



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA OLUŞTURULAN MEDULLA SPİNALİS TRAVMA
MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN
NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Meriç BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

ANKARA

2022



T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON
ANABİLİM DALI

**RATLARDA OLUŞTURULAN MEDULLA SPİNALİS TRAVMA
MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖNKOŞULLAMANIN
NÖROPROTEKTİF ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Meriç BAYRAM

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Fatma SARICAOĞLU

ANKARA

2022

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimiz süresince deneyim ve birikimiyle hepimize ışık olan, bana ve diğer asistan arkadaşlarıma desteğini hiç esirgemeyen, hem zor hem de güzel günlerimizde yanımda olan değerli bölüm başkanımız Prof. Dr. Meral KANBAK'a;

Uzmanlık eğitimim süresince tüm içtenlikleriyle yanımda olan, emeklerini esirgemeyen, her zaman ve var güçleriyle bana destek olan değerli tez hocam Prof. Dr. Fatma SARICAOĞLU ve yardımcı tez hocalarım Doç. Dr. Banu KILIÇASLAN ve Uzm. Dr. Sehend DEBBAĞ'a;

Tüm eğitimim boyunca; sadece kitap bilgisini değil, mesleki bilgi ve becerilerini, tecrübelerini de bizlere aktaran, bu sürecin sonunda iyi birer hekim olmamız için emek veren tüm değerli hocalarıma;

Beni bugünlere taşıyan, hayat yolunda ilerlerken hep elimden tutan, sevgilerini ve desteklerini her an arkamda hissettiğim aileme;

Tüm kalbiyle yanımda olduğunu bildiğim, Ozan Ali TAŞDEMİR'e;

Birlikte gülüp birlikte ağladığımız, birbirimize destek olmaktan hiç vazgeçmediğimiz asistan arkadaşlarıma;

Birlikte yıllarımızı geçirdiğimiz tüm Hacettepe Üniversitesi Hastanesi çalışanlarına;

Bugünlere gelmemde emeği olan herkese teşekkür ederim.

Meriç BAYRAM

HAZİRAN 2022

ÖZET

Ratlarda Oluşturulan Medulla Spinalis Travma Modelinde Uzak İskemik Önkoşullamanın Nöroprotektif Etkinliğinin Araştırılması Dr. Meriç BAYRAM, Hacettepe Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon ABD, Ankara 2022. Uzak iskemik önkoşullama (UİÖK), iskemi reperfüzyon (İ/R) hasarını önlemede, etkinliği kanıtlanmış yöntemlerdendir. Bu çalışmanın amacı; spinal kord travması (SKT) oluşturulan ratlarda, kan S100B düzeyleri ve histopatolojik görüntüler karşılaştırılarak UİÖK'nin nöroprotektif etkinliğinin ve UİÖK mekanizmasında bir triptofan metabolizması ürünü olan kinürenik asitin (KYNA) rolünün varlığının gösterilmesidir. Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A. Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 31 adet erkek Sprague-Dawley rat, 3 gruba ayrıldı. Tüm ratlar genel anestezi altında, yüzüstü pozisyonda tespit edildi ve T₅-T₁₂ seviyesinde orta hat insizyonu yapıldı. Grup I (*Sham*, n=9): Yalnızca insizyon uygulandıktan sonra hiçbir işlem yapılmadan cilt kapatıldı. Grup II (İ/R, n=11): Medulla spinalise 1 dk total iskemi sonrasında 1 saat reperfüzyon uygulandı. Grup III (UİÖK+İ/R, n=8): Sağ arka bacağa uygulanan 10'ar dakikalık 3 döngü UİÖK sonrası, medulla spinaliste İ/R oluşturuldu. Tüm gruplarda ratların anestezi süresi eşit tutuldu. İşlem sonrası 1. saatte biyokimyasal değerlendirme (S100B ve KYNA) için kan alındıktan sonra ratlar sakrifiye edildi ve histopatolojik değerlendirme için medulla spinalis doku örnekleri alındı. KYNA ve S100B seviyelerinin karşılaştırılması, sham ve İ/R grupları arasında anlamlı farklılıkların varlığını ortaya koydu (sırasıyla, p = 0,016 ve p = 0,022). Her iki karşılaştırmada da İ/R ve UİÖK+İ/R grupları için post hoc ikili karşılaştırmalar anlamlı olmamasına rağmen, UİÖK uygulanan ratlar, yalnızca İ/R grubuna kıyasla nispeten daha düşük KYNA ve S100B konsantrasyonlarına sahipti. Histolojik analizler, *sham* grubuna kıyasla hem İ/R hem de UİÖK+İ/R gruplarında önemli ölçüde daha yüksek beyaz ve gri cevher hasar skorlarını ortaya koydu (sırasıyla p = 0,001 ve p < 0,001). UİÖK+İ/R grubunda beyaz ve gri cevher ve içerdikleri bölgeler için medyan puanlar İ/R grubuna göre nispeten daha yüksek olmasına rağmen, ikili karşılaştırma ile sonuçların istatistiksel olarak benzer olduğu görüldü. KYNA konsantrasyonu, S100B konsantrasyonu ve histolojik skorlar arasında anlamlı bir korelasyon yoktu. Bu çalışma, S100B ve KYNA seviyelerinin ve nöronal hasar için histolojik skorların, bir rat spinal İ/R hasarı modelinde önemli ölçüde arttığını, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, S100B ve KYNA düzeylerinin UİÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha düşük olduğunu gösterdi. Histolojik değerlendirmede de, medulla spinalis hasar skoru UİÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha yüksekti. Veriler KYNA'nın UİÖK mekanizmasındaki rolüne ve UİÖK'nin nöroprotektif etkisine ilişkin sonuç çıkarmak için yetersizdi. Daha geniş metabolit analizi ile daha uzun süreli takip kullanan daha ileri çalışmaların KYNA'nın ve/veya kinürenin yolunun medulla spinalisin İ/R hasarı ile ilişkili olup olmadığını aydınlatmak için değerli olabileceğine inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Medulla spinalis, uzak iskemik önkoşullama, iskemi, reperfüzyon, S100B, KYNA

SUMMARY

Investigation Of The Neuroprotective Efficacy Of Remote Ischemic Preconditioning In A Rat Model Of Medulla Spinalis Trauma Dr. Meriç BAYRAM, Hacettepe University Faculty of Medicine Anesthesiology and Reanimation Department Ankara 2022. To investigate the neuroprotective effect of remote ischemic preconditioning (RIPC) and the role of kynurenic acid (KYNA), a product of tryptophan metabolism, in the mechanism of RIPC by comparing blood S100B levels and histopathological images in rats with spinal cord injury (SCI). Experimental animal study. 31 male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups. Group I (Sham, n=9): After making only an incision, the skin was closed without any procedure. Group II (I/R, n=11): After 1 min of total ischemia, reperfusion was applied to the spinal cord for 1 h. Group III (RIPC+I/R, n=8): After 3 cycles of 10-minute RIPC applied to the right hind leg, I/R was performed in the medulla spinalis. Blood was collected for biochemical evaluation (S100B and KYNA) at the 1st hour after the procedure. The rats were sacrificed, and medulla spinalis tissue samples were taken for histopathological evaluation. KYNA and S100B levels were significantly different between the sham and I/R groups ($p = 0.016$ and $p = 0.022$, respectively). Although post-hoc pairwise comparisons for the I/R and RIPC+I/R groups were not significant in either comparison, rats treated with RIPC had relatively lower concentrations of KYNA and S100B than in the I/R group alone. Histological analyses revealed significantly higher white and gray matter damage scores in both the I/R and RIPC+I/R groups than in the sham group ($p = 0.001$ and $p < 0.001$, respectively). Although the median scores for white and gray matter and the regions they contain were relatively higher in the RIPC+I/R group than in the I/R group, the results were statistically similar by pairwise comparison. There was no significant correlation between KYNA concentration, S100B concentration, and histological scores. This study showed that S100B and KYNA levels and histological scores for neuronal damage were significantly increased in a rat spinal I/R injury model, although not statistically significant. S100B and KYNA levels were lower in the RIPC+I/R group than in the I/R group. Histological evaluation revealed that, spinal cord injury score was higher in the RIPC+I/R group than in the I/R group.

Keywords: Medulla spinalis, remote ischemic preconditioning, ischemia, reperfusion, S100B, KYNA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xii
TABLOLAR LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi	3
2.2. Reperfüzyon	5
2.3. Medulla Spinalis İskemi Reperfüzyon Hasarı	8
2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Organ Sistemlerine Etkileri	9
2.5. İskemik Önkoşullama	10
2.6. Uzak İskemik Önkoşullama	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Anestezi Uygulaması	15
3.2. Deney Grupları ve Protokol	15
3.3. Deneysel Çalışma Modeli	15
3.4. Histopatolojik Değerlendirme	21
3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	24
3.6. İstatistiksel Değerlendirme	24
4. BULGULAR	26
4.1. Histopatolojik Parametreler	26
4.2. Biyokimyasal Parametreler	36
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Derece Santigrat
3OHKYN	: 3-Hidroksikinürenin
A.Ş.	: Anonim Şirketi
ATP	: Adenozin Trifosfat
BH2	: Dihidrobiopterin
BH4	: Tetrahidrobiopterin
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
Ca+2	: Kalsiyum
cm	: Santimetre
CV	: Varyasyon Katsayısı
DH	: Dorsal Boynuz
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
flk	: Flakon
g	: Gram
h	: Saat
H+	: Hidrojen
HIF	: Hipoksi ile İndüklenen Faktör
I/R	: Ischemia/Reperfusion
IDO	: İndolamin 2,3-Dioksijenaz
IFN-γ	: İnterferon Gamma
IL-1β	: İnterlökin-1 Beta
IMP	: İnozin Monofosfat
İ/R	: İskemi/Reperfüzyon
İÖK	: İskemik Önkoşullama
ip	: İntraperitoneal
K+	: Potasyum
KATs	: Kinürenin Amino Transferazlar

kg	: Kilogram
KMO	: Kinürenin 3-Monooksijenaz
KYN	: Kinürenin
KYNA	: Kinürenik Asit
KYNA	: Kynurenic Acid
mg	: Miligram
min	: Minute
ml	: Mililitre
MOF	: Çoklu Organ Yetmezliği
Na+	: Sodyum
NFκB	: Nükleer Faktör Kappa B
ng	: Nanogram
NMDA	: N-metil-D-aspartik Asit
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOX	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz
NSE	: Nöron Spesifik Enolaz
PAF	: Trombosit Aktive Edici Faktör
PHD2	: Prolil Hidroksilaz Domain 2
PKC	: Protein Kinaz C
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
QUIN	: Kinolinik Asit
RIPC	: Remote Ischemic Preconditioning
RNA	: Ribo Nükleik Asit
RNOS	: Reaktif Nitrojen Oksit Türleri
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROI	: Uzak Organ Hasarı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SCI	: Spinal Cord Injury
SERCA	: Sarko/Endoplazmik Retikulum Ca ⁺² -ATPaz
SKT	: Spinal Kord Travması
SOD	: Süperoksit Dismutaz

