9 grubunda 4-HNE seviyelerinde anlamlı düşüş saptanmıştır ($p=0,0004$). 72sa Ebselen 27 (3.768 ± 0.075) ve 72sa SCI (3.166 ± 0.067) grubu karşılaştırıldığında Ebselen 27 lehine 4-HNE seviyelerinde artış saptanmıştır ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,008$).

72sa Ebselen ve 72sa Ebselen 9 grubu karşılaştırıldığında Ebselen 9 grubunda 4-HNE düzeylerinde anlamlı düzeyde baskılanma olmuştur($p=0,0002$). 72sa Ebselen ve 72sa Ebselen 27 grupları karşılaştırıldığında 4-HNE düzeylerinde Ebselen lehine sınırda anlamlı baskılanma olmuştur($p=0,046$). 72sa Ebselen 9 ve 72sa Ebselen 27 karşılaştırıldığında 4-HNE düzeylerinde baskılanma Ebselen 9 lehine oluşmaktadır($p=0,000095$).

Bu veriler ele alındığında Ebselen ve Ebselen 27 ilk 24 ve 72 saatlik periyotta etkin olamamışlardır. Oysa Ebselen 9'un baskılama etkisini 72 saatlik periyotta göstermiştir.

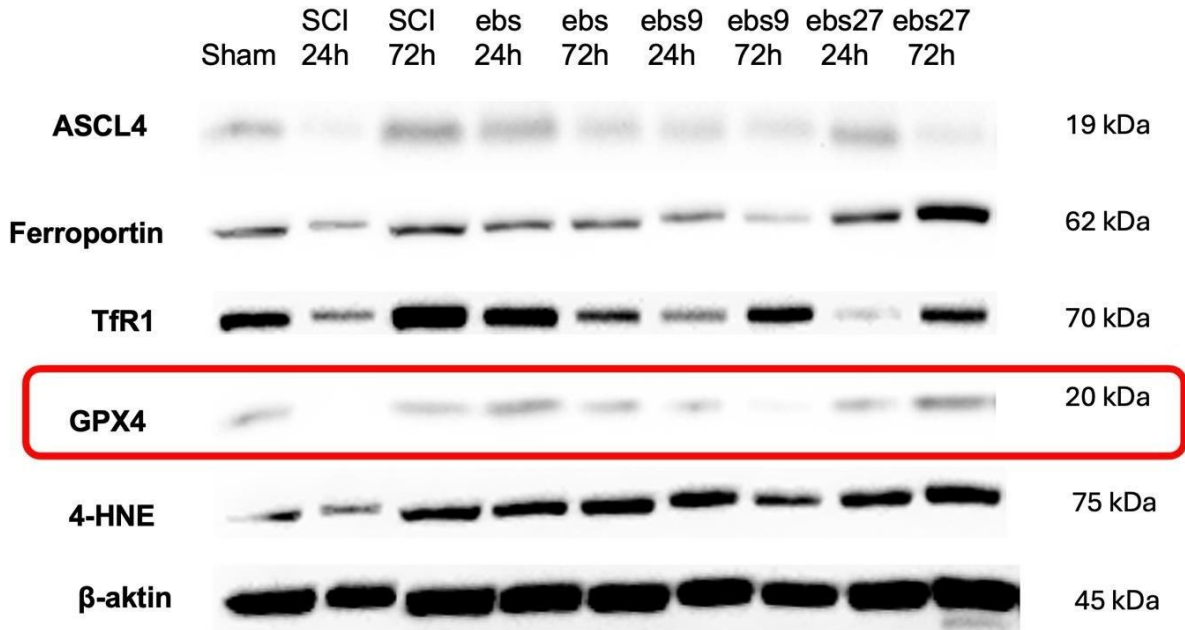


Şekil-30: 4-HNE düzeylerinin çapraz analizi; * $p<0.05$; SCI-tüm gruplar vs. sham-tüm gruplar; # $p<0.05$; 72sa Ebselen 9 vs. 72sa Ebselen

11.1.5. GPX4 Düzeyi Ölçümleri

Antioksidan bir enzim olan GPX4'ün işlevi, lipidlerdeki oksidatif hasarı onarmaktır. GPX4 miktarında azalma, artmış ferroptotik aktivite ile ilişkilidir. Yani ferroptozun baskılanması durumunda GPX4 seviyelerinde artış olması beklenmektedir. GPX4 seviyeleri ile

ilgili analizler bu doğrultuda yorumlanmıştır. Dansitometrik veriler sham grubu ile kıyaslanarak değerlendirilmeye alınmıştır.



Şekil-31: GPX4 ölçümleri elektroforez görüntüleri

Hasar sonrası SCI grubunda sham grubuna oranla azalmış GPX4 seviyeleri tespit edilmiştir. Bu bize hasar oluşturulan omurilikte antioksidan savunma mekanizmalarının etkin bir şekilde devreye girdiğini göstermektedir.

24 saatlik ölçümler ele alındığında 24sa Ebselen (1.616 ± 0.045) ve 24sa SCI (0.006 ± 0.0001) grubu karşılaştırıldığında 24sa Ebselen grubunda GPX4 seviyelerinin anlamlı olarak arttığı görüldü ($p=0,00001$). 24sa Ebselen 9 (0.475 ± 0.040) ve 24sa SCI (0.006 ± 0.0001) grubunun karşılaştırılmalı analizinde 24sa Ebselen 9 grubunda GPX4 seviyelerinde anlamlı artış oldu ($p=0,019$). 24sa Ebselen 27 (0.775 ± 0.055) ve 24sa SCI (0.006 ± 0.0001) grubunun karşılaştırılmalı analizinde 24sa Ebselen 27 grubunda GPX4 seviyelerinde anlamlı artış oldu ($p=0,00028$).

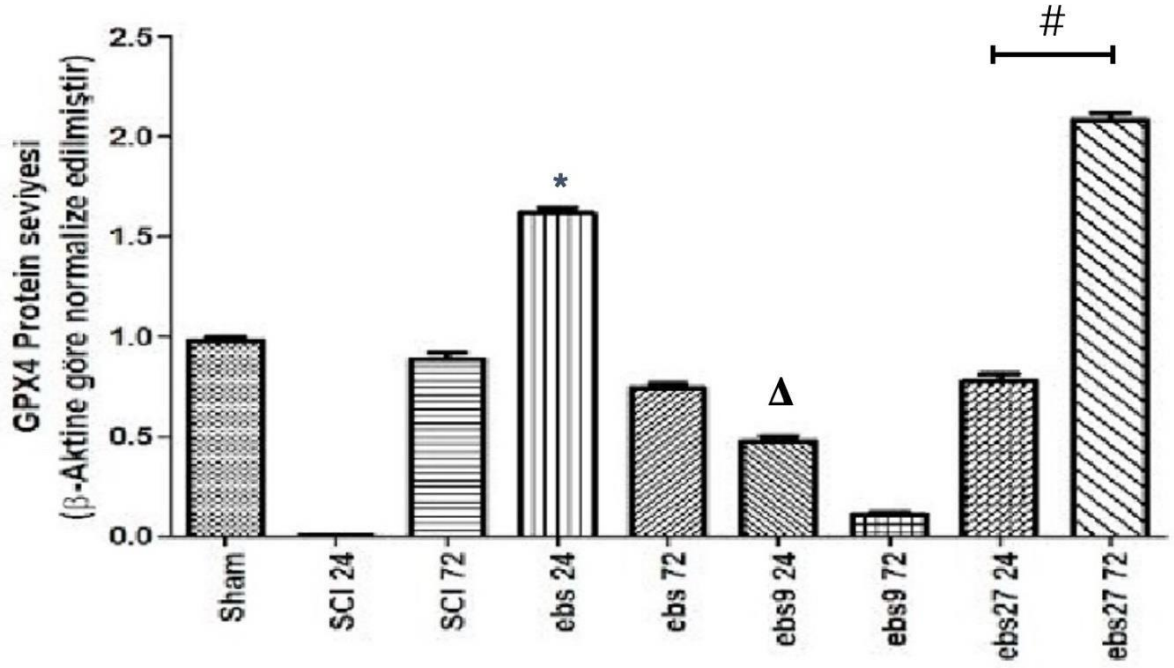
24sa Ebselen 9 ve 24sa Ebselen grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p=0,00005$). 24sa Ebselen 27 ve 24sa Ebselen grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p=0,00019$). 24sa Ebselen 27 ve 24sa Ebselen 9 grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen 27 lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü ($p=0,011$).

Bu veriler ışığında Ebselen ve türevleri ilk 24 saatte GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış sağlamıştır. Bu artış en fazla Ebselen grubunda olmuştur.

72 saatlik ölçümler ele alındığında 72sa Ebselen (0.742 ± 0.33) ve 72sa SCI (0.888 ± 0.043) grubu karşılaştırıldığında her iki grup için GPX4 seviyeleri artırma açısından birbirine üstünlükleri yoktur(**p=0,094**). 72sa Ebselen 9 (0.108 ± 0.016) ve 72sa SCI (0.888 ± 0.043) grubunun karşılaştırılmalı analizinde 72sa Ebselen 9 grubu GPX4 seviyelerinde 72sa SCI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde geride kaldığı görülmektedir(**p=0,0001**). 72sa Ebselen 27 (2.084 ± 0.046) ve 72sa SCI (0.888 ± 0.043) grubunun karşılaştırılmalı analizinde 72sa Ebselen 27 grubunda GPX4 seviyelerinde ciddi artış olduğu görüldü(**p=0,00003**).

72sa Ebselen 9 ve 72sa Ebselen grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü(**p=0,0003**). 72sa Ebselen 27 ve 72sa Ebselen grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen 27 lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü(**p=0,0001**). 72sa Ebselen 27 ve 72sa Ebselen 9 grubu karşılaştırılmalı analizinde Ebselen 27 lehine GPX4 seviyelerinde anlamlı bir artış olduğu görüldü(**p=0,000004**).

Bu veriler değerlendirildiğinde Ebselen 9 72 saatlik periyotta GPX4 artışını sürdürememiştir. 24 saatlik periyotta Ebselen'in gerisinde kalan Ebselen 27 ise ciddi bir GPX4 artışı göstermiştir.

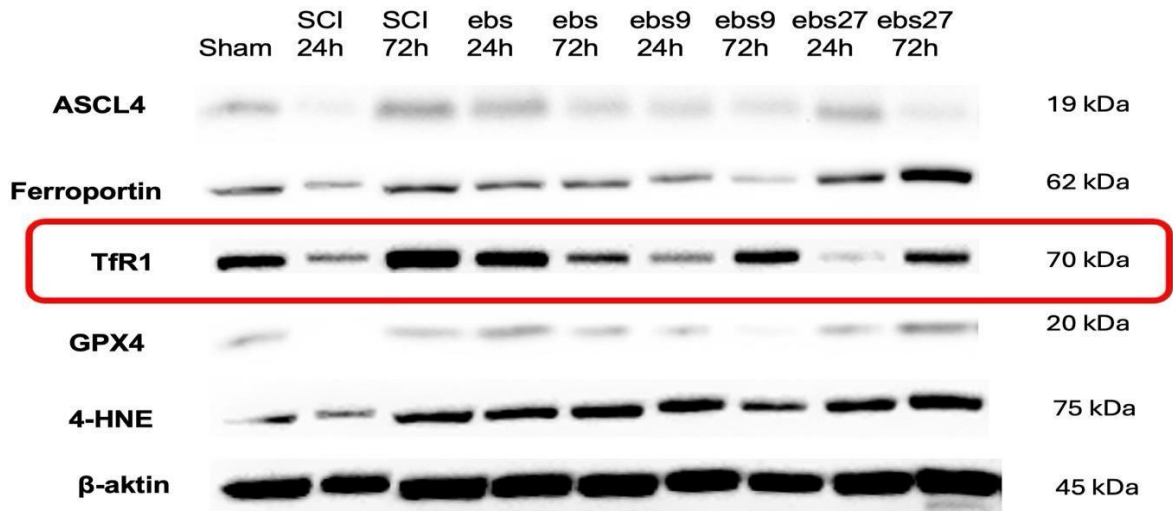


Şekil-32: GPX4 çapraz analizleri; * $p < 0.05$; 24sa Ebselen vs. 72sa SCI; ^Δ24sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI; [#] $p < 0.05$; Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

11.1.6. TfR1 Düzeyi Ölçümleri

TfR1, hücre içine +3 değerlikli demir taşınmasını sağlar ve ferroptozun aktive olduğu durumlarda TfR1 seviyelerinin artması beklenir. Ancak TfR1, doğrudan ferroptozu başlatan bir unsur değil; bu süreçte dolaylı bir role sahiptir. Ferroptoz etkili bir şekilde baskılandığında, TfR1 seviyelerinin düşük olacağı tahmin edilmektedir.

TfR1 seviyelerine yönelik analizler bu çerçevede değerlendirilmiş ve elde edilen dansitometrik veriler sham grubu ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Bu değerlendirme, TfR1 seviyelerindeki değişikliklerin ferroptoz süreci ile bağlantısını anlamak amacıyla yapılmıştır.



Şekil-33: *TfR1* ölçümleri elektroforez görüntüleri

Hasar grubunda ilk 24 saatte *TfR1* düzeyleri artmasa da 72 saat sonunda arttığı görüldü. Bu durum hasarla birlikte +3 değerlikli demirin hücre içine girişinde artış olduğunu ifade etmektedir.

24sa Ebselen (1.329 ± 0.007) ile 24sa SCI (0.313 ± 0.002) grubu karşılaştırıldığında 24sa Ebselen grubunda *TfR1* düzeylerinin SCI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artmıştır ($p=0.000003$). Bu veri Ebselenin 24 saatte *TfR1* ekspresyonu baskılamadığı görüldü.