SSS	: Merkezi Sinir Sistemi
TF	: Endotelyal Doku Faktörü
TNFα	: Tümör Nekroz Faktörü Alfa
UIÖK	: Uzak İskemik Önkoşullama
VH	: Ventral Boynuz
VHL	: von Hippel Lindau
WM	: Beyaz Cevher
XO	: Ksantin Oksidaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Uzun süreli iskemiye ve ardından reperfüzyona maruz kalan bir dokunun aldığı toplam hasarın, iskemik bileşen ve reperfüzyon bileşeniyle ilişkilendirilmesi.	5
Şekil 2. İskemi-reperfüzyon hasarında ROS mekanizması.	7
Şekil 3. İskemik önkoşullamanın mekanizması.	11
Şekil 4. Hipoksi sırasında kinürenik asit oluşumunda yer alan yolların şematik gösterimi.	13
Şekil 5. Kinürenin yolu ve metabolitleri.	14
Şekil 6. Değerlendirilen kesitlerin aralıklarına ait şematik görüntü. Her medulla spinalis örneğinde 5 mikron aralıkla 3 kesit alındıktan sonra 75 mikron atılarak tekrar 3 kesit alındı ve bu şekilde ard arda 3 farklı kesit değerlendirildi.	23
Şekil 7. Sıçan medulla spinalis kesitinin bölümlerini gösteren diyagram. Lamina 1-6: Arka boynuz, Lamina 7: Ara gri cevher, Rexed'in laminası 8-9: Büyük motor nöronlarının bulunduğu ön boynuz bölgesini göstermektedir.	23
Şekil 8. Deney gruplarına ait örneklerin enine kesitlerinin ışık mikrografları.	26
Şekil 9. İnsizyon uygulanan grupta ventral, ventrolateral ve dorsal boynuzlar arasında kalan beyaz cevher alanı.	27
Şekil 10. İnsizyon uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanlarına ait ışık mikrografları.	28
Şekil 11. İnsizyon uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanlarına ait ışık mikrografları.	29
Şekil 12. Spinal kord travması uygulanan gruba ait örneğin ışık mikrografı.	30
Şekil 13. Spinal kord travması uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanına ait ışık mikrografları.	31

- Şekil 14.** Spinal kord travması uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) ait ışık mikrografları. 32
- Şekil 15.** İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral, ventrolateral ve dorsalde beyaz cevher alanı. 33
- Şekil 16.** İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral ve dorsalde gri ve beyaz cevher alanları. 33
- Şekil 17.** İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral ve dorsalde gri cevher alanları. 34
- Şekil 18.** Gruplar arası KYNA seviyelerinin karşılaştırılması. 38
- Şekil 19.** Gruplar arası S100B seviyelerinin karşılaştırılması. 38

RESİMLER LİSTESİ

	Sayfa
Resim 1. İşlem öncesinde ratların, genel anestezi altında, yüzüstü pozisyonda tespit edilmesi.	17
Resim 2. Deneklerin sırt bölgesindeki 3x2 cm'lik alan tıraş edildikten sonra povidon iyot ile lokal antisepsi sağlanması.	17
Resim 3. T ₅ -T ₁₂ seviyesinde yapılan orta hat insizyonu.	18
Resim 4. Cilt, cilt altı dokular ve paravertebral kas fasyası geçilerek kasların laterale künt disseksiyon ile sıyrılması.	19
Resim 5. Spinal kordun, standart travma amacıyla 63 g kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klibi (Aesculap FE 721 K) ile sıkıştırılması.	20
Resim 6. Ratın sağ arka bacağına kasık bölgesinden ince kauçuk lastik ile sıkılması ve 3 döngü halinde 10 dk iskemi oluşturulup, takiben 10 dk reperfüzyon sağlanması sonrasında kan akımının kesilmesi sebebiyle sağ arka bacakta gözlenen renk değişikliği.	21

TABLULAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1. Gri ve beyaz cevherde bölgelerin skorlaması	35
Tablo 2. Tüm bölgelerdeki histolojik hasar skorlarının, gruplar arası karşılaştırmalı özeti	35
Tablo 3. Gruplar arası KYNA ve S100B seviyelerinin karşılaştırılması	37

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi reperfüzyon (İ/R), doku veya organa giden kan akımında bir süre azalma sonrasında yeniden kanlanma olarak tanımlanır. Kan akımının tekrar başlaması (reperfüzyon) dokulara iskemik hasardan daha fazla zarar verebilir (1; 2). İ/R hasarı; miyokard infarktüsü, serebrovasküler infarkt, organ transplantasyonları, kardiyopulmoner resusitasyon, trombolitik tedavi ve hemorajik şok gibi birçok klinik durumda halen hastalar için yüksek morbidite ve mortalite nedenidir (3).

İskemik önkoşullama; tek veya tekrarlayan kısa süreli iskemik periyotların, daha uzun süreli iskemik periyotlarda gelişebilecek organ, doku veya hücre hasarına karşı belirgin bir direnç oluşturması ile gerçekleşen koruyucu bir mekanizmadır. Bir organ veya dokunun iskemi ve reperfüzyonu ile oluşturulan önkoşullama, başka bir arterin beslediği organ veya dokuyu da önkoşullayarak koruyucu etki gösterebilir. Bu durum da, uzak iskemik önkoşullama (UİÖK) olarak adlandırılmaktadır (4). UİÖK, ilk olarak 1993'te Przyklenk ve arkadaşları tarafından kalp üzerinde tanımlanmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda UİÖK'nin; kalp dışında karaciğer, bağırsak, pankreas, beyin ve akciğer dokularında da koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (6).

UİÖK'nin mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır (7). Ancak son zamanlarda yapılan deneysel gözlemler, oksijen algılayan enzim PHD2'nin hipoksik inhibisyonunun; alfa-ketoglutaratın artmış seviyelerine ve dolaşımdaki kinürenik asit (KYNA) miktarında artışlara yol açabileceğini, böylece UİÖK'ye büyük ölçüde aracılık edebileceğini göstermiştir (8).

Sheng Hu ve arkadaşları, elektif servikal dekompresyon cerrahisi uygulanan 40 hasta ile yaptıkları çalışmada, sağ kol aracılığıyla uygulanan UİÖK'nin, nörolojik komplikasyon insidansını anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir (9). Selimoğlu ve arkadaşları, 30 adet Sprague-Dawley cinsi rat ile yaptıkları çalışmada, sağ alt ekstremité aracılığıyla uygulanan UİÖK'nin, iskemik hasara karşı spinal kord koruması sağladığını göstermişlerdir (10).

Merkezi sinir sistemi (SSS)'nin yapısal proteinlerinden S100B, SSS doku hasarının spesifik biyobelirteci olarak sıkça kullanılmaktadır (11). Hasar sonrasında

bu proteinin hem kan, hem de beyin omurilik sıvısı (BOS)'ndaki konsantrasyonlarında artış beklenir (12).

Bu tez çalışmasında; spinal kord travması (SKT) oluşturulan ratlarda, kan S100B düzeyleri ve histopatolojik görüntüler karşılaştırılarak UIÖK'nin nöroprotektif etkinliğinin ve UIÖK mekanizmasında bir triptofan metabolizması ürünü olan KYNA'nın rolünün varlığının gösterilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

Travmatik omurilik yaralanması, hastalar ve bakım verenler için önemli sosyoekonomik etkileri olan, yaşamı değiştiren nörolojik bir durumdur. Hastaların motor kapasitelerinin iyileştirilmesi, modern çağda farmakolojik ve rehabilite edici müdahalelerin ana hedefi haline gelmiştir. Yıllar içindeki epidemiyolojik veriler, spinal kord hasarının öncelikle genç yetişkinleri etkilediğini göstermiştir. Bununla birlikte, son 30 yılda yaşlı hastaların oranı da önemli ölçüde artmıştır. Hasar ortalama yaşının 45 olduğu tahmin edilmektedir (13).

Torakoabdominal aort ve vertebra operasyonları, medulla spinaliste, pleji sebeplerinden biri olan iskemi-reperfüzyon hasarına neden olabilir (14; 15; 16). Spinal kord hasarında lezyonun yeri ve şiddeti, hastanın semptomlarını belirler. Kordda lezyon seviyesinin superiorundan innerve edilen yapılar genellikle fonksiyonel olarak sağlam kalırken, lezyon seviyesi veya inferiorundan innerve edilen yapılar potansiyel olarak etkilenir. Spinal kord hasarı sonrası görülebilen yaygın bulgu ve semptomlar; ateş, mental durum değişikliği, yorgunluk, dispne, diare, rektal kanama, hematüri, baş ağrısı, spastisite, omuz ağrısı, unilateral ekstremitte ödem, yeni gelişen motor veya duyuşsal kayıptır (17). Yapılan bir çalışmada; tüm yaş grupları için, hastaların %30,1'inde inkomplet tetrapleji, %25,6'sında komplet parapleji, %20,4'ünde komplet tetrapleji ve %18,5'inde inkomplet parapleji görüldüğü bildirilmiştir (13; 18).

2.1. İskemi

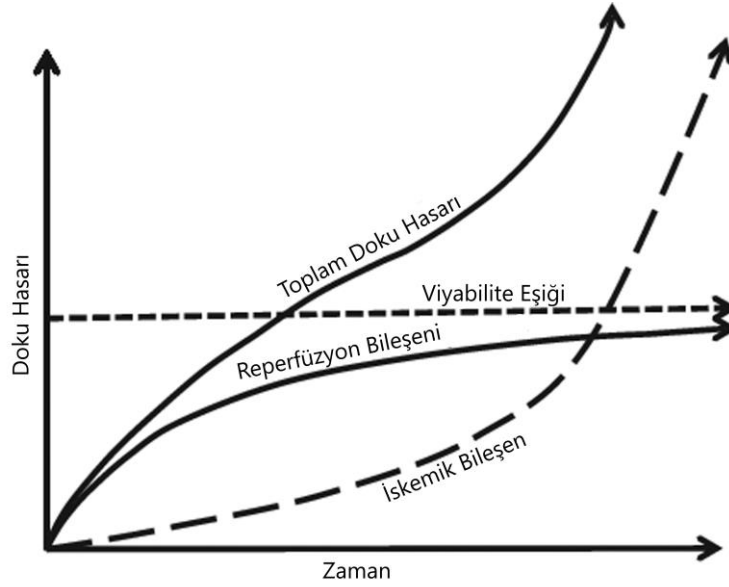
Hücresinin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan oksijenin hücre içi konsantrasyonundaki düşüş, hipoksi olarak adlandırılır. İskemi ise; hipoksinin, dokuya kan akışındaki kısıtlanmaya (hipoperfüzyon) bağlı olarak gerçekleşmesidir (19). Sepsis, akut koroner sendrom, organ transplantasyonu ve ekstremitte hasarı gibi pek çok durum doku hipoperfüzyonuna neden olabilir (20).

Dünya üzerinde, batıda görülen iskemik atakların büyük çoğunluğu tromboembolik veya arterotrombotik vazooklüziv hastalığa bağlıdır. Başlıca önlenemez risk faktörleri; ileri yaş, erkek cinsiyet ve genetik yatkınlıktır. Sigara kullanımı, hiperlipidemi, hipertansiyon, sedanter yaşam, obezite, metabolik sendrom

ve diabetes mellitus ise başlıca önlenbilir risk faktörlerindedir. Dahası; diyabetes mellitus, hiperlipidemi ve ileri yaş gibi birçok bozukluğun, mevcut vasküler durumdan bağımsız olarak iskemik hasar gelişimini kendi başına etkileyebileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (21; 22; 23).

Hipoksinin, metabolizma üzerinde derin etkileri vardır. Bunlar, geliştirilmiş anaerobik glikolitik aktivite yoluyla, enerji üreten yolların verimliliğini artırmanın yanı sıra; enerji tüketen süreçleri azaltmayı içerir (24). RNA, DNA ve protein sentezi, enerji sınırlanması sonrası ilk olarak inhibe edilen yolaklardır. Ancak, Na^+/K^+ pompası ve Ca^{+2} döngüsü, hipoksi daha şiddetli bir aşamaya ulaştığında engellenir (25). İyon pompalama, nöronlardaki ATP tüketiminin %80 gibi büyük bir bölümünden sorumlu iken, iskelet kası hücrelerindeki ATP tüketiminin yalnızca %20'sinden sorumludur. Bu nedenle, şiddetli oksijen eksikliğinde, en uyarılabilir hücreler iyon taşıma sistemlerinin enerji taleplerini karşılamaya devam edemez ve bu da hücre ölümüne neden olur (26). Hücre yüzeyinde bulunan Na^+/K^+ ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz enzimlerinin çalışmaması sonucunda; hücre içinde Na^+ , hücre dışında K^+ iyonları birikir. Hücre içindeki yüksek Na^+ seviyeleri, Na^+/H^+ pompasının aktivitesini baskılar. Endoplazmik retikulumda bulunan Ca^{+2} ATPaz pompası da fonksiyonunu kaybeder ve Ca^{+2} alımı kısıtlanır. Sonuç olarak hücre içinde biriken H^+ , Na^+ ve Ca^{+2} iyonları hiperozmolariteye yol açar ve sitoplazmaya sıvı geçişi sonrası hücre şişer (20). Biriken H^+ iyonları, hücre içi pH'nın düşmesine neden olur; Ca^{+2} iyonları ise proteolitik enzimleri ve fosfolipazları aktive eder. Fosfolipaz aktivasyonu sonucunda araşidonik asit oluşumu meydana gelir. Araşidonik asit; mitokondriyal enzimleri inhibe eder ve serbest radikal oluşumunu artırır (2). Diğer yandan, hipoksik koşullar, mitokondride elektron transport zinciri disfonksiyonuna yol açar ve anaerobik metabolizmayı indükler. Anaerobik metabolizma sonucunda, aerobik metabolizmaya kıyasla daha düşük düzeylerde ATP üretilir ve laktik asit birikimi metabolik asidoza yol açabilir (20).

Bu değişiklikler sonrasında oluşan doku hasarının büyüklüğü, kan akışındaki azalmanın derecesine ve iskemik dönemin süresine göre değişir (**Şekil 1**) (21; 27). Bu gerçeğin farkına varılmasıyla, mümkün olan en kısa sürede revaskülarizasyon ve kan akışının restorasyonu, iskemiye yönelik mevcut tüm terapötik yaklaşımların temel dayanağı olmuştur (21).



Şekil 1. Uzun süreli iskemiye ve ardından reperfüzyona maruz kalan bir dokunun aldığı toplam hasarın, iskemik bileşen ve reperfüzyon bileşeniyle ilişkilendirilmesi. (21)

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyon, dokulara oksijen ve besinlerin yeniden sunulmasını sağlayarak, hücrel metabolizmanın desteklenmesi ve zararlı yan ürünlerinin ortadan kaldırılmasını sağlar. Ancak; reperfüzyonun, iskemi nedeniyle meydana gelen hasarı şiddetlendiren patogenetik süreçleri ortaya çıkarabileceği artık açıkça bilinmektedir. Reperfüzyon, mediatör salınımının bir sonucu olarak uzak organlarda doku hasarına neden olabilir. Bu konsept ilk kez, 60 yıl önce, koroner ligasyona maruz kalan kalplerde, reperfüzyonun nekroz gelişimini hızlandırdığının gözlenmesiyle tanımlanmıştır (28).

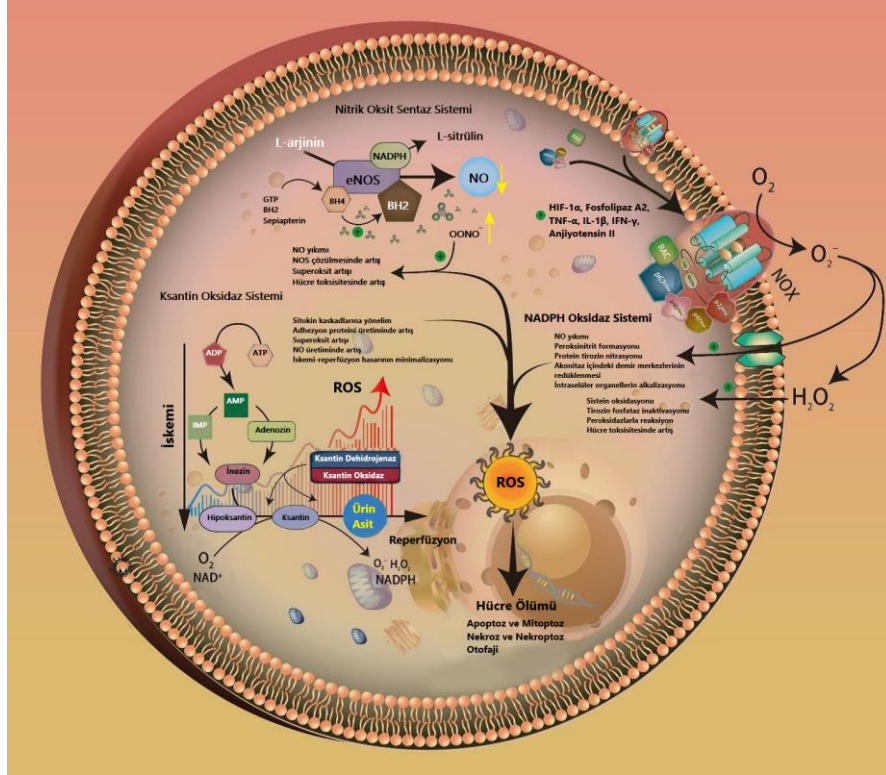
Reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar karmaşık, çok faktörlüdür ve şunları içerir (29):

- Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi
- Hücre içi kalsiyum yüklenmesi
- Mitokondriyal geçirgenlik artışı
- Endotelial disfonksiyon
- Protrombojenik ajanlar
- Artmış inflamatuvar yanıt

İskemi sırasında gerçekleşen sitozolik Ca^{+2} artışı, reperfüzyon sırasında şiddetlenir. Hücre dışı H^{+} iyonu konsantrasyonunun da azalmasıyla, plazmalemma boyunca proton gradiyenti artar (30; 31; 32; 33). Diğer yandan, sarkoplazmik retikulum Ca^{+2} deposu da İ/R sırasında etkilenir. Özellikle, SERCA ATPaz tarafından sarkoplazmik retikuluma Ca^{+2} geri alımı bozulur, Ca^{+2} ryanodin reseptörü tarafından ise sitoplazmaya salınım artar (34; 35; 36). Her iki mekanizma da, hücre içinde letal Ca^{+2} iyonu artışlarına yol açar. Hücrelerin Ca^{+2} 'daki bu ölümcül artışla başa çıkma yollarından biri, mitokondriyal Ca^{+2} uniporter yoluyla bu iyonun mitokondriye alımını sağlamaktır (35; 36; 37). Mitokondriyal Ca^{+2} 'daki aşırı yükselmeler, mitokondriyal membranda geçirgenlik artışına yol açar. Sitoplazmik Ca^{+2} iyonu artışının bir diğer önemli sonucu da, sistein proteaz ailesinden kalpainlerin aktivasyonudur. Kalpainler; hücre iskeleti, endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan hücre içi proteinlerin yıkımından sorumludur (38). Ek olarak, kalpainlerin endojen inhibitörü kalpastatin de İ/R sırasında sıklıkla parçalanır (39; 40). Sitoplazmik Ca^{+2} iyonu artışı sonucunda, kalsiyum pirofosfat ve ürik asit oluşumu da meydana gelir. Böylece, inflamazom olarak adlandırılan hücre içi protein kompleksine tehlike sinyalleri yollanır. İnflamazom aktivasyonu, IL-1 β ve TNF α gibi sitokinlerin artan üretimiyle sonuçlanır. Bu sitokinler, diğer pek çok sitokin salınımını uyarır ve meydana gelen sitokin fırtınası, İ/R hasarını artırır (21).