24sa Ebselen 9 (0.342 ± 0.011) ile 24sa SCI (0.313 ± 0.002) grubu karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=ns$). 24sa Ebselen 27 (0.113 ± 0.33) ile 24sa SCI (0.313 ± 0.002) grubu karşılaştırıldığında 24sa Ebselen 27 grubunda *TfR1* düzeylerinin SCI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır ($p=0.002$).

24sa Ebselen ile 24sa Ebselen 9 karşılaştırıldığında Ebselen 9 lehine *TfR1* düzeyi anlamlı olarak azalmıştır ($p=0.000003$). 24sa Ebselen ile 24sa Ebselen 27 grupları karşılaştırıldığında Ebselen 27 lehine *TfR1* düzeylerindeki düşüşün daha da anlamlı olduğu görüldü ($p=0.000001$). 24sa Ebselen 9 ve 24sa Ebselen 27 grubu karşılaştırıldığında *TfR1* düzeyinin Ebselen 27 lehine anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p=0.001$).

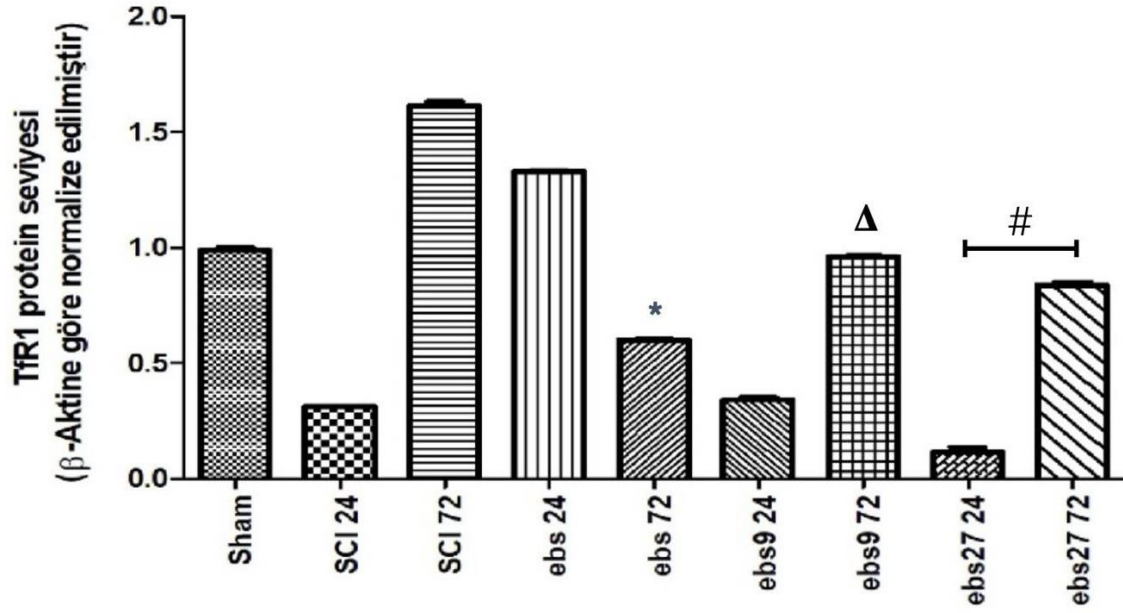
Bu veriler değerlendirildiğinde ilk 24 saatte *TfR1* düzeylerinde beklediğimiz azalma Ebselen ve Ebselen 9 gruplarında olmazken ve Ebselen 27 gruplarında görüldü. Yani ilk 24 saatte Ebselen 27 hücre içi demir düzeyinin regülasyonunda rol oynamıştır.

72sa Ebselen (0.601 ± 0.001) ile 72sa SCI (1.613 ± 0.027) grubu karşılaştırıldığında 72sa Ebselen grubunda TfR1 düzeylerinin SCI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır(**p=0.000003**). Bu veri Ebselenin ilk 24 saatte etkili olmasa da 72 saatte etkin şekilde TfR1 yoluyla ferroptozu baskıladığı görüldü.

72sa Ebselen 9 (0.958 ± 0.010) ile 72sa SCI (1.613 ± 0.027) grubu karşılaştırıldığında Ebselen 9 grubu lehine TfR1 düzeyleri anlamlı olarak baskılanmıştır. (**p=0.000019**). 72sa Ebselen 27(0.837 ± 0.021) ile 72sa SCI (1.613 ± 0.027) grubu karşılaştırıldığında 72sa Ebselen 27 grubunda TfR1 düzeyi SCI grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde azalmıştır(**p=0.00001**). Ebselen 9 24 saatlik periyotta etkin olmasa da 72 saatte baskılama etkisini göstermiştir. Ebselen 27 baskılama etkisine 72 saatte de devam etmektedir.

72sa Ebselen ile 72sa Ebselen 9 karşılaştırıldığında Ebselen lehine TfR1 düzeyi anlamlı olarak azalmıştır(**p=0.00022**). 72sa Ebselen ile 72sa Ebselen 27 grupları karşılaştırıldığında Ebselen lehine TfR1 düzeylerindeki düşüşün anlamlı olduğu görüldü(**p=0.0011**). 72sa Ebselen 9 ve 72sa Ebselen 27 grubu karşılaştırıldığında TfR1 düzeyinin Ebselen 27 lehine anlamlı şekilde azaldığı saptandı(**p=0.015**).

Bu veriler ışığında Ebselen ilk 24 saatte etkin olmasa da 72 saatte Ebselen türevlerine göre daha etkili bir baskılama oluşturmuştur. İlk 24 saatlik periyotta sadece Ebselen 27 anlamlı etki gösterirken, 72 saatte her üç molekülde etkin baskılama sağlamıştır. TfR1 düzeyleri açısından Ebselen 27 diğer moleküllere üstünlük sağlamıştır.



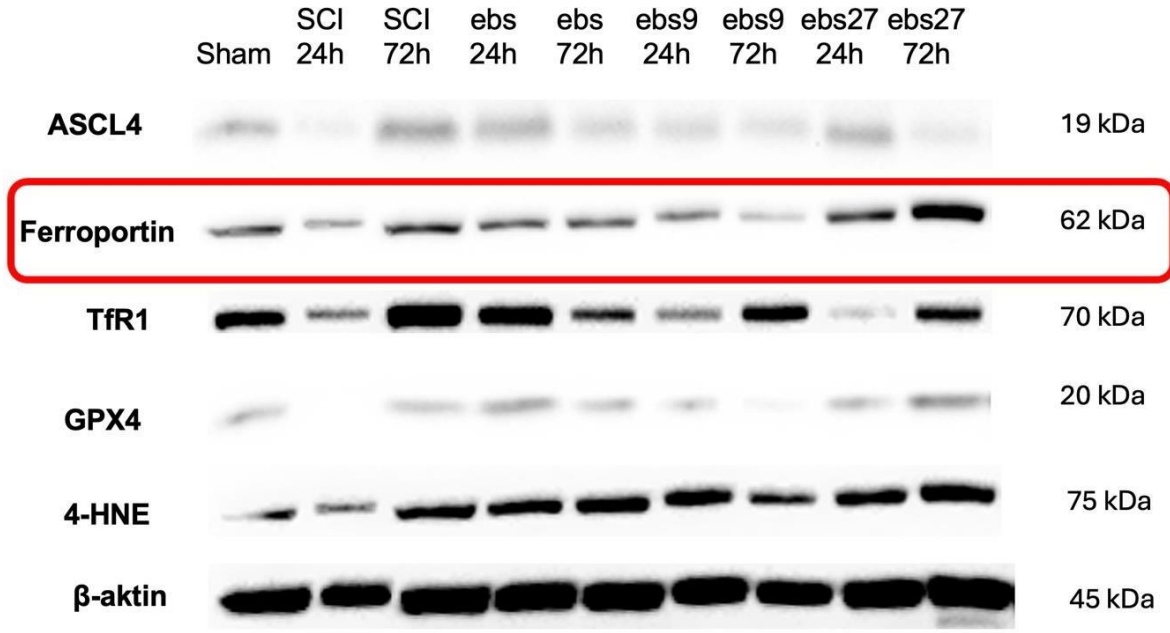
Şekil-34: TfR1 Düzeyi Ölçümleri Çapraz Analizi; * $p < 0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; $^{\Delta} p < 0.05$; 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI; # $p < 0.05$ Ebselen 27 tüm gruplar vs. SCI tüm gruplar

11.1.7. Ferroportin (FPN) Düzeyi Ölçümleri

Ferroportin (SLC40A1), hücre zarında bulunan ve serbest demiri hücre dışına taşıyan tek proteindir. Ferroportin engellendiğinde hücredeki demir miktarı artar ve bu durum ferroptozu yol açar. Yani, ferroptoz süreci etkili bir şekilde durdurulursa ferroportin seviyeleri artar.

Bu yüzden, ferroportin seviyeleri ile ilgili analizler, ferroptoz etkisi açısından değerlendirilmiştir. Dansitometrik veriler ise sham grubuyla karşılaştırılarak incelenmiştir.

Hasar sonrası SCI grubunda sham grubuna oranla azalmış FPN seviyeleri tespit edilmiştir. Bu bize hasar oluşturulan omurilikte ferroptoz mekanizmalarının devreye girdiğini ve artan demir seviyelerine paralel olarak FPN düzeyinin düştüğünü göstermektedir.



Şekil-35: Ferroportin seviyeleri ölçümleri elektroforez görüntüleri

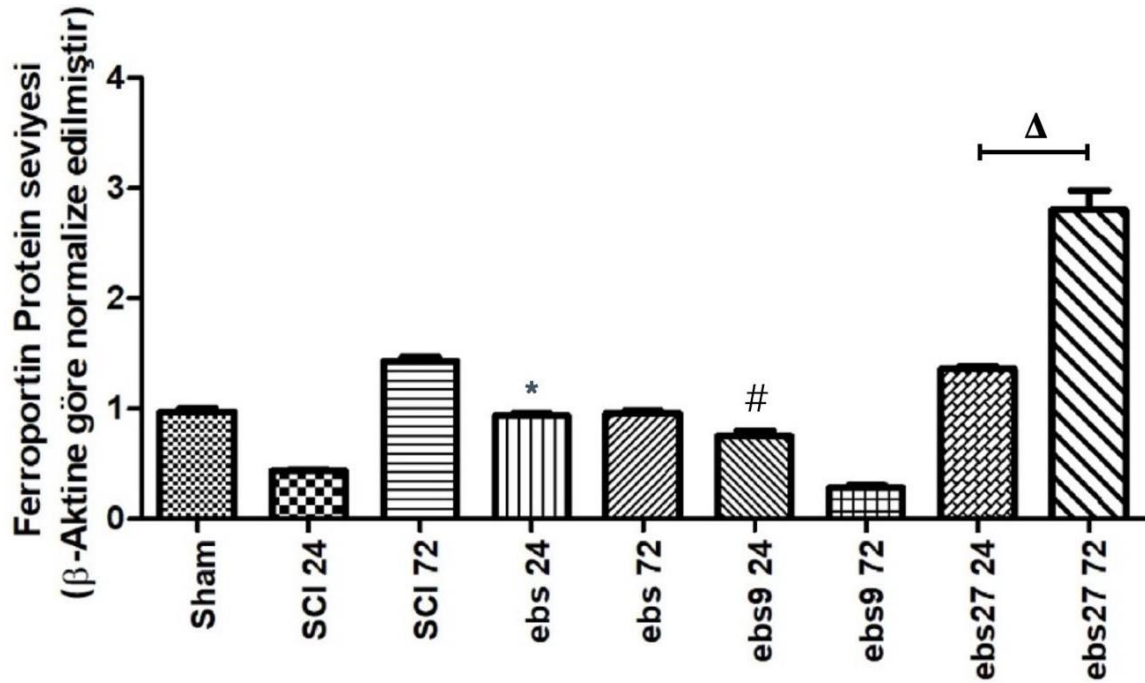
24sa Ebselen (0.937 ± 0.030) ile 24sa SCI (0.436 ± 0.021) grupları karşılaştırıldığında Ebselen grubunda anlamlı düzeyde FPN artışı olduğu görüldü ($p=0,0016$). 24sa Ebselen 9 (0.750 ± 0.068) ile 24sa SCI (0.436 ± 0.021) grupları karşılaştırıldığında Ebselen 9 grubunda anlamlı FPN düzeyi artışı olduğu görüldü ($p=0,010$). 24sa Ebselen 27 (1.360 ± 0.030) ile 24sa SCI (0.436 ± 0.021) grupları karşılaştırıldığında Ebselen 27 grubunda anlamlı FPN düzeyi artışı olduğu görüldü ($p=0,0001$).

24sa Ebselen ve 24sa Ebselen 9 grubu karşılaştırılmasında 24sa Ebselen grubunda artış olsa da istatistiksel olarak FPN düzeylerinde anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,065$). 24sa Ebselen ile 24sa Ebselen 27 karşılaştırıldığında Ebselen 27 lehine FPN düzeylerinde ciddi artış görüldü ($p=0,003$). 24sa Ebselen 9 ile 24sa Ebselen 27 karşılaştırılmasında Ebselen 27 lehine anlamlı artış olduğu görüldü ($p=0,0007$).

72sa Ebselen (0.957 ± 0.030) ile 72sa SCI (1.425 ± 0.066) grupları karşılaştırıldığında her iki grup için FPN düzeyleri istatistiksel anlamlı saptanmadı ($p=0,15$). 72sa Ebselen 9 (0.285 ± 0.022) ile 72sa SCI (1.425 ± 0.066) grupları karşılaştırıldığında 72sa SCI grubunda anlamlı FPN düzeyi artışı olduğu görüldü ($p=0,006$). 72sa Ebselen 27 (2.804 ± 0.258) ile 72sa SCI (1.425 ± 0.066) grupları karşılaştırıldığında Ebselen 27 grubunda anlamlı FPN düzeyi artışı olduğu görüldü ($p=0,003$).