Oksijenize kanın iskemik dokuya yeniden girişi, aerobik dokuların restorasyonu için gerekli ATP üretimini sağlamakla beraber, ROS üretimine neden olur. Reperfüzyon sırasında üretilen ROS, oldukça reaktif yapısı nedeniyle, hücrelerde bulunan hemen her tür biyomolekülü oksidatif olarak değiştirebilir, böylece paradoksal olarak hücre işlev bozukluğunu indükleyebilir (oksijen paradoksu). ROS; endotelial disfonksiyonu, DNA hasarını ve lokal inflamatuvar yanıtları destekleyen oksidatif strese neden olur. İnflamatuvar kaskadlar ve oksidatif stres daha sonra bir sitokin fırtınasına neden olabilir ve bu da hücresel yapılara verilen hasarın neden olduğu hücre ölümüyle sonuçlanır (**Şekil 2**) (20; 41). Nitrik oksit (NO) kökenli reaktif nitrojen türleri (RNS) de, İ/R'ye hücrel ve sistemik yanıtta modülatör bir rol oynar. ROS ve RNS etkileşimi sonucu meydana gelen reaktif nitrojen oksit türleri (RNOS), genel olarak makromoleküllerin hasar görmesi/modifikasyonu, etkilenen dokuda endotelial ve/veya parankimal hücrelerin

ölümünün indüklenmesi ve çeşitli hücre tipleri tarafından proinflamatuvar mediatörlerin üretiminin/salınımının uyarılmasına yol açar (42; 43; 44; 45).



Şekil 2. İskemi-reperfüzyon hasarında ROS mekanizması. (20)

Ksantin oksidaz sistemi, hipoksantini ksantine ve ksantini ürik aside oksitleyerek ROS üretimini indükler. Başlangıçta ATP; IMP ve adenozin aracılığıyla inozine, inozin üzerinden de hipoksantine dönüştürülür. İskemik durumda, ksantin dehidrojenaz, daha düşük bir ATP seviyesi nedeniyle ksantin oksidoredüktaza kaydırılır ve hipoksantin'in ürik asite dönüşümü sırasında ROS oluşumunu indükler. NOX enzimleri, HIF-1α, fosfolipaz A2, TNF-α, IL-1β, IFN-γ ve anjiyotensin II'nin aktivasyonu yoluyla iskemik-reperfüzyon hasarında süperoksit ve hidrojen peroksit üretir. Süperoksitler, negatif yükleri sayesinde hücre zarından kanallar yoluyla geçer. Hidrojen peroksit doğrudan sitoplazmaya girer ve hücre hasarına neden olur. Hipoksik durumda, oksidatif stres BH4'ü BH2'ye oksitler ve NOS'un ayrılmasını indükler. NOS ayrışması, hücre ölümüne yol açan İ/R hasarını indükleyen ROS üretir.

İ/R, dört ana endotelial işlevde bozulmaya yol açar (21):

- Vasküler bariyerin korunması
- İmmün/inflamatuvar hücrelerin adhezyon ve ekstrasvasküler alana çıkışlarının kontrolü
- Vasküler tonusun düzenlenmesi
- Hemostatik mekanizmaların kontrolü

Normal koşullarda; trombositleri, koagülasyon sistemini ve fibrinolizi kapsayan hemostazın endotelial kontrolü, antitrombotik durumun sürdürülmesini sağlar. Ancak, bu durum İ/R'den sonra tersine döner. İ/R ile indüklenen endotelial NO seviyelerinde azalma; vazokonstriksiyon, trombosit aktivasyonu ve artmış trombosit agregasyonu ile sonuçlanır (46; 47). İ/R, endotelial doku faktörünün (TF) yüzey ekspresyonunu indükler; bu da pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonunu ve İ/R'den sonra no reflow fenomenine katkıda bulunabilecek mikrotrombüs oluşumunu hızlandırır (48; 49).

2.3. Medulla Spinalis İskemi Reperfüzyon Hasarı

İ/R'nin deneysel modellerinde yapılan temel gözlemlerden biri, reperfüzyondan sonraki hasarın, iskeminin süresi ile doğrudan ilişkili olduğudur (27). Bununla birlikte, organa özgü farklılıklar da organ hasarının genişliğini, şiddetini ve geri döndürülebilirliğini etkiler.

20 dakikadan daha kısa süreli bir iskemide tespit edilebilen geri dönüşsüz hasar ile beyin, kan akışındaki azalmaya karşı en hassas organdır (50). Beyin, toplam vücut oksijen tüketiminin %20-25'inden sorumludur; bu, herhangi bir organın birim ağırlığı başına en yüksek metabolik aktiviteyi oluşturur. Bu yüksek metabolik ihtiyaç, bir enerji substratı olarak glukoz için mutlak bir gereksinimle ve diğer dokularla karşılaştırıldığında, düşük seviyelerdeki glukoz/glukojen deposu ile ilişkilidir (51; 52). Beyin; kalp, karaciğer, böbrek ve akciğerlere göre daha düşük düzeylerde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz ve hemoksijenaz-1 gibi koruyucu antioksidan aktivitesine sahiptir. Aynı zamanda beyin; daha düşük düzeyde ATP üretimi ve mitokondriyal elektron taşıma zincirinden daha yüksek düzeyde süperoksit salınımı ile sonuçlanması beklenen, sitokrom c oksidazın önemli ölçüde daha düşük seviyelerine sahiptir (53; 54). Beyin, oksidatif hasara karşı oldukça hassas çoklu doymamış yağ asitlerine sahiptir (53) ve İ/R, bazı nörotransmitterlerin, örneğin glutamat ve dopaminin, aşırı salınımını tetikleyebilir; bu nörotransmitterlerin postreseptör sinyal yollarının bozulması, nöronal kalsiyum aşırı yüklenmesi ve sitotoksiste ile sonuçlanır (52).

Nöronal hasarın biyokimyasal belirteçlerinden olan protein S100B, esas olarak glial hücrelerin sitozolünde bulunan, kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesinin

bir üyesidir. S100B; glial hücre hasarından sonra, BOS ve serumda artan konsantrasyonlarda bulunabilir. Yüksek serum S100B seviyeleri; minör kafa travması (55; 56), stroke (57; 58; 59; 60; 61; 62) ve kardiyopulmoner bypass sonrası nörolojik komplikasyonlarla başvuran kardiyak cerrahi hastalarında (63; 64; 65; 66) bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, serum S100B proteininin, nörolojik hasarı, nöron spesifik enolaza (NSE) göre daha yüksek özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerler ile öngördüğü; nöron hasarının en umut verici serum belirteci olduğu belirtilmiştir (11).

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarının Organ Sistemlerine Etkileri

İ/R'nin istenmeyen etkileri, ilk iskemiye maruz kalan spesifik doku ile sınırlı değildir. Lokalize doku iskemisinden sonra reperfüzyonun neden olduğu sık görülen bir sonuç, uzak organ hasarı (ROI) olarak adlandırılan, diğer organ sistemlerindeki yaralanmadır.

ROI'nın altında yatan mekanizmalar, İ/R sırasında üretilen, lokal organ disfonksiyonunda rol oynayan faktörlerle ilişkilidir: ROS, lökositler ve inflamatuvar mediatörler. Bu faktörler doğrudan primer hasarlı dokudan, dolaylı olarak aktive edilmiş lökositlerden veya diğer inflamatuvar hücrelerden salınabilir (21).

Süperoksit ve hidrojen peroksit üreten ksantin oksidaz (XO), bağırsaktaki İ/R'den sonra karaciğer, akciğer ve kalp kasındaki ROI'da önemli bir faktör olarak gösterilmiştir. XO aracılı sistemik etkilerin mekanizması; dolaşımdaki enzim tarafından yüksek miktarlarda ROS üretilmesini, XO'nun endotel hücre yüzeyi ile yakın ilişkisini ve XO aracılığıyla oksidan üreten polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) ilk yaralanan organdan uzak organlara alınmasına yol açan kemotaktik faktörlerin salınımını içerir (67).

Son 20 yılda, nörojenik sinyallerin, ROI'yı da içeren inflamatuvar yanıtlara katkıda bulunduğu giderek daha açık hale geldi (68; 69). Bağırsaktaki İ/R sonucunda oluşan proinflamatuvar fenotip; duyuşal sinir toksini, kapsaisin ve taşıkinin reseptör antagonistleri ile önemli ölçüde azaltılabilir. Bu koruma, hem bağırsakta hem de akciğerde belirgin şekilde gözlenmiştir. Nörokinin bağımlı sinyallemenin; PAF gibi lipid mediatörlerinin ilk salınımı ve mevcut bir inflamatuvar fenotipin amplifikasyonu

yoluyla, İ/R ile indüklenen inflamatuvar tepkilerin başlamasına katkıda bulunabileceği öne sürülmektedir (69).

2.5. İskemik Önkoşullama

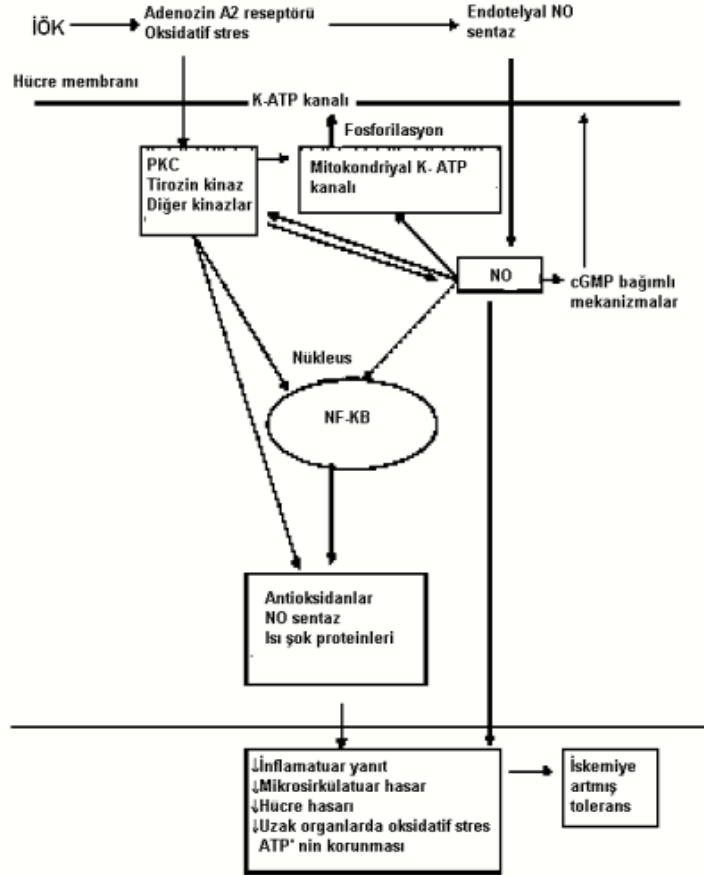
İskemik önkoşullama; preinfarktüs iskemik ataklar sonucunda infarkt alanının sınırlanmasına yol açan, miyokardın iskemiye karşı hazırlığı olarak tanımlanır (70). Miyokard infarktüsüne karşı kalbin endojen korunmasının bir formu olan bu fenomen, ilk kez 1986 yılında Murry tarafından köpekler üzerinde yapılan deneysel bir çalışma sonucunda tanımlanmıştır (71). İnfarktüs öncesi tekrarlayan 40 dakikalık iskemik atakların, koruyucu mekanizmaları tetikleyerek, miyokardda daha az yüksek enerjili fosfat kullanımı ve daha az laktat üretimine neden olduğu ve infarkt alanında yaklaşık olarak %75'lik bir azalma sağladığı gösterilerek bu fenomen "iskemik önkoşullama" (İÖK) olarak adlandırılmıştır. Bu faydalı mekanizma ile ilişkili başlangıçtaki bulgular, birçok hayvan deneyi (72; 73; 74) ve insanlar üzerinde yapılan klinik çalışmalarca (75) desteklenmiştir.

İÖK'nin, serebral iskemide de koruyucu bir rol oynadığı tahmin edilmektedir (76). İn vivo ilk serebral İÖK çalışması, rat beyninin anaerobik glikoliz kapasitesinin kısa süreli anoksiden sonra arttığını ve daha sonra daha uzun süreli anoksiye maruz kalmanın ardından hayatta kalma süresinin uzadığını göstermiştir (77). Bir başka önemli çalışma, karotis kan akımı kısa süre bozulursa, iki gün sonraki global iskeminin neden olduğu gerbil hipokampal CA1 piramidal hücrelerinin gecikmiş nöronal ölümünün tamamen önlenebileceğini göstermiştir (78). Bu bulgu, bugün bildiğimiz şekliyle beyindeki iskemik tolerans üzerine yapılacak araştırmaların başlatılmasında çok önemliydi. Zamanla, serebral iskemik toleransın birçok güvenilir ve tekrarlanabilir deneysel modeli geniş çapta kabul görmüştür (79; 80; 81; 82; 83).

İÖK zamanlaması ve tekrarlama döngüleri için de çeşitli paradigmlar mevcuttur. Bir köpek deney modelinde, İÖK'nin süresi 10 dakika olarak uygulanmıştır (84). Bir tavşan akciğer iskemi modelinde, sol akciğerdeki hiler kan akımı 10 dakika süreyle bloke edilmiş, ardından 15 dakika süreyle serbest bırakılmıştır (85). Benzer bir tavşan modelinde, 15 dakikalık İÖK'nin, 5 dakikadan daha etkili olduğu gösterilmiştir (86). Bununla birlikte, başka bir tavşan deney

modelinde, 5 dakikalık İÖK'nin, İ/R hasarını önlemede 10 dakikadan daha iyi sonuçlar verdiği ortaya konmuştur (87).

Tam olarak netleşmemekle birlikte, İÖK etki mekanizmasında en çok adenozin reseptör uyarılması, protein kinaz C (PKC) aktivasyonu, ısı şok proteinleri ve nitrik oksit (NO) üzerinde durulmuştur (Şekil 3) (2; 88).



Şekil 3. İskemik önkoşullamanın mekanizması. (2)

(PKC: Protein kinaz C, NO: Nitrik oksit, NFκB: Nükleer Faktör κB)

Kontrollü laboratuvar hayvan deney modellerinden elde edilen kanıtlar, İÖK'nin terapötik faydalarını desteklemektedir. Bununla birlikte, rutin klinik kullanımda yetersizlik mevcuttur. İÖK ile ilgili birçok insan deneyi, küçük çalışma popülasyonuna sahiptir. İÖK'nin optimal süresi ve sıklığının belirlenebilmesi için daha kapsamlı insan deneyleri yapılmalıdır (19).

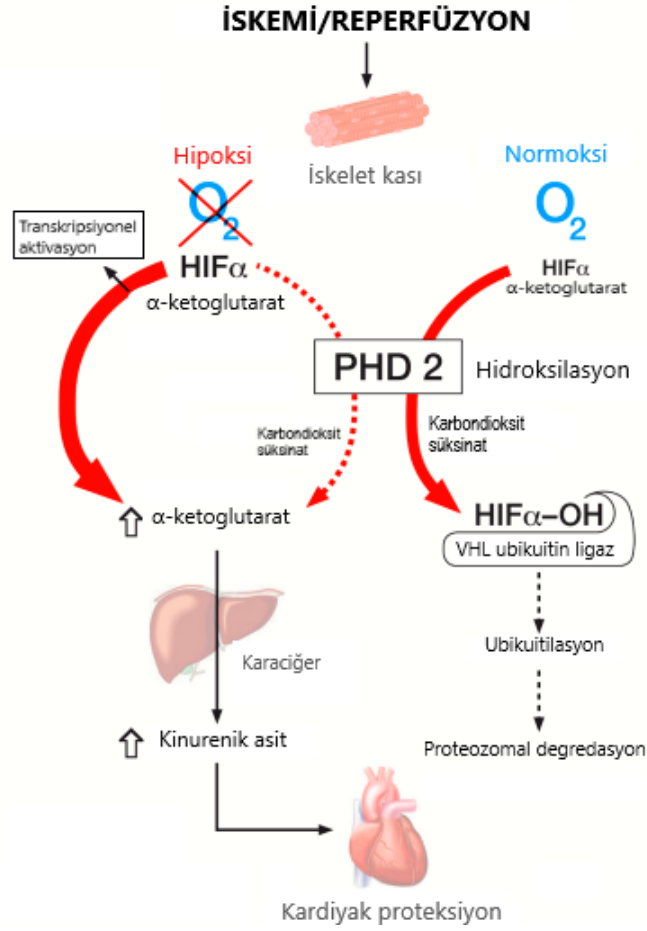
2.6. Uzak İskemik Önkoşullama

Bir organa uygulanan İ/R epizodları başka bir organda iskemiye karşı dayanıklılık sağlamaktadır; bu yöntem UIÖK olarak adlandırılır (2; 89). UIÖK, ilk olarak 1993'te Przyklenk ve arkadaşları tarafından kalp üzerinde tanımlanmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda UIÖK'nin; kalp dışında karaciğer, bağırsak, pankreas, beyin ve akciğer dokularında da koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (6). UIÖK'nin nöroprotektif etkinliği, yakın geçmişte yapılan birçok çalışma ile desteklenmektedir (90; 91; 92; 93). İÖK ve UIÖK, spinal kord fonksiyonu açısından da faydalı bulunmuştur (94; 95; 96).

UIÖK uygulaması ile ilgili olarak, en etkili uzak dokuyu belirlemek önemlidir. İskelet kası iskemisinin büyük hayvanlarda ve insanlarda güçlü bir UIÖK uyarıcısı olduğu gösterilmiştir (97). Kan basıncı kafi şişirilerek, 5'er dakikalık 4 epizod ekstremitte iskemisi uygulaması, normal gönüllülerin önkolundaki iskemik endotelial disfonksiyonu önlemiş ve bir hayvan miyokard infarktüsü modelinde infarktüs boyutunu küçültmüştür. Aynı uygulama ile, bir kalp nakli modelinde, donör kalpteki İ/R hasarının azaltıldığı belirtilmektedir (98).

UIÖK'nin uygulama kolaylığı ve travmatik olmaması, öne çıkan avantajlarındanıdır.