72sa Ebselen ve 72sa Ebselen 9 grubu karşılaştırılmasında 72sa Ebselen grubunda sınırdan anlamlı artış olduğu görüldü($p=0,045$). 72sa Ebselen ile 72sa Ebselen 27 karşılaştırıldığında 72sa Ebselen 27 lehine FPN düzeylerinde ciddi artış görüldü($p=0,0009$). 72sa Ebselen 9 ile 72sa Ebselen 27 karşılaştırılmasında Ebselen 27 lehine anlamlı artış olduğu görüldü($p=0,00028$).

Bu veriler ışığında ilk 24 saatte Ebselen ve türevleri hücre içi demir düzeyinin regülasyonunda rol oynamıştır ancak Ebselen 27 bunu daha etkin yapmıştır. 72 saatte ise Ebselen ve Ebselen 9 etkilerini devam ettirememiştir. Ebselen 27 ise FPN düzeylerini artırma etkisini devam ettirmiştir.

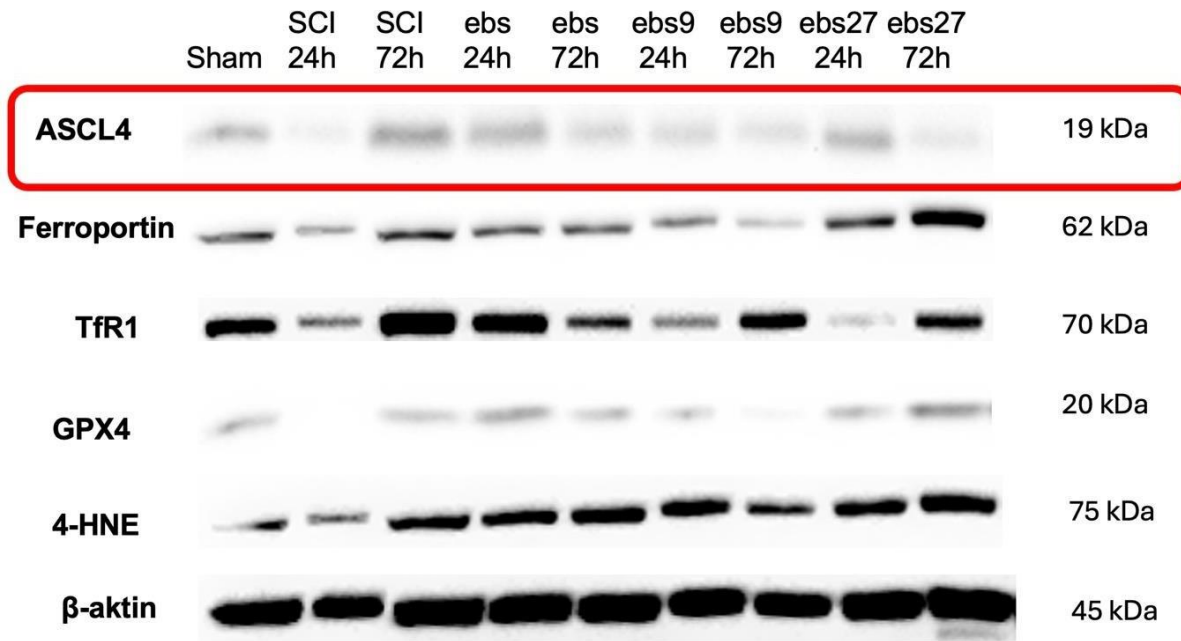


Şekil-36: FPN seviyelerinin çapraz analizleri ; * $p<0.05$; 24sa Ebselen vs. 24sa SCI; ^Δ $p<0.05$; Ebselen 27 tüm grupları vs. SCI tüm gruplar; # $p<0.05$ 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI

11.1.8. ACSL4 Düzeyi Ölçümleri

ACSL4 enzimi CoA'yı spesifik çoklu doymamış yağ asitlerine, özellikle araşidonik asit (AA) ve adrenik asite bağlar. Bu sayede ACSL4, ferroptoz ve yağ asidi metabolizmasında

merkezi rol oynar. ACSL4 düzeylerinin baskılanması yağ asidi metabolizması ve ferroptoz baskılanacaktır.



Şekil-37: ACSL4 ölçümleri elektroforez görüntüsü

ACSL4 seviyelerine yönelik analizler bu çerçevede değerlendirilmiş ve elde edilen dansitometrik veriler sham grubu ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Bu değerlendirme, ACSL4 seviyelerindeki değişikliklerin ferroptoz süreci ile bağlantısını anlamak amacıyla yapılmıştır. Hasar grubunda ilk 24 saatte ACSL4 düzeyleri artmasa da 72 saat sonunda arttığı görüldü. Bu durum hasarla birlikte ferroptozun aktive olduğunu göstermektedir.

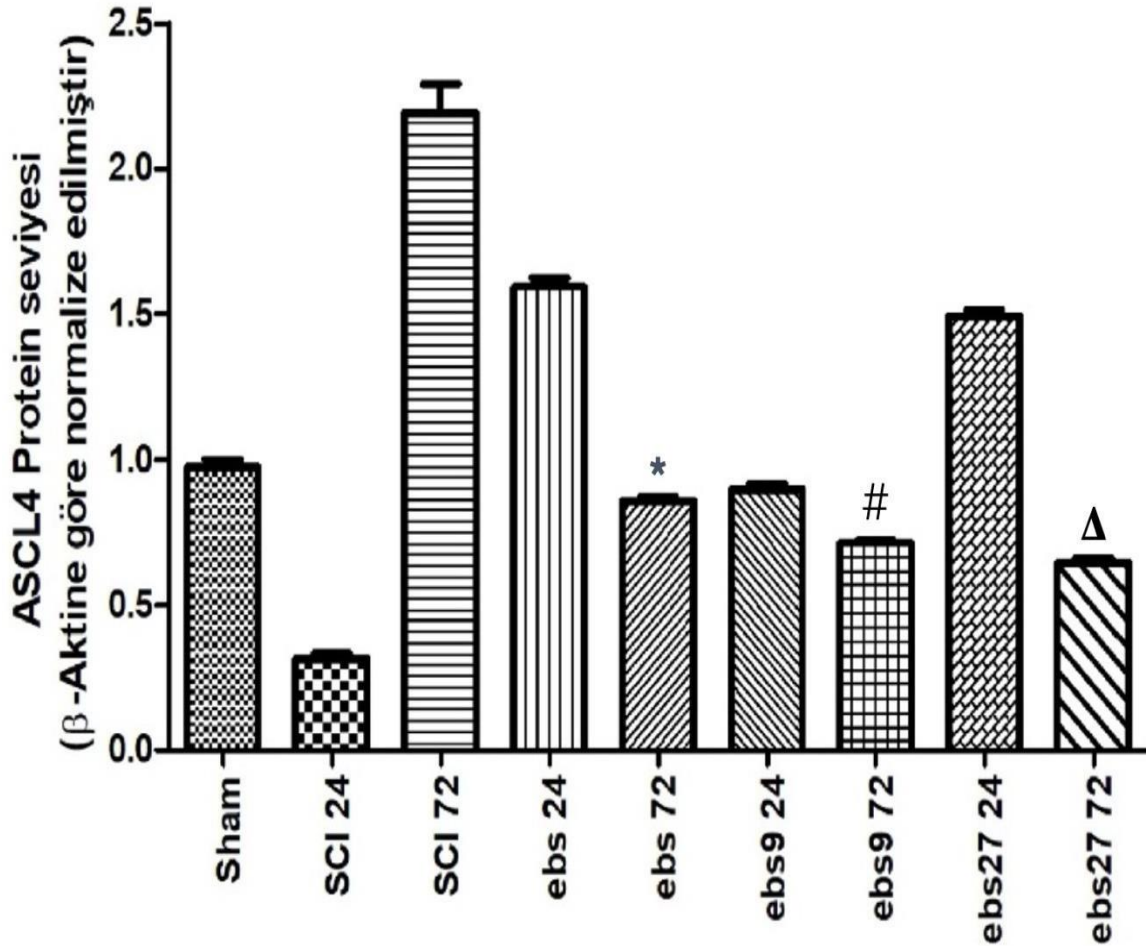
24sa Ebselen (1.592 ± 0.045) ve 24sa SCI (0.312 ± 0.027) grupları karşılaştırıldığında 24sa SCI lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görüldü ($p=0,00001$). 24sa Ebselen 9 (0.895 ± 0.031) ve 24sa SCI (0.312 ± 0.027) grupları karşılaştırıldığında 24sa SCI lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görülmüştür ($p=0,0003$). 24sa Ebselen 27 (1.492 ± 0.030) ve 24sa SCI (0.312 ± 0.027) grupları karşılaştırıldığında 24sa SCI lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görülmüştür ($p=0,00002$).

72sa Ebselen (0.855 ± 0.024) ve 72sa SCI (2.192 ± 0.141) grupları karşılaştırıldığında 72sa Ebselen lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görüldü ($p=0,0003$). 72sa Ebselen 9 (0.712 ± 0.014) ve 72sa SCI (2.192 ± 0.141) grupları karşılaştırıldığında 72sa Ebselen 9 lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görülmüştür ($p=0,0002$). 72sa Ebselen 27 (0.644 ± 0.021) ve 72sa SCI

(2.192 ± 0.141) grupları karşılaştırıldığında 72sa Ebselen 27 lehine ACSL4 düzeylerinde azalma görülmüştür($p=0,0002$).

72sa Ebselen ve 72sa Ebselen 9 grupları karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,72$). 72sa Ebselen ve 72sa Ebselen 27 grupları karşılaştırıldığında her iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı($p=0,26$). 72sa Ebselen 9 ve 72sa Ebselen 27 grupları karşılaştırıldığında her iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı($p=ns$).

Bu veriler değerlendirildiğinde Ebselen ve türevlerinin ACSL4 seviyelerini azaltma etkisi görülmemiştir. Azalma Ebselen ve türevlerinde 72 saatlik takiplerde belirgin olarak görülmüştür. 72 saatlik takiplerde üç bileşikte birbirine üstünlük sağlayamamıştır.



Şekil-38: ACSL4 ölçümleri Çapraz Analizleri; * $p<0.05$; 72sa Ebselen vs. 72sa SCI; $^{\Delta} p<0.05$; 72sa Ebselen 27 vs. 72sa SCI ; # $p<0.05$ 72sa Ebselen 9 vs. 72sa SCI.

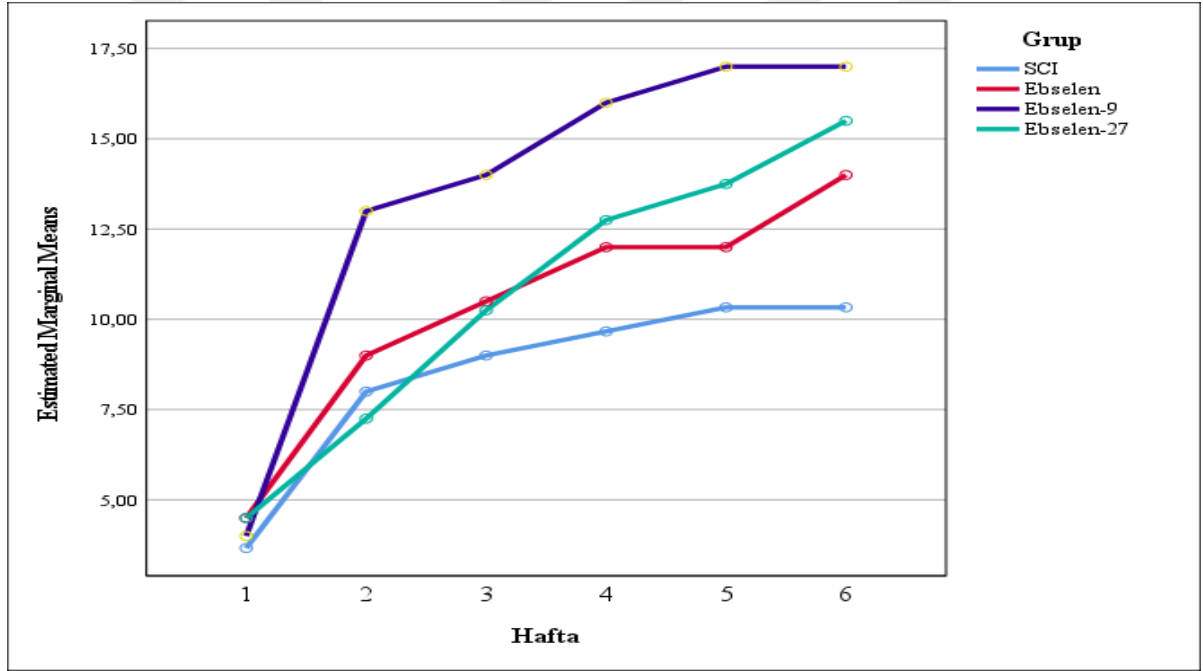
11.2 Fonksiyonel Sonuçlar

11.2.1 Basso Beattie Bresnahan (BBB) Lokomotor Değerlendirme Skalası Ölçümleri

BBB skoru ölçümleri iki farklı araştırmacı tarafından her hayvan için fikir birliğine varılarak analize dahil edildi.

Analizin ilk aşamasında, gruplar arası ayrıma gidilmeden deneydeki tüm hayvanlar havuzlanarak altı haftalık takip süresi içerisindeki fonksiyonel skorlardan elde edilen değerler zaman ekseninde değerlendirildi.

Bu değerlendirme sonucunda çalışma evreninde haftalar içerisindeki değişimin anlamlı olmadığı sonucunda varıldı ($p=0.601$).