UIÖK'nin mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır (7). Ancak son zamanlarda yapılan deneysel gözlemler, oksijen algılayan enzim PHD2'nin hipoksik inhibisyonunun; alfa-ketoglutaratın artmış seviyelerine ve dolaşımdaki KYNA miktarında artışlara yol açabileceğini, böylece UIÖK'ye büyük ölçüde aracılık edebileceğini göstermiştir (**Şekil 4**) (8).

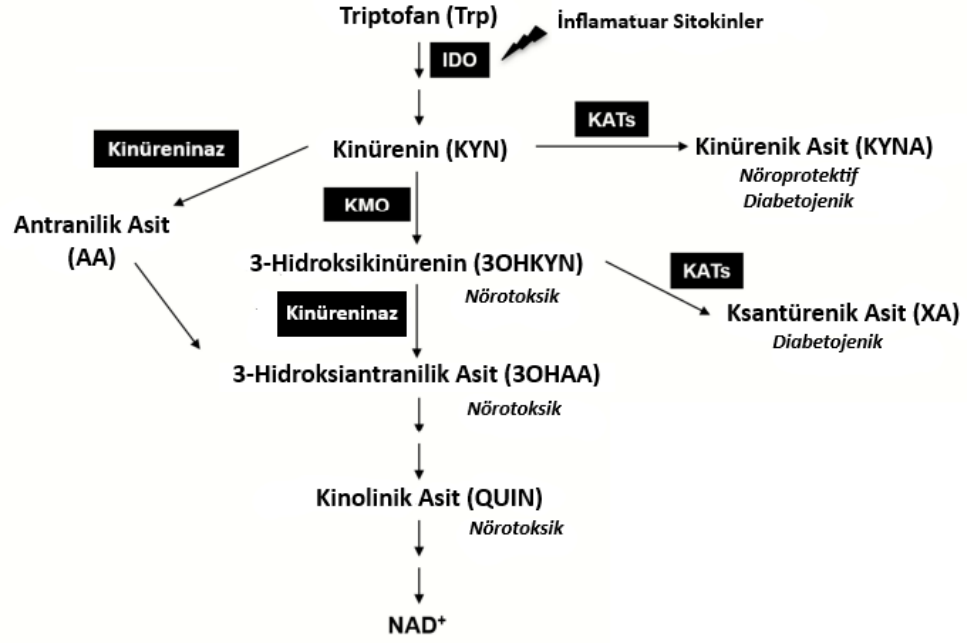


Şekil 4. Hipoksi sırasında kinürenik asit oluşumunda yer alan yolların şematik gösterimi. (8)

Şekil, kas hipoksisinin, kardiyoprotektif bir etkiye aracılık edebilen alfa-ketoglutarat oluşumuna ve kinürenik asit üretimine yol açan PHD2 fonksiyonunun inhibisyonuyla sonuçlandığı mekanizmayı göstermektedir. Ayrıca, transkripsiyon faktörü HIF'in oksijene bağlı bozunmasında, normoksida PHD2'nin kanonik rolünü de gösterir. (HIF α : hypoxia inducible factor α , PHD2: prolyl hydroxylase domain 2, VHL: von Hippel Lindau)

KYNA, bir triptofan metabolizma ürünüdür ve triptofanın kinürenin yolu (**Şekil 5**) aracılığıyla parçalanması, indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) tarafından başlatılır. IDO sentezi, interferon gama ve diğer proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılır. IDO, triptofanın N-formil kinürenine dönüşümünü katalize eder, bu ürün daha sonra kinürenin formamidaz tarafından kinürenine (KYN) dönüştürülür. KYN, kinürenin amino transferazlar (KATs) tarafından KYNA'ya dönüştürülebilir. KYNA, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör antagonisti olduğu için nöroprotektif olarak kabul edilmektedir.

Kinürenin 3-monooksijenaz (KMO) ise, KYN'yi 3-hidroksikinürenine (3OHKYN) dönüştürür. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonisti bir nörotoksik ajan olan kinolinik asit (QUIN) de bu yolda oluşur (99).



Şekil 5. Kinürenin yolu ve metabolitleri. (99)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı A. Ş. Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu onayı alındıktan sonra Kobay Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 250-300 g arasında değişen, 31 adet erkek Spraque-Dawley cinsi erişkin rat kullanıldı. Ratlar araştırma başlangıcına kadar oda sıcaklığında (21-22°C), %45-65 nisbi nemde, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ortamda tutulup triptofandan zengin yem ve suyla beslendi. Cerrahi işlem öncesi açlık uygulanmadı.

3.1. Anestezi Uygulaması

Anestezi intraperitoneal (ip) 50 mg/kg ketamin (Ketalar flk., Pfizer Pharma GMBH, Germany) ile sağlandı. Gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 25 mg/kg) refleks yanıtlara bakılarak tekrarlandı.

3.2. Deneysel Grupları ve Protokol

Grup I (*Sham*, n=9): Yalnızca insizyon uygulandıktan sonra hiçbir işlem yapılmadan cilt kapatıldı.

Grup II (İ/R, n=11): Medulla spinalise 1 dk total iskemi sonrasında 1 saat reperfüzyon uygulandı.

Grup III (UIÖK+İ/R, n=8): Sağ arka bacağa uygulanan 10'ar dakikalık 3 döngü UIÖK sonrası, grup II'deki işlemler tekrarlandı.

Başlangıçta *sham* grubunun örneklem büyüklüğü 9, İ/R ve UIÖK+İ/R gruplarının her birinin örneklem büyüklüğü ise 11 olarak belirlendi. UIÖK+İ/R grubunda, laminektomi sırasında veya hemen sonrasında üç rat öldü ve analizlerin dışında bırakıldı.

Kan ve doku örnekleri, grup I'de insizyondan, grup II ve III'te ise medulla spinaliste reperfüzyon başlangıcından sonraki 1. saatlerde alındı.

3.3. Deneysel Çalışma Modeli

Tüm ratlar genel anestezi altında, yüzüstü pozisyonda tespit edildi (**Resim 1**). Deneklerin sırt bölgesinde, interskapuler mesafe referans alınarak, 3x2 cm'lik alan

tır ş edildi ve povidon iyot ile lokal antisepsi sağlandı (**Resim 2**). T₅-T₁₂ seviyesinde orta hat insizyonu yapıldı (**Resim 3**). Cilt, cilt altı dokular ve paravertebral kas fasyası geçilerek kaslar laterale künt disseksiyon ile sıyrıldı (**Resim 4**). T₇-T₁₀ laminaları görüldükten sonra T₇ seviyesinde total laminektomi uygulandı. Bu seviyede spinal kord, standart travma amacıyla 63 g kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klibi (Aesculap FE 721 K) ile 1 dk. süreyle sıkıştırıldı (**Resim 5**). Daha sonra klip kaldırıldı, hemostazı takiben insizyon sahası anatomik katlarına uygun şekilde kapatıldı.

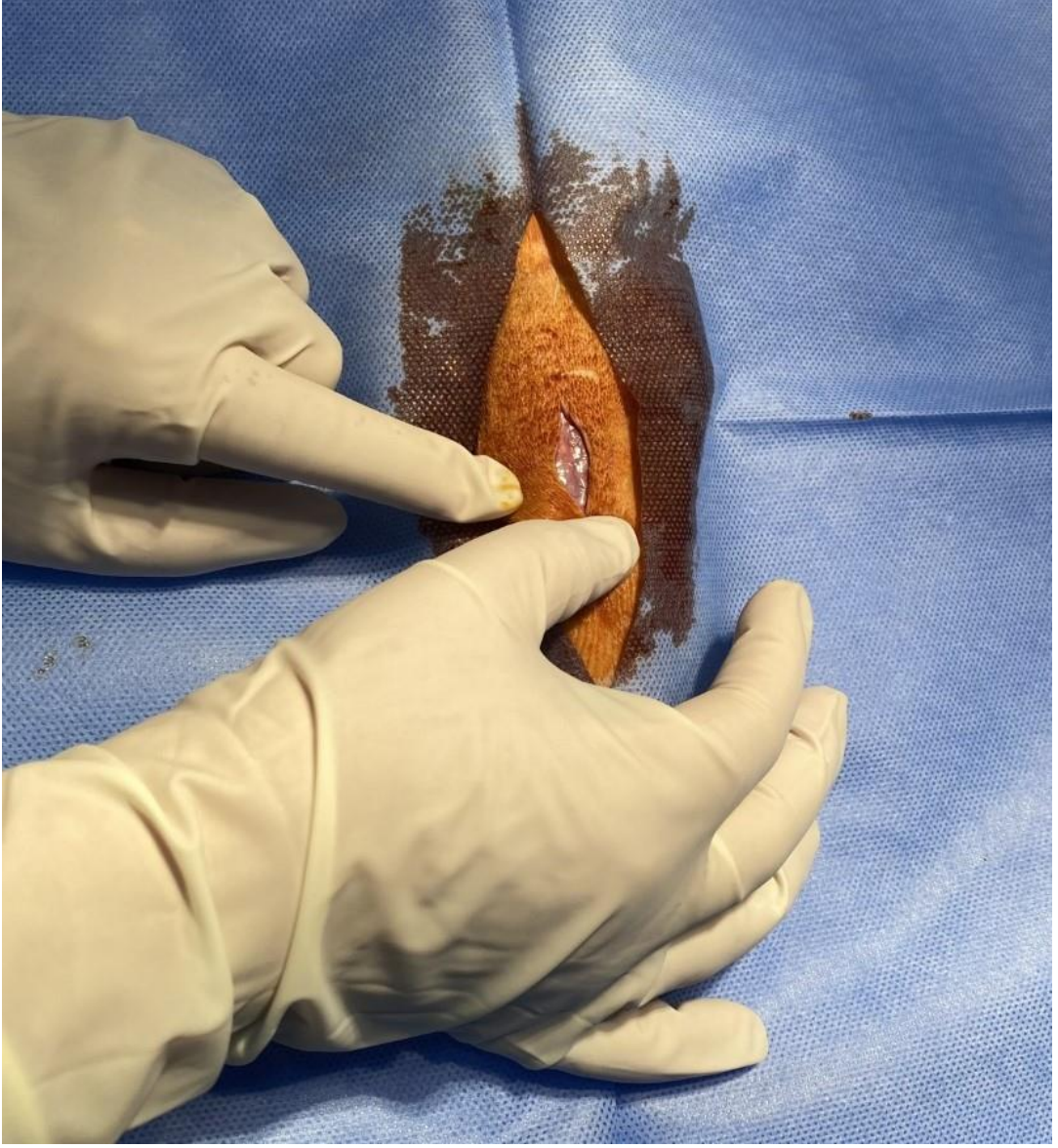
UI K amacıyla, ratın sağ arka bacağı kasık bölgesinden ince kauçuk lastik ile sıkıldı. 3 döngü halinde 10 dk iskemi oluşturulup, takiben 10 dk reperfüzyon sağlandı. Kan akımının kesilmesi, sağ arka bacakta renk değişikliği ile doğrulandı (**Resim 6**).