Şekil-39: BB Skor Analizlerinin Haftalara Göre Değişimi

6 haftalık takipte Ebselen ve türevlerinin skor olarak SCI gruplarına göre iyileşme gösterdiği görüldü ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi($p=0.601$).

12. TARTIŞMA

Omurilik yaralanması günümüz şartlarında tedavisi zor ve maliyetli bir sorundur. Günümüzde sık sık çalışılmasına rağmen tedavi aşamasına geçebilen ilaç sayısı kısıtlıdır.

Omurilik yaralanmasında primer ve sekonder hasar fazlarının anlaşılması tedavi stratejilerini yönetmektedir. Primer hasar fazı oluşan mekanizmanın şiddetine bağlıdır ve değiştirilemez. Ancak primer fazın tetiklediği sekonder fazda etkinleşen yolakları hedefleyen ajanlar sayesinde kontrollü hücre ölümü engellenerek tedaviye yön verilmeye çalışılmaktadır. Tanımlanmış yollara etki eden yeni moleküllerin veya bu moleküllerin benzerlerinin, aynı yolda etkisi kanıtlanmış önceki moleküllerle karşılaştırılması, en etkili tedavi yöntemini bulmada kritik bir rol oynar. Çalışmamızda omurilik hasarının sekonder hasar aşamasında etkinliği gösterilmiş bir molekül olan Ebselen'in ferroptoz parametreleri ile omurilik hasarındaki etkisini biyokimyasal ve fonksiyonel olarak göstermek amaçlanmıştır.

Omurilik hasarı tedavisinde geliştirilecek yeni tedavi seçenekleri klinik aşamaya geçmeden önce prelinik aşamalarda etkinliğini göstermelidir. Diğer bir deyişle insan deneylerinden önce in-vitro hücre kültürü çalışmaları ve in-vivo hayvan deneyi aşamalarını geçmesi gerekmektedir. Bu nedenle çalışmamızda Landgraf ve ark(116). tarafından üretilip in-vitro hücre kültüründe çalışılarak en iyi nöroprotektif etki gösteren Ebselen 9 ve 27 molekülleri hayvan deneyinde kullanılması önerilmesi üzerine tarafımızca çalışılmıştır.

12.1 Ebselen ve Omurilik Yaralanması

Ebselen olarak bilinen 2-Fenilbenzo[d][1,2]-selenazol-3(2H)-on, bileşiği güçlü bir elektrofil ve GPX aktivitesini taklit ederek aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Malecki ve ark(150). 2000 yılında ferroptoz henüz tanımlanmamışken 4-HNE'nin omurilik hasarında sekonder fazda toksik etkilerinden korunması için hücre kültüründe Ebselen denemişler ve koruyucu bulmuşlardır. Bu çalışma Ebselen'in lipid peroksidasyonu engelleyerek antioksidan etkisini gösterdiğini hücre düzeyde göstermiş ancak diğer kontrollü ölüm yollarından bahsedilmemiştir. Çalışmamızda Ebselen'in 4-HNE ve MDA seviyelerinde istatistiksel anlamlı fark görülmedi ve Ebselen türevlerinde kısmı baskılanma görülmüştür.

Kalaycı ve ark(127). 2005 yılında omurilik hasarı hayvan modelinde Ebselen'in nöroprotektif özelliklerini göstermek amacıyla metilprednizolon ile karşılaştırmışlardır. Ebselen'in MDA seviyelerini düşürdüğünü ve antioksidan enzim seviyelerini koruduğunu belirtmişlerdir. Metilprednizolon ile istatistiksel anlamlı etki görülmemiştir. Çalışmamızda Ebselen'in MDA seviyelerine etkili olduğu gösterildi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.

Dixon ve ark(63). ferroptozu tanımladığı çalışmalarında Ebselen'i GPX4 mimetiği olarak tanımlayarak ferroptozu inhibe eden kontrol bileşiği olarak tanımlamışlardır. Çalışmamızda Ebselen ilk 24 saatte GPX4 seviyelerini etkin şekilde artırmıştır.

Jia ve ark(142) yaptığı çalışmada, Ebselen'in akut omurilik yaralanması sonrası mitokondriyal fonksiyonları ve oksidatif stresi koruyucu etkileri incelenmiştir. Araştırmada, Ebselen'in glutatyon (GSH) düzeylerini ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesini artırarak mitokondriyal fonksiyonları koruduğu vurgulanmıştır. Sıçanların 7 ve 14 günlük Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) skorlarında anlamlı iyileşmeler gözlemlenmiş, bu da fonksiyonel düzelmenin göstergesi olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda Ebselen'in GSH seviyelerini her iki zaman diliminde artırdığı gösterilmiştir. Biyokimyasal verilerimiz Jia ve ark. verileri ile paraleldir ancak çalışmamızda fonksiyonel skorlarda fark bulunmamıştır.

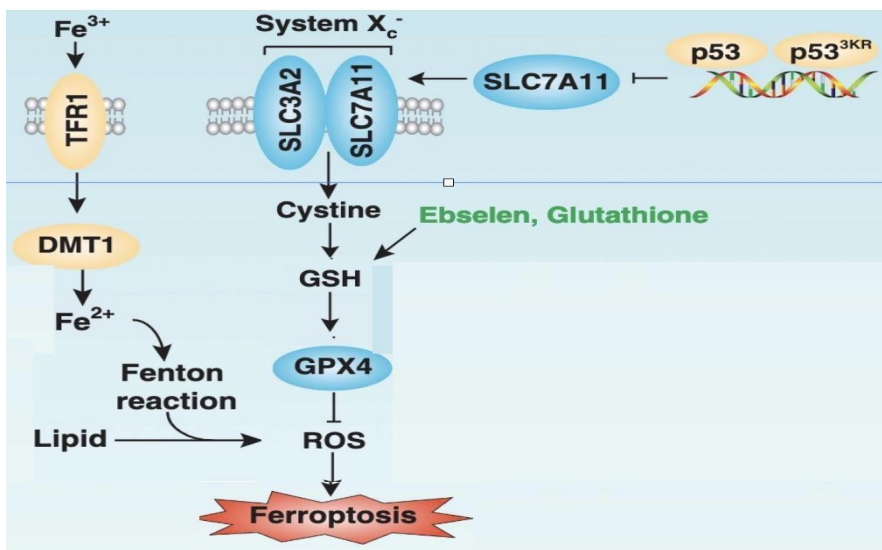
Çalışma, Ebselen'in mitokondriyal oksidatif hasarı önlediğini ve apoptozu inhibe ettiğini ortaya koyarken, uzun dönem sonuçların eksikliği dikkat çekmektedir. Ayrıca, ferroptoz mekanizmasına dair herhangi bir değerlendirme yapılmamış, bu açıdan Ebselen'in olası ilişkisi araştırılmamıştır. Bu durum, gelecekteki çalışmalar için bir araştırma boşluğu olarak değerlendirilebilir.

Slusarczyk ve ark(151) 2019 yılında deneysel omurilik hasarı modelinde Ebselen'in uzun dönem sonuçlarını değerlendirmek için BBB, MRI görüntüleme ve histolojik değerlendirme yapmışlardır. 12 haftalık fonksiyonel değerlendirmede genel motor fonksiyonlarda (BBB ölçeği) anlamlı bir fark gözlenmemiş. Ebselen grubunda histolojik değerlendirmede omurilikteki lezyon uzunluğu daha kısa saptanmıştır. Ebselen'in omurilik yaralanmasında sınırlı olumlu etkileri olduğunu, ancak optimal doz ve uygulama zamanı için daha fazla araştırma gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızdaki fonksiyonel skorlarımız bu çalışma ile paraleldir.

Ebselen'in ferroptotik etkisini inceleyen deneysel omurilik yaralanması çalışması bulunmamaktadır ancak Ebselen'in ferroptoz etkilerini 2021 yılında Naime ve ark(126) HT22 nöron hücre kültüründe Ebselen dahil birkaç ferroptoz inhibitörü ajanı 0., 6. ve 12. Saate uygulayarak lipid preoksidasyonu ve GSH seviyelerini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında Ebselen'in anti-ferroptotik etkisini göstermişlerdir ancak in-vitro çalışma olması nedeniyle in-vivo çalışma ile mekanizmaların aydınlatılması gerektiğine vurgu yapmışlardır. Aynı yıl Tuo ve ark(152) N27 nöron hücre modeli ve fare serebral iskemi-reperfüzyon modelinde Ebselen ve diğer organik selenyum bileşiklerinin anti-ferroptotik etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu

çalışma Ebselen'in GPX4 üzerinden hücre içi selenyum salınımı yapmadan ferroptozu baskıladığını ancak bu etkisini yüksek dozlarda gösterdiğini göstermişlerdir. Ayrıca yüksek dozlarda toksik etkilerinin gözlemlendiğine değinmişlerdir. Bu iki çalışma değerlendirildiğinde çalışmamızda Ebselen'in antiferroptotik etkisini değerlendirmektedir. İn-vivo bir çalışma olması ve uzun takip süreleri içermesi yönünden bu alanda ilk çalışma olacaktır. Çalışmamızda Ebselen'in 24 saatlik periyotta GPX4 ve GSH seviyelerini arttırdığı ancak 72 saatlik periyotta bunu devam ettiremediğini gösterdik. Bu açıdan çalışmamızda Tuo ve ark. verilerine paralellik göstermekte ve daha uzun takip süreleri içermektedir.

Zhang ve ark(153) subaraknoid kanamayı takip eden erken beyin hasarı hayvan modelinde Ebselen'in DMT1 inhibisyonu ve lipid peroksidasyonunu engelleyerek ferroptozu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Biz de çalışmamızda Ebselen'in Fe^{+2} ve TfR-1 düzeylerini azalttığını göstererek ferroptoz inhibisyonunu gösterdik. Demirin hücre içine alınmasında TfR1 ile yapılmakta olup DMT1 hücre içine alınan demiri $+2$ değerlikli duruma getirerek lipid peroksidasyonu için uygun olan fenton reaksiyonuna yol açmaktadır. Bizim çalışmamızda Ebselen'in TfR1 baskılanması oluşturduğunu bunu en iyi 72 saate oluşturduğunu gösterdik. Aynı zamanda GSH ve GPX4 seviyelerini koruduğunu gösterdik. Zhang ve ark. ölçümlerini 24 saatlik takip sonrasında yapmışlardır. Bu nedenle verilerimiz Zhang ve ark. verileri ile kısmen paraleldir. Ebselen'in GSH ve GPX4 seviyelerini artırdığı gösterdik ancak demir metabolizmasına etkilerini en iyi 72 saate göstermektedir. Zhang ve ark. Ebselen'in FPN üzerine direkt etkisinden bahsetmemişlerdir. Ebselen'in etkileri daha çok demir birikimini azaltması, lipid peroksidasyonunu azaltması ve DMT1 inhibisyonu üzerinden açıklanmıştır.



Şekil-40 : Ebselen'in Ferroptozda etkin olduğu basamaklar

2024 yılında Chen ve ark(154) etanol ilişkili karaciğer hasarında Ebselen'in ferroptoz ve apoptozdaki etkisine değinmişlerdir. Ebselen'in GPX4 ekspresyonunu artırdığını ve demir seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Çalışmamızda da Ebselen için benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ancak Chen ve arkadaşları MDA seviyelerinin Ebselen ile azaldığını belirtmektedirler ancak çalışmamızda lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA ve 4-HNE düzeylerinde hasar grubuna göre baskılanma olmamıştır. Bu açıdan bakıldığında Ebselen'in baskın özelliği olarak GPX4 düzeyini artırıp, ACSL4 ekspresyonunu ve Fe⁺² düzeylerini azaltarak işlev gösterdiği düşünülebilir.

Çalışmalar Ebselen'in ferroptoz ile ilişkisini DMT1 inhibisyonu üzerinde ele almıştır. Ancak çalışmamızda Ebselen'in TfR1 ekspresyonunu baskıladığını ve ferroportin seviyelerini artırdığını gösterdik. Ayrıca Ebselen etkilerini 72 saatte baskın olarak göstermiştir. Bu nedenle Ebselen'in ferroptozdaki etkisi sadece DMT1 üzerinden değil de ferroptoz yolğını birçok basamağından etki etmektedir.

12.2 Ebselen ve Türevlerinin Omurilik Hasarındaki Etkileri

Azad ve ark.(155) Ebselen'in biyolojik yollardaki etkisini ve antioksidan özelliklerini incelemişlerdir. Ebselen'in mitokondri üzerindeki toksik etkileri, DNA üzerinde hasar verici etkilerinden bahsetmişlerdir. Bu toksik etkiler nedeniyle daha az toksik türevlerin geliştirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Landgraf ve ark(116). Ebselen türevlerinin nöroprotektif ve anti-nöroinflamatuvar özelliklerini araştırmaktadır. Kendi laboratuvarlarında ürettikleri Ebselen türevlerini in-vitro insan nöroblastoma SH-SY5Y hücreleri ve insan mikrogliya HMC3 hücrelerinde OGD/R modelinde GPX aktivitesi ve nöroinflamasyonu açısından değerlendirdiler. Bu bileşiklerden Ebselen 9 ve 27'nin % 80 üstünde hücre canlılığı sağladığını göstermişlerdir. Bu bileşiklerin biyoyararlanımı iyi ve kan-beyin bariyerini geçtikleri gösterilmiştir. Bu bileşiklerin in-vivo ortamda çalışılmasını önermişlerdir.

Ebselen 9 ve 27'nin nöroprotektif etkisini ilginç bir şekilde GPX üzerinden olmadığını belirtmişlerdir. Bizde çalışmamızda Ebselen 9 ve 27 ilk 24 saatte GPX artırımını Ebselen kadar göstermediğini belirttik ancak Ebselen 27 GPX4 artırımını Ebselen'e göre 72. Saatte daha iyi yapmıştır. Çalışmamızda GSH seviyeleri karşılaştırıldığında Ebselen 9'un Ebselen ve Ebselen

27 'ye üstün olduğu görülmüştür. Bu verilerle bakıldığında Landgraf ve ark. verileri ile kısmi benzer özellikte olup Ebselen kadar GPX4 ve GSH üzerinde etkili olmamışlardır.

Ebselen 9 ve 27'nin ferroptozda etkin olduğunu gösteren bir çalışma yoktur. Fe^{+2} seviyeleri açısından Ebselen 9 ve 27 Ebselen'e göre 24 saatlik periyotta üstünlükleri mevcuttur. Ebselen ilk 24 saatlik periyotta etkili olamamış ama bu fark 72 saatte ortadan kalmıştır. Bu nedenle Ebselen türevlerinin etki başlangıcının hızlı olduğu çıkarımı yapabiliriz. FPN düzeylerinin artırılması açısından Mukem ve ark(156) in-vitro SH-SY5Y insan nöroblastoma hücrelerinde çalışmışlardır ve çalışmada Ebselen'in FPN ekspresyonunu artırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda Ebselen 27'nin FPN düzeylerinde en büyük artışı ve TfR1 düzeylerinde en iyi baskılanmayı sağlamıştır. Fe^{+2} düzeylerinde de etkili olduğu düşünüldüğünde Ebselen 27'nin daha iyi bir ferroptoz inhibitörü olduğu çıkarımı yapılabilir.

Lipit peroksidasyonu yan ürünleri açısından değerlendirildiğinde Marecki ve ark(157). Ebselen'in hücre kültüründe 4-HNE seviyelerini düşürdüğünü göstermişlerdir. Çalışmamızda Ebselen 24 ve 72 saatlik periyotta 4-HNE seviyelerini düşürememiştir ancak Ebselen 9, 72 saatlik periyotta 4-HNE seviyelerinde istatistiksel anlamlı düşme göstermiştir.

Kalaycı ve ark(127). Ebselen ve Metilprednizolonu karşılaştırdıkları çalışmalarında 24 saat takip ettikleri hayvanlarda MDA seviyelerinde Ebselen grubunda baskılanma görmüşlerdir. Çalışmamızda Ebselen'in MDA seviyelerini baskılamış bunu 72 saatlik periyotta yapmış ancak istatistiksel anlamlı bir sonuç bulamadık. Bu açıdan kalaycı ve ark. çalışmaları ile verilerimiz çelişmektedir. Ebselen 9 ve 27'nin verilerine bakıldığında Ebselen 9, Ebselen ile benzer sonuçlar gösterirken, Ebselen 27, MDA seviyelerinde her iki zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı baskılanma sağlamıştır. Ebselen, MDA ve 4-HNE düzeylerini anlamlı şekilde düşürememiş en majör etkisini GSH ve GPX4 üzerinden göstermiştir. Ebselen 9 ve 27 MDA ve 4-HNE seviyelerini kısmen baskılamıştır. Bu açıdan Ebselen'e üstünlükleri vardır.

Ebselen 9 ve 27'nin lipit peroksidasyon ürünleri açısından değerlendirmesinde sonuçları Ebselen'e göre daha iyi baskılanma sağlamıştır. Ancak ileride yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Landgraf ve ark(116). Ebselen 9'un etkilerini Ebselen'den farklı olarak azid grubu içermesine bağlamışlardır. Azid grubu içeren ilaçların düşük toksisite gösterdiği gösterilmiştir. Ebselen 9 için azid grubu içermesi Landgraf ve ark. belirttiği gibi toksisiteyi düşürmüş olabilir. Ayrıca Ebselen 9 GPX4 ve GSH seviyelerini Ebselen kadar artıramamış ancak MDA seviyelerini baskılayabilmiştir. GPx benzeri aktivitesinin düşük olması, koruyucu etkisinin

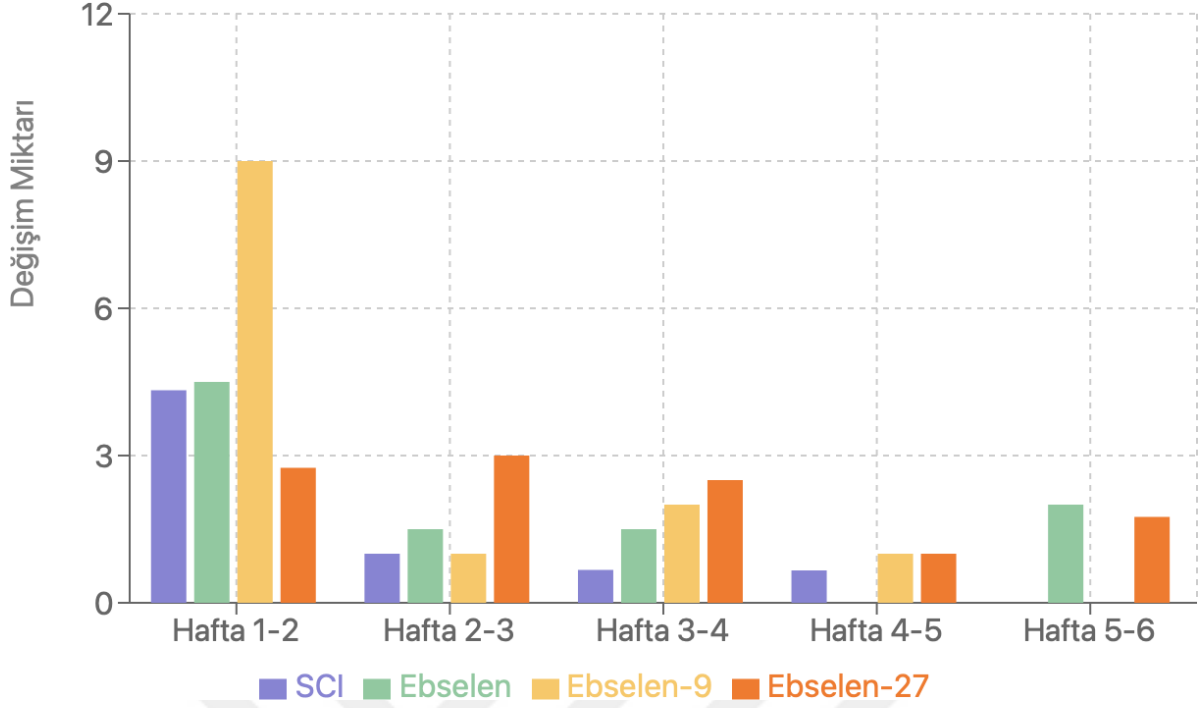
klasik antioksidan mekanizmalardan farklı olduğunu göstermektedir. Bu veriler Ebselen 9 için Landgraf ve ark. verileri ile paraleldir. Ebselen 27 ve Ebselen'in moleküler yapısı incelendiğinde Ebselen 27 ekstra furan halkası göze çarpmaktadır. Bu molekülün toksisitesini etkileyebilir. Çalışmamızda Ebselen 27'nin GPX4 benzeri aktivitesi Ebselen kadar iyi, demir metabolizmasına etkisi ve lipid peroksidasyonunu inhibe edici etkisi Ebselen'den iyi olduğu gösterilmiştir. Bu veriler birden fazla yolak ile ferroptoz baskılanmasında etkin olduğunu göstermektedir.

ACSL4, ferroptoz yolağında poliansatüre yağ asitlerinin sentezinden sorumlu anahtar enzimdir. Bu yağ asitleri, lipid peroksidasyonuna duyarlı karbon-karbon çift bağları içerir ve ferroptoz için gereklidir. Ferroptozun temel belirteçlerinden ACSL4 seviyeleri açısından Chen ve ark(158) in-vitro ve in-vivo karaciğer dokusunda Ebselen'in ACSL4 seviyelerini baskılayarak ferroptozu baskıladığını göstermişlerdir. Çalışmamızda Ebselen'in ilk 24 saatte baskılamayı sağlamasa da 72 saatte baskılama sağlamıştır. Ebselen türevleri de Ebselen'e benzer özellik göstermişlerdir. Ebselen'den daha iyi baskılama yapsalar da istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamız in-vivo olarak ACSL4 seviyelerinin değerlendirildiği öncü çalışmadır. Aynı zamanda 24 ve 72 saatlik takipleri de içermesi açısından değerlidir.

12.3. Fonksiyonel Skorların Değerlendirilmesi

Çalışma sonuçları fonksiyonel iyileşme parametreleri üzerinden değerlendirildiğinde, tekrarlayan ANOVA analizleri ile bütüncül olarak karşılaştırma şeklinde ele alındığında Ebselen ve türevleri için *zaman ve grup arasındaki etkileşim* de anlamlı değil ($p=0.635$). Bu, farklı grupların zaman içindeki değişim eğilimlerinin benzer olduğu anlamına gelir. **SCI grubu** genellikle daha düşük başlangıç değerlerine sahip, ancak zamanla artış gösteriyor. **Ebselen grubu** başlangıçta daha yüksek ortalama değerlere sahip ve artış eğilimi gösteriyor. **Ebselen-9** grubunda sadece bir katılımcı olduğu için bu grup hakkında yorum yapmak istatistiksel olarak sınırlı. **Ebselen-27** grubu daha büyük bir örneklemle çalışmış ve genellikle yüksek standart sapmalara sahip, bu da grup içinde yüksek bir değişkenlik olduğunu gösteriyor.

Jia ve ark(142). 7 ve 14 günlük takiplerde omurilik hasarı modelinde Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) skorlarında anlamlı iyileşmeler gözlemlenmiş, bu da fonksiyonel düzelmenin göstergesi olarak belirtilmiştir. Çalışmamızda birinci hafta ile diğer haftaları karşılaştırdığımızda Ebselen ve türevleri daha yüksek skorlara sahip olsa da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı.



Şekil-41: BBB skorlarının haftalık değişimi

Slusarczyk ve ark(151) 2019 yılında deneysel omurilik hasarı modelinde Ebselen'in uzun dönem sonuçlarını değerlendirmek için BBB, MRI görüntüleme ve histolojik değerlendirme yapmışlardır. 12 haftalık fonksiyonel değerlendirmede genel motor fonksiyonlarda (BBB ölçeği) anlamlı bir fark gözlenmemiş. Çalışmamızda 6 haftalık takiplerde Ebselen ve türevleri sayısal olarak daha yüksek değerlere sahip görünse de bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışmamızın verileri Slusarczyk ve arkadaşlarının verileri ile paraleldir.

12.4 Sınırlılıklar

Çalışmamızda histolojik incelemeye yer verilmemiştir. Gerek 3 gruplu zamanlarda hayvan takibi yapılacak şekilde planlamamız gerek ekip gerek maliyet planlamamız göz önüne alınarak biyokimyasal ve fonksiyonel sonuçlar üzerine yoğunlaşmıştır.

Ferroptoz ilişkili olduğu bilinen genler olan IREB2, ACSF2 gibi genlerin ekspresyonunun RT-PCR yöntemiyle tayin edilmesi, araştırma konusu modelde ferroptotik yolağın katkısı hakkında objektif veriler sunabilmektedir. Araştırmamızda hem ekip hem de bütçe kısıtlılıkları sebebiyle gen ekspresyonu çalışmalarına yer verilememiştir.

Ayrıca sadece ferroptoz yolağı değerlendirilmiştir. Birçok yolak etki ettiği patolojik süreçlerin tek yolak üzerinden değerlendirilmesi verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır.

13. SONUÇ

Ebselen molekülünün, omurilik hasarı modelinde ferroptozu baskılayarak etki demir metabolizması ve GPX4 benzeri aktiviteyi artırarak anti ferroptotik etki göstermektedir. Ancak ferroptotik etki biyokimyasal olarak gösterilse de fonksiyonel skorlara bu yansımamıştır.

Ebselen 9 ve 27 molekülü ile, anti ferroptotik etki açısından Ebselen'den daha iyi biyokimyasal parametreler elde edilmiştir. Özellikle Ebselen 27 hem lipid peroksidasyonu inhibisyonu hem de GPX4 benzeri aktivite artışı ile etki göstermiştir. Bu açıdan birden fazla yolak üzerinden etki etmesi açısından Ebselen'e üstündür.

Ferroptoz yolağı, umut vaaden bir yolak olmasına rağmen omurilik yaralanmasında hala çalışmalar devam etmektedir. Sekonder hücre ölümünün önemli bir değişken olduğu omurilik yaralanmasında, sekonder hasar mekanizmalarını etkin ve güvenli bir şekilde baskılamayı başaran terapötik ajanlar gelecekte kurgulanacak klinik araştırmalara konu edilebilecektir.

14. Proje Bütçe Desteği

Bu çalışma için Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü'nden Genel Araştırma Proje Bütçe Desteği alınmıştır. (TGA-2021-23305)

15. Referanslar

1. Riva M; Bianchetti A; Bossoni G; Giudici L; Tarantino P; Usardi M,. Pharmacological studies on zidometacin, a novel anti-inflammatory compound. Drugs Exp. Clin. Res 1981, 7 (5), 617-631.
2. Khan YS, Lui F. Neuroanatomy, Spinal Cord. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [a.yer 30 Haziran 2024]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559056/>
3. Akbarnia BA, Yazici M, Thompson GH, editörler. The Growing Spine: Management of Spinal Disorders in Young Children [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [a.yer 30 Haziran 2024]. Erişim adresi: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-85207-0>
4. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The Developing Human.