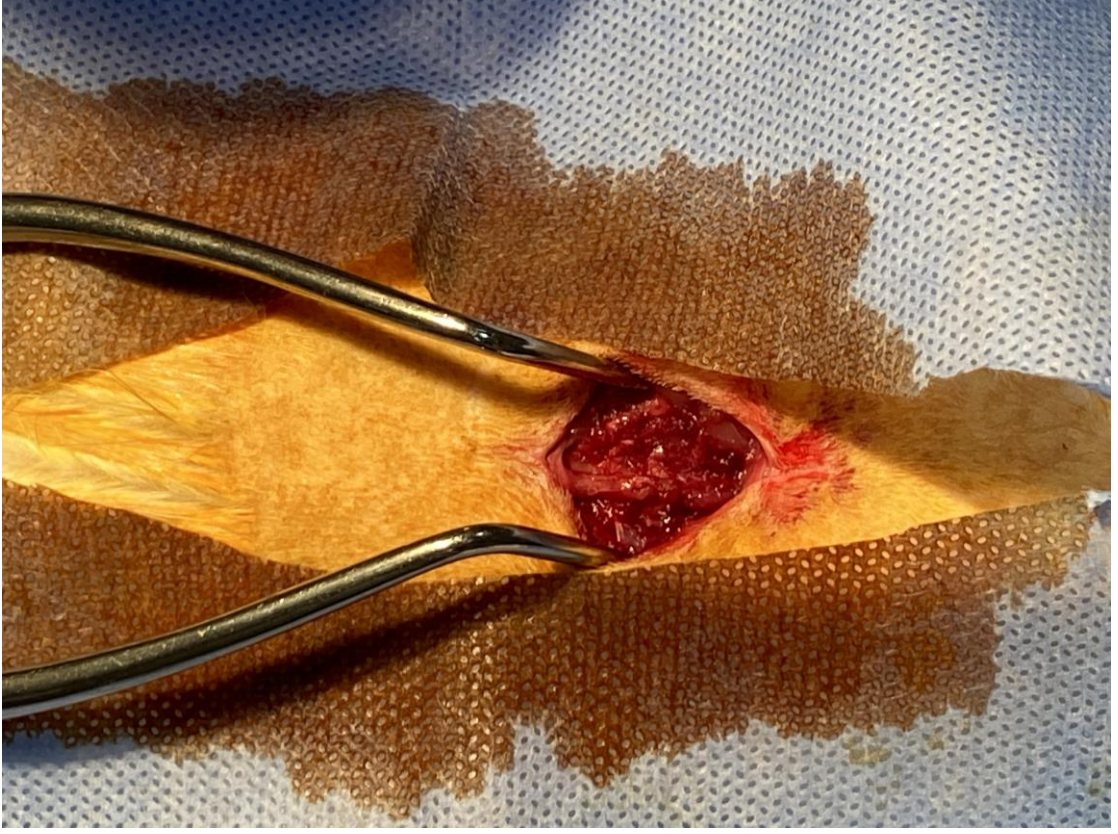
Resim 1. İşlem öncesinde ratların, genel anestezi altında, yüzüstü pozisyonda tespit edilmesi.



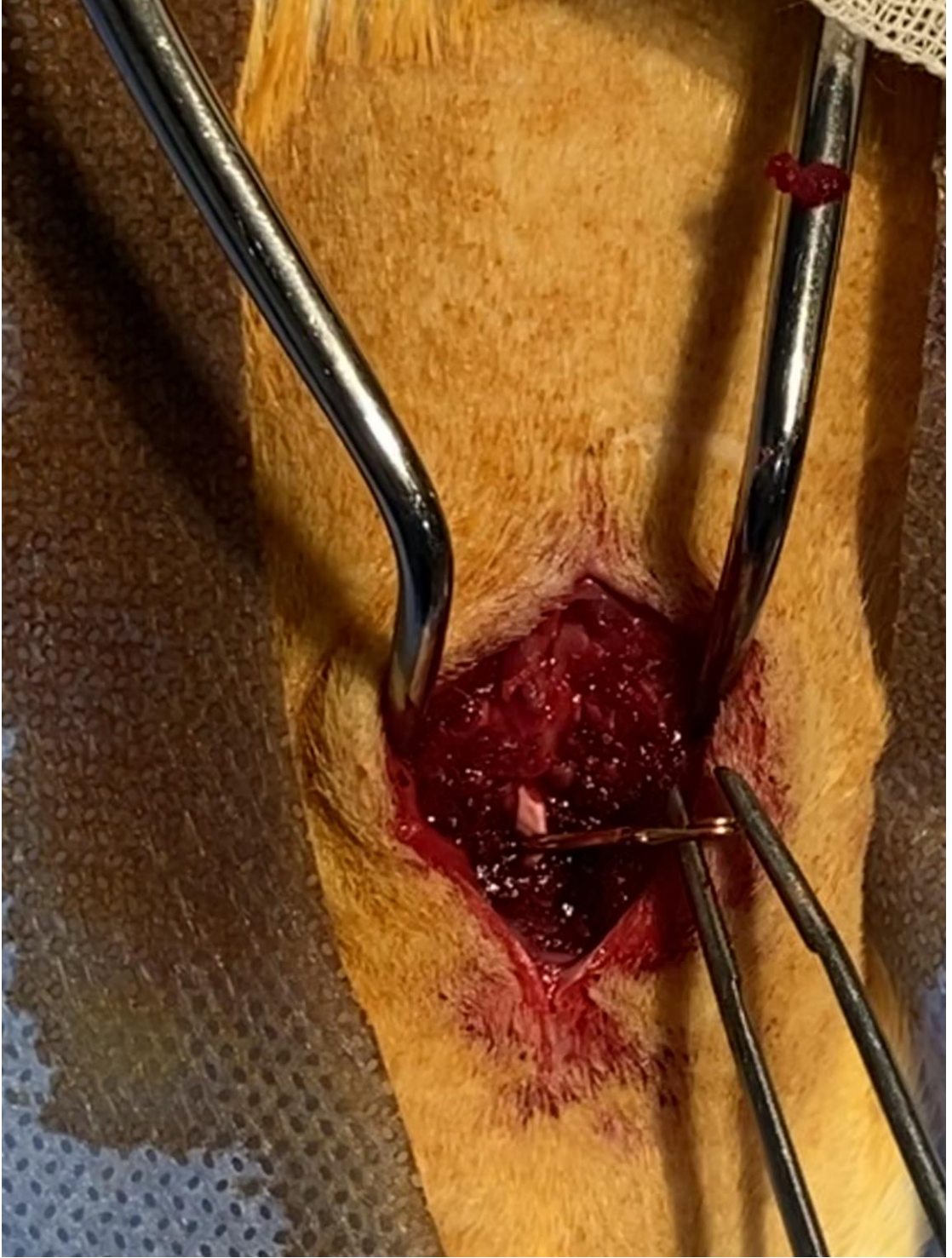
Resim 2. Deneklerin sırt bölgesindeki 3x2 cm'lik alan tıraş edildikten sonra povidon iyot ile lokal antisepsi sağlanması.



Resim 3. T₅-T₁₂ seviyesinde yapılan orta hat insizyonu.



Resim 4. Cilt, cilt altı dokular ve paravertebral kas fasyası geçilerek kasların laterale künt disseksiyon ile sıyılması.



Resim 5. Spinal kordun, standart travma amacıyla 63 g kuvvet uygulayan Yaşargil anevrizma klibi (Aesculap FE 721 K) ile sıkıştırılması.



Resim 6. Ratın sağ arka bacağından kasık bölgesinden ince kauçuk lastik ile sıkılması ve 3 döngü halinde 10 dk iskemi oluşturulup, takiben 10 dk reperfüzyon sağlanması sonrasında kan akımının kesilmesi sebebiyle sağ arka bacakta gözlenen renk değişikliği.

Grup I'de insizyondan, grup II ve III'te ise medulla spinaliste reperfüzyon başlangıcından sonraki 1. saatlerde, tüm ratlardan intrakardiyak olarak kan alındıktan sonra ratlar sakrifiye edildi ve histopatolojik inceleme için, medulla spinalisten doku örneği alındı. Örnekler fikse edildikten sonra spinal kord hasarı histolojik olarak değerlendirildi.

3.4. Histopatolojik Değerlendirme

T₅-T₁₂ seviyeleri arasından alınan medulla spinalis segmentine ait örnekler %10 tamponlu nötral formalinde 72 saat süreyle fikse edildi. Ardından takip cihazına alınarak (Leica TP 1020) dehidratasyonu sağlamak için sırayla %70, %80, %90, %96 ve %100'lük alkollerde 1'er saat bekletildi. Şeffaflandırma için doku örnekleri 1'er

saat süreyle 2 kez ksilenden geçirildikten sonra parafine alıştırma için 2,5 saat saf parafinde bekletildi. Doku takip cihazından alınan örnekler parafin istasyonunda (Leica Eg1150H) saf parafine gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 75 mikron aralıkta bir, 5 mikron kalınlığında ard arda 3 kesit alındı (**Şekil 6**).