5. Dalley AF, Agur AMR, Moore KL. Moore's clinically oriented anatomy. Ninth edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2023. 1 s.
6. Cramer GD, Darby SA, Cramer GD. Clinical anatomy of the spine, spinal cord, and ANS. 3rd ed. St. Louis, Mo: Elsevier; 2014. 672 s.
7. Mirjalili SA, McFadden SL, Buckenham T, Stringer MD. Vertebral levels of key landmarks in the neck. Clin Anat [Internet]. Ekim 2012 [a.yer 30 Haziran 2024];25(7):851-7. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ca.22124>
8. Coventry MB. Anatomy of the intervertebral disk. Clin Orthop. 1969;67:9-15.
9. Crock HV, Yoshizawa H. The Blood Supply of the Lumbar Vertebral Column. Clin Orthop Relat Res 1976-2007 [Internet]. Nisan 1976 [a.yer 08 Temmuz 2024];115:6. Erişim adresi: https://journals.lww.com/corr/citation/1976/03000/the_blood_supply_of_the_lumbar_vertebral_column_3.aspx
10. Standring S, Gray H, editörler. Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice. Forty-second edition. Amsterdam: Elsevier; 2021. 1588 s.
11. Adigun OO, Reddy V, Varacallo M. Anatomy, Back, Spinal Cord. İçinde: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [a.yer 08 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK537004/>
12. www.elsevier.com [Internet]. [a.yer 09 Temmuz 2024]. Gray's Anatomy | Elsevier. Erişim adresi: <https://www.elsevier.com/books-and-journals/book-series/grays-anatomy>
13. Petkó M, Antal M. Propriospinal pathways in the dorsal horn (laminae I-IV) of the rat lumbar spinal cord. Brain Res Bull. 01 Ekim 2012;89(1-2):41-9.
14. Parent A, Carpenter M 1996 Carpenter's Human Neuroanatomy. Baltimore: Williams & Wilkins.
15. Cho TA. Spinal Cord Functional Anatomy. 2015;
16. Sinescu C, Popa F, Grigorean VT, Onose G, Sandu AM, Popescu M, vd. Molecular basis of vascular events following spinal cord injury. 2010;3(3).
17. Spinal cord injury [Internet]. [a.yer 12 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/spinal-cord-injury>
18. Zhang Y, Al Mamun A, Yuan Y, Lu Q, Xiong J, Yang S, vd. Acute spinal cord injury: Pathophysiology and pharmacological intervention (Review). Mol Med Rep [Internet]. 31 Mart 2021 [a.yer 11 Temmuz 2024];23(6):417. Erişim adresi: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mmr.2021.12056>
19. Anjum A, Yazid MD, Fauzi Daud M, Idris J, Ng AMH, Selvi Naicker A, vd. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. Int J Mol Sci. 13 Ekim 2020;21(20):7533.
20. Khorasanizadeh M, Yousefifard M, Eskian M, Lu Y, Chalangari M, Harrop JS, vd. Neurological recovery following traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. J Neurosurg Spine. 15 Şubat 2019;30(5):683-99.

21. GBD 2016 Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury Collaborators. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol*. Ocak 2019;18(1):56-87.
22. Incidence of traumatic spinal cord injury in Italy during 2013-2014: a population-based study - PubMed [Internet]. [a.yer 12 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28872148/>
23. Spinal cord injuries--epidemiology in Portugal's central region - PubMed [Internet]. [a.yer 12 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9713927/>
24. Kondakov EN, Simonova IA, Poliakov IV. [The epidemiology of injuries to the spine and spinal cord in Saint Petersburg]. *Zh Vopr Neirokhir Im N N Burdenko*. 2002;(2):50-2; discussion 52-53.
25. Rajendram R, Preedy VR, editörler. *Diagnosis and treatment of spinal cord injury: the neuroscience of spinal cord injury*. London: Academic Press, an imprint of Elsevier; 2022. 598 s.
26. Hagen EM, Rekand T, Gilhus NE, Grønning M. Traumatic spinal cord injuries--incidence, mechanisms and course. *Tidsskr Den Nor Laegeforening Tidsskr Prakt Med Ny Raekke*. 17 Nisan 2012;132(7):831-7.
27. Barbiellini Amidei C, Salmaso L, Bellio S, Saia M. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: a large population-based study. *Spinal Cord* [Internet]. Eylül 2022 [a.yer 12 Temmuz 2024];60(9):812-9. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/s41393-022-00795-w>
28. Cameron A. Current Surgical Therapy.
29. Rupp R, Biering-Sørensen F, Burns SP, Graves DE, Guest J, Jones L, vd. International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury. *Top Spinal Cord Inj Rehabil* [Internet]. 01 Mart 2021 [a.yer 13 Temmuz 2024];27(2):1-22. Erişim adresi: <https://meridian.allenpress.com/tscir/article/27/2/1/465525/International-Standards-for-Neurological>
30. The International Standards for Neurological Classification of Spinal Cord Injury: reliability of data when applied to children and youths - PubMed [Internet]. [a.yer 14 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17016490/>
31. Couillard-Despres S, Bieler L, Vogl M. Pathophysiology of Traumatic Spinal Cord Injury. İçinde: Weidner N, Rupp R, Tansey KE, editörler. *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [a.yer 14 Temmuz 2024]. s. 503-28. Erişim adresi: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46293-6_19
32. Weidner N, Rupp R, Tansey KE, editörler. *Neurological Aspects of Spinal Cord Injury* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2017 [a.yer 14 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-46293-6>
33. Spinal-cord injury - PubMed [Internet]. [a.yer 20 Temmuz 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11844532/>
34. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* [Internet]. Şubat 2019 [a.yer 20 Temmuz 2024].

- 2024];145:230-46. Erişim adresi:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0028390818304714>
35. ROSENBLUM WI. Histopathologic Clues to the Pathways of Neuronal Death Following Ischemia/Hypoxia. *J Neurotrauma* [Internet]. Mayıs 1997 [a.yer 21 Temmuz 2024];14(5):313-26. Erişim adresi:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/neu.1997.14.313>
36. Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, Morehouse CN, Fixel JA, Hanna AS. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J Neuroinflammation* [Internet]. 07 Aralık 2021 [a.yer 21 Temmuz 2024];18(1):284. Erişim adresi:
<https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-021-02337-2>
37. McAdoo DJ, Hughes MG, Nie L, Shah B, Clifton C, Fullwood S, vd. The effect of glutamate receptor blockers on glutamate release following spinal cord injury. Lack of evidence for an ongoing feedback cascade of damage → glutamate release → damage → glutamate release → etc. *Brain Res* [Internet]. Mart 2005 [a.yer 21 Temmuz 2024];1038(1):92-9. Erişim adresi:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899305000727>
38. Ma M. Role of calpains in the injury-induced dysfunction and degeneration of the mammalian axon. *Neurobiol Dis*. Aralık 2013;60:61-79.
39. Park E, Velumian AA, Fehlings MG. The role of excitotoxicity in secondary mechanisms of spinal cord injury: a review with an emphasis on the implications for white matter degeneration. *J Neurotrauma*. Haziran 2004;21(6):754-74.
40. Lu J, Ashwell KW, Waite P. Advances in secondary spinal cord injury: role of apoptosis. *Spine*. 15 Temmuz 2000;25(14):1859-66.
41. Duchen MR. Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J*. 01 Nisan 1992;283 (Pt 1)(Pt 1):41-50.
42. Slater PG, Domínguez-Romero ME, Villarreal M, Eisner V, Larraín J. Mitochondrial function in spinal cord injury and regeneration. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. Mayıs 2022 [a.yer 23 Temmuz 2024];79(5):239. Erişim adresi:
<https://link.springer.com/10.1007/s00018-022-04261-x>
43. Hall ED. Antioxidant Therapies for Acute Spinal Cord Injury. *Neurotherapeutics* [Internet]. Nisan 2011 [a.yer 05 Ağustos 2024];8(2):152-67. Erişim adresi:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878747923015301>
44. Alizadeh A, Dyck SM, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic Spinal Cord Injury: An Overview of Pathophysiology, Models and Acute Injury Mechanisms. *Front Neurol* [Internet]. 22 Mart 2019 [a.yer 15 Temmuz 2024];10:282. Erişim adresi:
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fneur.2019.00282/full>
45. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev*. Mart 2001;53(1):135-59.
46. Zhang B, Gensel JC. Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain? Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord. *Exp Neurol*. Ağustos 2014;258:112-20.

47. Brennan FH, Gordon R, Lao HW, Biggins PJ, Taylor SM, Franklin RJM, vd. The Complement Receptor C5aR Controls Acute Inflammation and Astrogliosis following Spinal Cord Injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 22 Nisan 2015;35(16):6517-31.
48. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. Şubat 2008;209(2):378-88.
49. Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved - PubMed [Internet]. [a.yer 16 Eylül 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17111361/>
50. Bartholdi D, Schwab ME. Expression of pro-inflammatory cytokine and chemokine mRNA upon experimental spinal cord injury in mouse: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci*. Temmuz 1997;9(7):1422-38.
51. Mataliotakis GI, Tsirikos AI. Spinal cord trauma: pathophysiology, classification of spinal cord injury syndromes, treatment principles and controversies. *Orthop Trauma* [Internet]. 01 Ekim 2016 [a.yer 18 Eylül 2024];30(5):440-9. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1877132716300860>
52. Hellenbrand DJ, Quinn CM, Piper ZJ, Morehouse CN, Fixel JA, Hanna AS. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration. *J Neuroinflammation* [Internet]. 07 Aralık 2021 [a.yer 21 Temmuz 2024];18(1):284. Erişim adresi: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-021-02337-2>
53. Williams PR, Marincu BN, Sorbara CD, Mahler CF, Schumacher AM, Griesbeck O, vd. A recoverable state of axon injury persists for hours after spinal cord contusion in vivo. *Nat Commun*. 16 Aralık 2014;5:5683.
54. Karimi-Abdolrezaee S, Billakanti R. Reactive astrogliosis after spinal cord injury- beneficial and detrimental effects. *Mol Neurobiol*. Ekim 2012;46(2):251-64.
55. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 03 Mart 2004;24(9):2143-55.
56. Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin of spinal cord scar tissue. *Science*. 08 Temmuz 2011;333(6039):238-42.
57. Krebs J, Koch HG, Hartmann K, Frotzler A. The characteristics of posttraumatic syringomyelia. *Spinal Cord* [Internet]. Haziran 2016 [a.yer 21 Eylül 2024];54(6):463-6. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/sc2015218>
58. Walters BC, Hadley MN, Hurlbert RJ, Aarabi B, Dhall SS, Gelb DE, vd. Guidelines for the Management of Acute Cervical Spine and Spinal Cord Injuries: 2013 Update. *Clin Neurosurg*. 2013;60.
59. O'Toole JE, Kaiser MG, Anderson PA, Arnold PM, Chi JH, Dailey AT, vd. Congress of Neurological Surgeons Systematic Review and Evidence-Based Guidelines on the Evaluation and Treatment of Patients with Thoracolumbar Spine Trauma: Executive Summary. *Neurosurgery* [Internet]. Ocak 2019 [a.yer 22 Eylül 2024];84(1):2-6. Erişim adresi: <https://journals.lww.com/00006123-201901000-00001>

60. Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, W. Cadotte D, Harrop JS, vd. Early versus Delayed Decompression for Traumatic Cervical Spinal Cord Injury: Results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). PLoS ONE [Internet]. 23 Şubat 2012 [a.yer 25 Eylül 2024];7(2):e32037. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3285644/>
61. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, Holford TR, Young W, Baskin DS, vd. 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. 17 Mayıs 1990;322(20):1405-11.
62. Emerging therapies for acute traumatic spinal cord injury - PubMed [Internet]. [a.yer 25 Eylül 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23228995/>
63. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, vd. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. Cell [Internet]. 25 Mayıs 2012 [a.yer 30 Eylül 2024];149(5):1060-72. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3367386/>
64. Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. Haziran 2024 [a.yer 30 Eylül 2024];25(6):424-42. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/s41580-024-00703-5>
65. Li J, Cao F, Yin H liang, Huang Z jian, Lin Z tao, Mao N, vd. Ferroptosis: past, present and future. Cell Death Dis [Internet]. 03 Şubat 2020 [a.yer 30 Eylül 2024];11(2):88. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6997353/>
66. Gao M, Monian P, Quadri N, Ramasamy R, Jiang X. Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. Mol Cell. 16 Temmuz 2015;59(2):298-308.
67. Yang WS, Stockwell BR. Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. Trends Cell Biol. Mart 2016;26(3):165-76.
68. Ve K, G M, F Q, Jp A, S D, Cs C, vd. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. Nat Chem Biol [Internet]. Ocak 2017 [a.yer 04 Ekim 2024];13(1). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27842066/>
69. Jiang L, Hickman JH, Wang SJ, Gu W. Dynamic roles of p53-mediated metabolic activities in ROS-induced stress responses. Cell Cycle Georget Tex. 2015;14(18):2881-5.
70. Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology, and role in disease. Nat Rev Mol Cell Biol [Internet]. Nisan 2021 [a.yer 30 Eylül 2024];22(4):266-82. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8142022/>
71. Skonieczna M, Cieslar-Pobuda A, Saenko Y, Foksinski M, Olinski R, Rzeszowska-Wolny J, vd. The Impact of DIDS-Induced Inhibition of Voltage-Dependent Anion Channels (VDAC) on Cellular Response of Lymphoblastoid Cells to Ionizing Radiation. Med Chem Shariqah United Arab Emir. 2017;13(5):477-83.
72. Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, Bauer AJ, Yang WS, Fridman DJ, vd. RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. Nature. 14 Haziran 2007;447(7146):864-8.
73. Jiang L, Kon N, Li T, Wang SJ, Su T, Hibshoosh H, vd. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression. Nature. 02 Nisan 2015;520(7545):57-62.

74. A T, L M, Kt BR, Y L, J Y, Ld A, vd. p53 Suppresses Metabolic Stress-Induced Ferroptosis in Cancer Cells. *Cell Rep* [Internet]. 16 Ocak 2018 [a.yer 06 Ekim 2024];22(3). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29346757/>
75. S D, Fp F, R S, M A, Mc da S, I I, vd. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature* [Internet]. Kasım 2019 [a.yer 06 Ekim 2024];575(7784). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31634899/>
76. Gao W, Wang X, Zhou Y, Wang X, Yu Y. Autophagy, ferroptosis, pyroptosis, and necroptosis in tumor immunotherapy. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 20 Haziran 2022 [a.yer 08 Ekim 2024];7:196. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9208265/>
77. Eling N, Reuter L, Hazin J, Hamacher-Brady A, Brady NR. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells. *Oncoscience*. 2015;2(5):517-32.
78. Louandre C, Marcq I, Bouhlal H, Lachaier E, Godin C, Saidak Z, vd. The retinoblastoma (Rb) protein regulates ferroptosis induced by sorafenib in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* [Internet]. 28 Ocak 2015 [a.yer 08 Ekim 2024];356(2, Part B):971-7. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304383514006703>
79. Ou W, Mulik RS, Anwar A, McDonald JG, He X, Corbin IR. Low-Density Lipoprotein Docosaheptaenoic Acid Nanoparticles Induce Ferroptotic Cell Death in Hepatocellular Carcinoma. *Free Radic Biol Med* [Internet]. Kasım 2017 [a.yer 08 Ekim 2024];112:597-607. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5848495/>
80. Hao S, Yu J, He W, Huang Q, Zhao Y, Liang B, vd. Cysteine Dioxygenase 1 Mediates Erastin-Induced Ferroptosis in Human Gastric Cancer Cells. *Neoplasia N Y N* [Internet]. 13 Kasım 2017 [a.yer 08 Ekim 2024];19(12):1022-32. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5686465/>
81. Miess H, Dankworth B, Gouw AM, Rosenfeldt M, Schmitz W, Jiang M, vd. The glutathione redox system is essential to prevent ferroptosis caused by impaired lipid metabolism in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* [Internet]. 04 Ekim 2018 [a.yer 08 Ekim 2024];37(40):5435-50. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6173300/>
82. Hasegawa M, Takahashi H, Rajabi H, Alam M, Suzuki Y, Yin L, vd. Functional interactions of the cystine/glutamate antiporter, CD44v and MUC1-C oncoprotein in triple-negative breast cancer cells. *Oncotarget* [Internet]. 22 Şubat 2016 [a.yer 08 Ekim 2024];7(11):11756-69. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4914246/>
83. Alvarez SW, Sviderskiy VO, Terzi EM, Papagiannakopoulos T, Moreira AL, Adams S, vd. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis. *Nature* [Internet]. 30 Kasım 2017 [a.yer 08 Ekim 2024];551(7682):639-43. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5808442/>
84. Belavgeni A, Bornstein SR, von Mässenhausen A, Tonnus W, Stumpf J, Meyer C, vd. Exquisite sensitivity of adrenocortical carcinomas to induction of ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 29 Ekim 2019 [a.yer 08 Ekim 2024];116(44):22269-74. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6825277/>

85. Raven EP, Lu PH, Tishler TA, Heydari P, Bartzokis G. Increased Iron Levels and Decreased Tissue Integrity in Hippocampus of Alzheimer's Disease Detected in vivo with Magnetic Resonance Imaging. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 01 Ocak 2013 [a.yer 08 Ekim 2024];37(1):127-36. Erişim adresi: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad130209>
86. Lane DJR, Ayton S, Bush AI. Iron and Alzheimer's Disease: An Update on Emerging Mechanisms. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 01 Ocak 2018 [a.yer 08 Ekim 2024];64(s1):S379-95. Erişim adresi: <https://content.iospress.com/articles/journal-of-alzheimers-disease/jad179944>
87. Hambright WS, Fonseca RS, Chen L, Na R, Ran Q. Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox Biol* [Internet]. 01 şubat 2017 [a.yer 08 Ekim 2024];12:8-17. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5312549/>
88. Ayton S, Lei P. Nigral Iron Elevation Is an Invariable Feature of Parkinson's Disease and Is a Sufficient Cause of Neurodegeneration. *BioMed Res Int* [Internet]. 2014 [a.yer 08 Ekim 2024];2014:581256. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914334/>
89. Do Van B, Gouel F, Jonneaux A, Timmerman K, Gelé P, Pétrault M, vd. Ferroptosis, a newly characterized form of cell death in Parkinson's disease that is regulated by PKC. *Neurobiol Dis* [Internet]. 01 Ekim 2016 [a.yer 08 Ekim 2024];94:169-78. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096999611630105X>
90. Agrawal S, Fox J, Thyagarajan B, Fox J. Brain mitochondrial iron accumulates in Huntington's disease, mediates mitochondrial dysfunction, and can be removed pharmacologically. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 20 Mayıs 2018 [a.yer 08 Ekim 2024];120:317-29. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5940499/>
91. Kwan JY, Jeong SY, Van Gelderen P, Deng HX, Quezado MM, Danielian LE, vd. Iron Accumulation in Deep Cortical Layers Accounts for MRI Signal Abnormalities in ALS: Correlating 7 Tesla MRI and Pathology. *PLoS ONE* [Internet]. 17 Nisan 2012 [a.yer 08 Ekim 2024];7(4):e35241. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3328441/>
92. Codazzi F, Hu A, Rai M, Donatello S, Salerno Scarzella F, Mangiameli E, vd. Friedreich ataxia-induced pluripotent stem cell-derived neurons show a cellular phenotype that is corrected by a benzamide HDAC inhibitor. *Hum Mol Genet* [Internet]. 15 Kasım 2016 [a.yer 08 Ekim 2024];25(22):4847-55. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw308>
93. Dietrich RB, Bradley WG. Iron accumulation in the basal ganglia following severe ischemic-anoxic insults in children. *Radiology* [Internet]. Temmuz 1988 [a.yer 08 Ekim 2024];168(1):203-6. Erişim adresi: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiology.168.1.3380958>
94. Ahmad S, Elsherbiny NM, Haque R, Khan MB, Ishrat T, Shah ZA, vd. Sesamin attenuates neurotoxicity in mouse model of ischemic brain stroke. *NeuroToxicology* [Internet]. 01 Aralık 2014 [a.yer 08 Ekim 2024];45:100-10. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161813X14001703>
95. Karuppagounder SS, Alin L, Chen Y, Brand D, Bourassa MW, Dietrich K, vd. N-acetylcysteine targets 5 lipoxygenase-derived, toxic lipids and can synergize with

- prostaglandin E2 to inhibit ferroptosis and improve outcomes following hemorrhagic stroke in mice. *Ann Neurol* [Internet]. Aralık 2018 [a.yer 08 Ekim 2024];84(6):854-72. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6519209/>
96. Geng Z, Guo Z, Guo R, Ye R, Zhu W, Yan B. Ferroptosis and traumatic brain injury. *Brain Res Bull* [Internet]. 01 Temmuz 2021 [a.yer 08 Ekim 2024];172:212-9. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S036192302100126X>
97. Xie B, Wang Y, Lin Y, Mao Q, Feng J, Gao G, vd. Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice. *CNS Neurosci Ther* [Internet]. 28 Eylül 2018 [a.yer 08 Ekim 2024];25(4):465-75. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6488926/>
98. Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, Mulay SR, Dewitz C, De Zen F, vd. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 25 Kasım 2014 [a.yer 08 Ekim 2024];111(47):16836-41. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4250130/>
99. Shi Z, Yuan S, Shi L, Li J, Ning G, Kong X, vd. Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy. *Cell Prolif* [Internet]. 27 Ocak 2021 [a.yer 08 Ekim 2024];54(3):e12992. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7941236/>
100. Bai XY, Liu XL, Deng ZZ, Wei DM, Zhang D, Xi HL, vd. Ferroptosis is a new therapeutic target for spinal cord injury. *Front Neurosci* [Internet]. 14 Mart 2023 [a.yer 08 Ekim 2024];17:1136143. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10047267/>
101. Gong F, Ge T, Liu J, Xiao J, Wu X, Wang H, vd. Trehalose inhibits ferroptosis via NRF2/HO-1 pathway and promotes functional recovery in mice with spinal cord injury. *Aging* [Internet]. 10 Nisan 2022 [a.yer 09 Ekim 2024];14(7):3216-32. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9037257/>
102. Filippone A, Lanza M, Campolo M, Casili G, Paterniti I, Cuzzocrea S, vd. Protective effect of sodium propionate in A β 1-42 -induced neurotoxicity and spinal cord trauma. *Neuropharmacology* [Internet]. 01 Nisan 2020 [a.yer 09 Ekim 2024];166:107977. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0028390820300435>
103. Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 01 Mart 2019 [a.yer 09 Ekim 2024];133:144-52. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584918315934>
104. Santi C, Scimmi C, Sancineto L. Ebselen and Analogues: Pharmacological Properties and Synthetic Strategies for Their Preparation. *Molecules* [Internet]. 12 Temmuz 2021 [a.yer 09 Ekim 2024];26(14):4230. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8306772/>
105. F M, Sg R, Ip K, Bcw F, Fb C, FI R, vd. A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* [Internet]. Şubat 2019 [a.yer 12 Ekim 2024];109. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30521994/>
106. PubChem. Ebselen [Internet]. [a.yer 10 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3194>

107. Sies H. [35] Ebselen. İçinde: Methods in Enzymology [Internet]. Elsevier; 1995 [a.yer 09 Ekim 2024]. s. 341-2. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687995520376>
108. Lesser R, Weiß R. Über selenhaltige aromatische Verbindungen (VI). Berichte Dtsch Chem Ges B Ser [Internet]. 09 Temmuz 1924 [a.yer 10 Ekim 2024];57(7):1077-82. Erişim adresi: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cber.19240570703>
109. Sakurai T, Kanayama M, Shibata T, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, vd. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. Chem Res Toxicol. Eylül 2006;19(9):1196-204.
110. Ullrich V, Weber P, Meisch F, von Appen F. Ebselen-binding equilibria between plasma and target proteins. Biochem Pharmacol. 12 Temmuz 1996;52(1):15-9.
111. Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. Mol Biol Rep [Internet]. Ağustos 2014 [a.yer 12 Ekim 2024];41(8):4865-79. Erişim adresi: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3417-x>
112. R Z, H M, A H. Ebselen: a substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 25 Haziran 2002 [a.yer 10 Ekim 2024];99(13). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12070343/>
113. Y N, Q F, T K, K T, H O, T O, vd. Ebselen, a glutathione peroxidase mimetic seleno-organic compound, as a multifunctional antioxidant. Implication for inflammation-associated carcinogenesis. J Biol Chem [Internet]. 25 Ocak 2002 [a.yer 12 Ekim 2024];277(4). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11714717/>
114. Noguchi N, Yoshida Y, Kaneda H, Yamamoto Y, Niki E. Action of ebselen as an antioxidant against lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 07 Temmuz 1992;44(1):39-44.
115. Chew P, Yuen DYC, Stefanovic N, Pete J, Coughlan MT, Jandeleit-Dahm KA, vd. Antiatherosclerotic and renoprotective effects of ebselen in the diabetic apolipoprotein E/GPx1-double knockout mouse. Diabetes. Aralık 2010;59(12):3198-207.
116. Landgraf AD, Alseghiani AS, Alaqel S, Thanna S, Shah ZA, Sucheck SJ. Neuroprotective and anti-neuroinflammatory properties of ebselen derivatives and their potential to inhibit neurodegeneration. ACS Chem Neurosci [Internet]. 07 Ekim 2020 [a.yer 12 Ekim 2024];11(19):3008-16. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8628187/>
117. Porciúncula LO, Rocha JB, Boeck CR, Vendite D, Souza DO. Ebselen prevents excitotoxicity provoked by glutamate in rat cerebellar granule neurons. Neurosci Lett. 23 Şubat 2001;299(3):217-20.
118. He M, Xing S, Yang B, Zhao L, Hua H, Liang Z, vd. Ebselen attenuates oxidative DNA damage and enhances its repair activity in the thalamus after focal cortical infarction in hypertensive rats. Brain Res. 21 Kasım 2007;1181:83-92.
119. Singh N, Halliday AC, Thomas JM, Kuznetsova OV, Baldwin R, Woon ECY, vd. A safe lithium mimetic for bipolar disorder. Nat Commun. 2013;4:1332.
120. C H, E N, E M, Fj P, V H, Fj R. Some aspects of cardiac antioxidant defence: Ebselen (PZ 51) treatment increases glutathione peroxidase activity in the rat heart. Biochem Soc

Trans [Internet]. Aralık 1990 [a.yer 12 Ekim 2024];18(6). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2088859/>

121. Baljinnyam E, Hasebe N, Morihira M, Sumitomo K, Matsusaka T, Fujino T, vd. Oral pretreatment with ebselen enhances heat shock protein 72 expression and reduces myocardial infarct size. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens*. Kasım 2006;29(11):905-13.
122. Ardais AP, Santos FW, Nogueira CW. Ebselen attenuates cadmium-induced testicular damage in mice. *J Appl Toxicol JAT*. Nisan 2008;28(3):322-8.
123. B B, M PO, M S, S N, J M, C LC. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H⁺-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. *J Enzyme Inhib Med Chem* [Internet]. Haziran 2010 [a.yer 12 Ekim 2024];25(3). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20210698/>
124. Y X, W H, X S, Y Y, J H, X S, vd. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ* [Internet]. Mart 2016 [a.yer 04 Ekim 2024];23(3). Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26794443/>
125. Pivovarova NB, Andrews SB. Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J*. Eylül 2010;277(18):3622-36.
126. Naime AA, Barbosa FAR, Bueno DC, Curi Pedrosa R, Canto RFS, Colle D, vd. Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an in vitro study with classic and novel anti-ferroptotic compounds. *Free Radic Res* [Internet]. 02 Aralık 2021 [a.yer 14 Ekim 2024];55(11-12):1062-79. Erişim adresi: <https://doi.org/10.1080/10715762.2021.2017912>
127. Kalayci M, Coskun O, Cagavi F, Kanter M, Armutcu F, Gul S, vd. Neuroprotective Effects of Ebselen on Experimental Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res* [Internet]. Mart 2005 [a.yer 14 Ekim 2024];30(3):403-10. Erişim adresi: <http://link.springer.com/10.1007/s11064-005-2615-2>
128. Ślusarczyk W, Olakowska E, Larysz-Brysz M, Woszczycka-Korczyńska I, de Carrillo DG, Węglarz WP, vd. Use of ebselen as a neuroprotective agent in rat spinal cord subjected to traumatic injury. *Neural Regen Res* [Internet]. Temmuz 2019 [a.yer 14 Ekim 2024];14(7):1255-61. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6425832/>
129. Thanna S, Goins CM, Knudson SE, Slayden RA, Ronning DR, Sucheck SJ. Thermal and Photoinduced Copper-Promoted C-Se Bond Formation: Synthesis of 2-Alkyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-ones and Evaluation against *Mycobacterium tuberculosis*. *J Org Chem* [Internet]. 07 Nisan 2017 [a.yer 14 Ekim 2024];82(7):3844-54. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6143291/>
130. Martini F, Rosa SG, Klann IP, Fulco BCW, Carvalho FB, Rahmeier FL, vd. A multifunctional compound ebselen reverses memory impairment, apoptosis and oxidative stress in a mouse model of sporadic Alzheimer's disease. *J Psychiatr Res* [Internet]. 01 Şubat 2019 [a.yer 14 Ekim 2024];109:107-17. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022395618308951>
131. Matsushita M, Freigang S, Schneider C, Conrad M, Bornkamm GW, Kopf M. T cell lipid peroxidation induces ferroptosis and prevents immunity to infection. *J Exp Med* [Internet]. 06 Nisan 2015 [a.yer 14 Ekim 2024];212(4):555-68. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4387287/>

132. Cheng B, Zhong JP, Wu FX, Li GL, Ruan QX, Luo G, vd. Ebselen protects rat hearts against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Exp Ther Med* [Internet]. Şubat 2019 [a.yer 14 Ekim 2024];17(2):1412-9. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6327602/>
133. Seo JY, Lee CH, Cho JH, Choi JH, Yoo KY, Kim DW, vd. Neuroprotection of ebselen against ischemia/reperfusion injury involves GABA shunt enzymes. *J Neurol Sci* [Internet]. 15 Ekim 2009 [a.yer 14 Ekim 2024];285(1):88-94. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X09006340>
134. Sharif-Alhoseini M, Khormali M, Rezaei M, Safdarian M, Hajighadery A, Khalatbari MM, vd. Animal models of spinal cord injury: a systematic review. *Spinal Cord* [Internet]. Ağustos 2017 [a.yer 14 Ekim 2024];55(8):714-21. Erişim adresi: <https://www.nature.com/articles/sc2016187>
135. Lee DH, Lee JK. Animal models of axon regeneration after spinal cord injury. *Neurosci Bull* [Internet]. 28 Temmuz 2013 [a.yer 14 Ekim 2024];29(4):436-44. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920733/>
136. Charan J, Kantharia ND. How to calculate sample size in animal studies? *J Pharmacol Pharmacother* [Internet]. 2013 [a.yer 14 Ekim 2024];4(4):303-6. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826013/>
137. Lane MA, Fuller DD, White TE, Reier PJ. Respiratory neuroplasticity and cervical spinal cord injury: translational perspectives. *Trends Neurosci* [Internet]. Ekim 2008 [a.yer 14 Ekim 2024];31(10):538-47. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2577878/>
138. Abdullahi D, Annuar AA, Mohamad M, Aziz I, Sanusi J. Experimental spinal cord trauma: a review of mechanically induced spinal cord injury in rat models. *Rev Neurosci* [Internet]. 01 Ocak 2017 [a.yer 14 Ekim 2024];28(1):15-20. Erişim adresi: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/revneuro-2016-0050/html>
139. Jaumard NV, Leung J, Gokhale AJ, Guarino BB, Welch WC, Winkelstein BA. Relevant Anatomic and Morphological Measurements of the Rat Spine. *Spine*. 15 Ekim 2015;40(20):E1084-92.
140. Vahabi A, Öztürk AM. Conducting spinal cord injury model with clip compression in rodents: Pearls and pitfalls. *MethodsX* [Internet]. 26 Mayıs 2023 [a.yer 15 Ekim 2024];10:102231. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10251144/>
141. Takasago T, Peters EE, Graham DI, Masayasu H, Macrae IM. Neuroprotective efficacy of ebselen, an anti-oxidant with anti-inflammatory actions, in a rodent model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Br J Pharmacol*. Kasım 1997;122(6):1251-6.
142. Jia ZQ, Li SQ, Qiao WQ, Xu WZ, Xing JW, Liu JT, vd. Ebselen protects mitochondrial function and oxidative stress while inhibiting the mitochondrial apoptosis pathway after acute spinal cord injury. *Neurosci Lett*. 21 Haziran 2018;678:110-7.
143. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. Şubat 1995;12(1):1-21.
144. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell*

- Longev [Internet]. 2014 [a.yer 18 Ekim 2024];2014:1-31. Erişim adresi: <http://www.hindawi.com/journals/omcl/2014/360438/>
145. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis - PubMed [Internet]. [a.yer 18 Ekim 2024]. Erişim adresi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27842066/>
146. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. Anal Biochem [Internet]. 01 Mayıs 2017 [a.yer 18 Ekim 2024];524:13-30. Erişim adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269716303578>
147. Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4. Free Radic Biol Med [Internet]. Mayıs 2020 [a.yer 18 Ekim 2024];152:175-85. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584919324372>
148. Ding K, Liu C, Li L, Yang M, Jiang N, Luo S, vd. Acyl-CoA synthase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism. Chin Med J (Engl) [Internet]. 06 Temmuz 2023 [a.yer 18 Ekim 2024]; Erişim adresi: <https://journals.lww.com/10.1097/CM9.0000000000002533>
149. Rochette L, Dogon G, Rigal E, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Lipid Peroxidation and Iron Metabolism: Two Corner Stones in the Homeostasis Control of Ferroptosis. Int J Mol Sci [Internet]. 27 Aralık 2022 [a.yer 19 Ekim 2024];24(1):449. Erişim adresi: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/1/449>
150. Malecki A, Garrido R, Mattson MP, Hennig B, Toborek M. 4-Hydroxynonenal Induces Oxidative Stress and Death of Cultured Spinal Cord Neurons. J Neurochem [Internet]. 2000 [a.yer 31 Ekim 2024];74(6):2278-87. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.2000.0742278.x>
151. Slusarczyk W, Olakowska E, Larysz-Brysz M, Woszczycka-Korczyńska I, de Carrillo DG, Węglarz WP, vd. Use of ebselen as a neuroprotective agent in rat spinal cord subjected to traumatic injury. Neural Regen Res. Temmuz 2019;14(7):1255-61.
152. Tuo QZ, Masaldan S, Southon A, Mawal C, Ayton S, Bush AI, vd. Characterization of Selenium Compounds for Anti-ferroptotic Activity in Neuronal Cells and After Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury. Neurotherapeutics [Internet]. Ekim 2021 [a.yer 01 Kasım 2024];18(4):2682-91. Erişim adresi: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878747923007328>
153. Zhang H, Ostrowski R, Jiang D, Zhao Q, Liang Y, Che X, vd. Hecpidin Promoted Ferroptosis through Iron Metabolism which Is Associated with DMT1 Signaling Activation in Early Brain Injury following Subarachnoid Hemorrhage. Duris K, editör. Oxid Med Cell Longev [Internet]. Ocak 2021 [a.yer 01 Kasım 2024];2021(1):9800794. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2021/9800794>
154. Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, Chen F, Li Q, Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, Xu X, Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, vd. Selenium Attenuates Ethanol-induced Hepatocellular Injury by Regulating Ferroptosis and Apoptosis. Turk J Gastroenterol [Internet]. 14 Ekim 2024 [a.yer 01 Kasım 2024];35(10):778-86. Erişim adresi: <https://www.turkjgastroenterol.org/en/selenium-attenuates-ethanol-induced-hepatocellular-injury-by-regulating-ferroptosis-and-apoptosis-137266>

155. Azad GK, Tomar RS. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. *Mol Biol Rep* [Internet]. Ağustos 2014 [a.yer 11 Kasım 2024];41(8):4865-79. Erişim adresi: <http://link.springer.com/10.1007/s11033-014-3417-x>
156. Mukem S, Sayoh I, Maungchanburi S, Thongbuakaew T. Ebselen, Iron Uptake Inhibitor, Alleviates Iron Overload-Induced Senescence-Like Neuronal Cells SH-SY5Y via Suppressing the mTORC1 Signaling Pathway. Chan KW, editör. *Adv Pharmacol Pharm Sci* [Internet]. 12 Eylül 2023 [a.yer 11 Kasım 2024];2023:1-11. Erişim adresi: <https://www.hindawi.com/journals/aps/2023/6641347/>
157. Malecki A, Garrido R, Mattson MP, Hennig B, Toborek M. 4-Hydroxynonenal Induces Oxidative Stress and Death of Cultured Spinal Cord Neurons. *J Neurochem* [Internet]. 06 Haziran 2000 [a.yer 31 Ekim 2024];74(6):2278-87. Erişim adresi: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-4159.2000.0742278.x>
158. Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, Chen F, Li Q, Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, Xu X, Division of Gastroenterology, Seventh Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Shenzhen, China, vd. Selenium Attenuates Ethanol-induced Hepatocellular Injury by Regulating Ferroptosis and Apoptosis. *Turk J Gastroenterol* [Internet]. 14 Ekim 2024 [a.yer 14 Kasım 2024];35(10):778-86. Erişim adresi: <https://www.turkjgastroenterol.org/en/selenium-attenuates-ethanol-induced-hepatocellular-injury-by-regulating-ferroptosis-and-apoptosis-137266>

EK-1: Etik Kurul Onay Form

EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2021-047
KONU: Onay

28.07.2021

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“DENEYSEL OMURİLİK HASARI MODELİNDE ANTİOKSİDAN VE LİPİT PEROKSİDASYON İNHİBİTÖRLERİNİN KULLANIMININ İYİLEŞME ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Doç. Dr. Murat Öztürk EÜTF Ortopedi ve Travmatoloji AD
Dr. Bünyamin Kılıçlı EÜTF Ortopedi ve Travmatoloji AD
Dr Arman Vahabi EÜTF Ortopedi ve Travmatoloji AD
Doç Dr. Güliz Armagan EÜ Eczacılık Fakültesi Biyokimya AD
Op.Dr. Murat Sözbilen SBÜ Behçet Uz Hastanesi
Prof. Dr. Yiğit Uyanıkgil EÜTF Histoloji ve Embriyoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda her iki eşeyden 100 adet Sprague-Dawley sıçan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. N. Nükü KARABAY YAVAŞOĞLU
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. ~~Altun~~ YAVAŞOĞLU

Prof. Dr. Ayül ONAL

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. Figen KIRKPINAR

Prof. Dr. Haşmet ÇAĞIRGAN

Prof. Dr. Uğur KAYA

Prof. Dr. Okan BİLGE

Doç. Dr. Tayfun YOLDAŞ

Dr. Öğr. Üyesi Sumru SÖZER KARADAĞLI

Vet. Hek. F. Emrah SOYLU

Özcan NALBANTOĞLU

Melek Merve AŞŞAROĞLU

EK-2: Benzeşim Raporu

Bünyamin KILIÇLI

DR. BÜNYAMİN KILIÇLI-DENEYSEL OMURİLİK HASARI MODELİNDE ANTİOKSİDAN VE LİPİT PEROKSİDASYON İNHİ...

UZMANLIK TEZLERİ
UZMANLIK ÖĞRENCİLERİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Belge Ayrıntıları

Gönderi Kimliği
trn:oid::1:3086195390

Gönderi Tarihi
20 Kas 2024 09:53 GMT+3

İndirme Tarihi
20 Kas 2024 09:55 GMT+3

Dosya Adı
B_nyamin_KILI_LI-_TEZ.docx

Dosya Boyutu
392.2 KB

94 Sayfa

24.452 Sözcük

173.230 Karakter



Sayfa 1 of 101 - Kapak Sayfası

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3086195390



Sayfa 2 of 101 - Bütünlük Genel Bakış

Gönderi Kimliği trn:oid::1:3086195390

4% Genel Benzerlik

Her veri tabanı için çakışan kaynaklar da dâhil tüm eşleşmelerin kombine toplamı.

Rapordan Filtrelenen

Alıntılanan Metin

Ön Sıradaki Kaynaklar

3% İnternet kaynakları
2% Yayınlar
1% Gönderilen çalışmalar (Öğrenci Makaleleri)

Bütünlük Bayrakları

İnceleme için 1 Bütünlük Bayrağı

Değiştirilen Karakterler
26 sayfada 94 şüpheli karakter
Harfler başka bir alfabeden benzer karakterlerle değiştirilir.

Sistemimizin algoritmaları bir belgede, onu normal bir göndericiden ayırabilecek her türlü tutarsızlığı derinlemesine inceler. Tuhaf bir şey fark edersek incelemeniz için bayrak ekleriz.

Bir Bayrak mutlaka bir sorun olduğunu göstermez. Ancak daha fazla inceleme için dikkatinizi vermenizi öneririz.