Alınan kesitler Hematoksilen-Eosin ve Krezil Viole ile boyandı. Histopatolojik değişiklikler Hematoksilen-Eosin ve Krezil Viole boyalı üç farklı kesitte skorlandı.

Medulla spinaliste gri cevherde büyük motor nöronların yer aldığı ön boynuz (Rexed'in laminası 8 ve 9), ara gri cevher (lamina 7 ve 10) ve arka boynuz (lamina 1 ve 6) olmak üzere 3 bölgede, akut gri cevher hasarı dejenere nöronların yüzdesi üzerinden skorlandı (**Şekil 7**). Buna göre;

0, nöron hasarı yok

1, hafif hasar (<%10)

2, orta hasar (%10 - %50)

3, ciddi hasar (>%50).

Beyaz cevherde akut hasar, ventral ve ventrolateral funikulusta vakuolizasyon üzerinden değerlendirildi.

0, normal (vakuolizasyon yok)

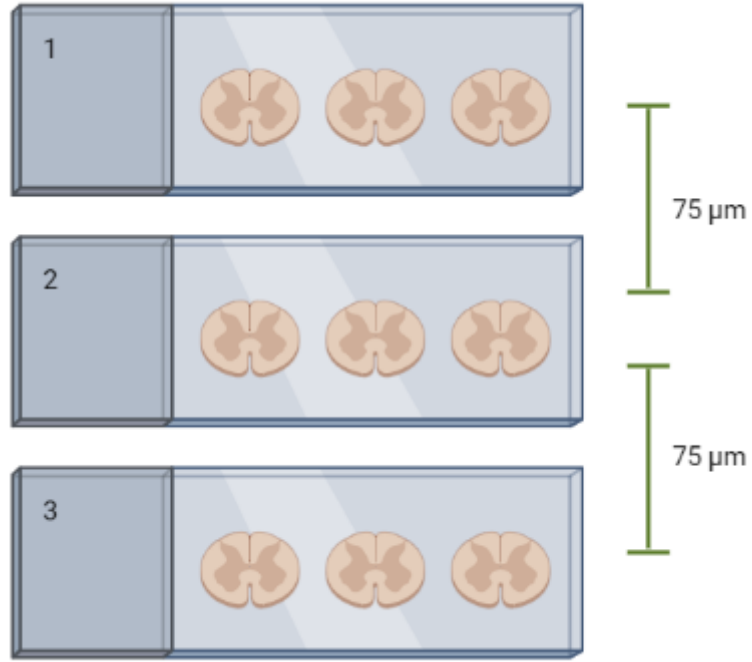
1, hafif hasar (etkilenmiş alan <%10)

2, orta hasar (%10 - %50)

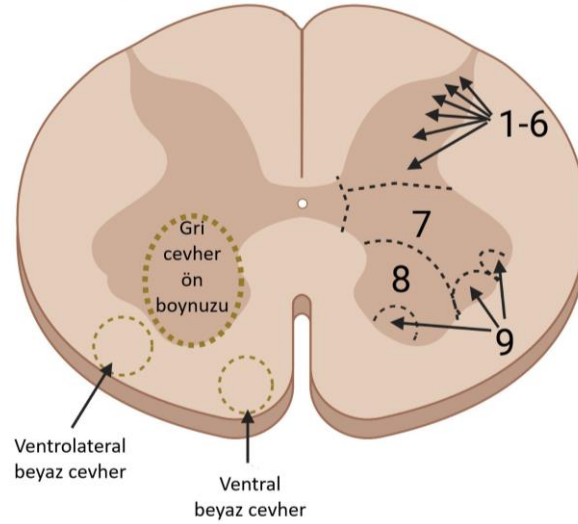
3, ciddi hasar (>%50).

Her hayvana ait birbirini takip eden 3 örnekte, gri ve beyaz cevherde skorlanan hasar, sağ ve sol parçaların ortalaması alınarak belirlendi.

Gri cevherin sağ ve sol parçalarında, ön boynuzda X400 büyütmede nöron hücre gövdeleri sayılarak ortalama nöron sayısı belirlendi. Kesitler dijital kameraya (DC490) bağlı ışık mikroskobu (Leica DM6B, Leica) ile incelendi ve fotoğraflandı.



Şekil 6. Değerlendirilen kesitlerin aralıklarına ait şematik görüntü. Her medulla spinalis örneğinde 5 mikron aralıkla 3 kesit alındıktan sonra 75 mikron atılarak tekrar 3 kesit alındı ve bu şekilde ard arda 3 farklı kesit değerlendirildi.



Şekil 7. Sıçan medulla spinalis kesitinin bölümlerini gösteren diyagram. Lamina 1-6: Arka boynuz, Lamina 7: Ara gri cevher, Rexed'in laminası 8-9: Büyük motor nöronlarının bulunduğu ön boynuz bölgesini göstermektedir.

3.5. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Kan numuneleri, sakrifikasyon işleminin hemen ardından intrakardiyak olarak alındı. Serum elde etmek için santrifüj yapıldı (1500 x g, 10 dakika). Biyokimyasal ölçümler çalışma protokolü tamamlandıktan sonraki iki hafta içinde analizler yapılana kadar -80 °C'de saklandı. S100B seviyesi, nöronal hasarın bir belirteci olarak kullanıldı. Hem KYNA hem de S100B, üreticilerin protokollerine göre ticari enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kitleleriyle ölçüldü (CED718Ge ve SEA567Ra, Cloud-Cone Corp., Çin). Her iki kit için de intra-assay ve inter-assay presizyon değerleri için coefficient of variation (CV) değerleri sırasıyla <math><10\%</math> ve <math><12\%</math> olarak raporlanmıştı. Recovery değerleri açısından en iyi örnek türünün serum olduğu raporlandığı için plazma yerine serum ile ölçüm yapılması tercih edildi.

3.6. İstatistiksel Değerlendirme

Tüm analizler için SPSS versiyon 25 yazılımı kullanıldı (IBM, Armonk, NY, ABD). KYNA ve S100B seviyelerinin gruplara göre grafiklerini çizmek için GraphPad Prism versiyon 8.4.2 yazılımı kullanıldı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD). Histolojik skorlar hem farklı kesitlerin hem de kesitler içerisindeki sağ/sol alanların ortalaması olarak alındığı için sürekli veri olarak kabul edildi. Çalışmada analiz edilen sürekli verilerin gösterimi için medyan (minimum-maksimum) değerleri kullanıldı. Sürekli verilerin üç çalışma grubu arasındaki kıyaslamaları Kruskal-Wallis testiyle yapılırken, post hoc ikili analiz için Bonferroni düzeltmesi kullanıldı. KYNA, S100B ve histolojik skorlar arasındaki korelasyonlar Spearman korelasyon katsayısı hesaplanarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için p değeri eşiği $\leq 0,05$ olarak kabul edildi.

Rat beyni ve omurilik lezyonlarındaki S100B seviyeleri ile ilgili önceki sonuçlara göre G*Power v3.1.9.7 yazılımı ile bir önsel güç analizi gerçekleştirdik (100; 101). Etki büyüklüğü 0.805 olarak hesaplandı, α hata oranı 0.05 olarak tanımlandı ve %95'lik bir çalışma gücü belirlendi. Bu da, uygun istatistiksel güce sahip güvenilir bir çalışma yürütmek için, 3 gruba ayrılan en az 27 ratın (her grup için $n = 9$) gerekli olacağını ortaya koydu. Omurga cerrahisinin kendisine bağlı %10-

%20'lik bir ölüm oranı öngörerek (102; 103), İ/R yaralanması için laminektomi uygulanan iki grubun her birine ek 2 rat dahil ettik (her iki grup için n = 11).

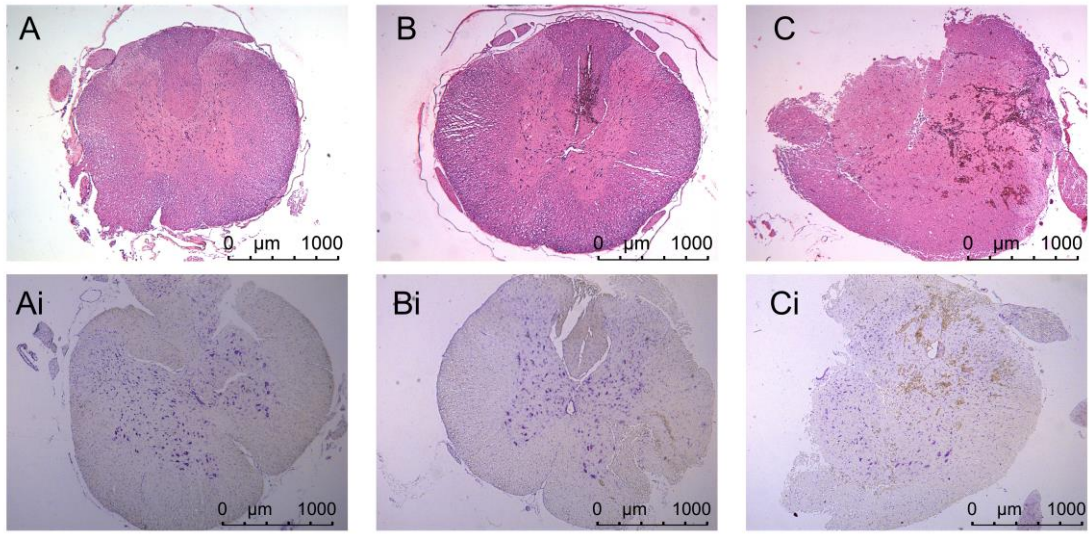
Çalışmaya toplam 31 rat dahil edildi. UIÖK+İ/R grubunda, laminektomi sırasında veya hemen sonrasında üç rat öldü ve analizlerin dışında bırakıldı (bu grup için n = 8). Diğer tüm ratlar kurban edilene kadar hayatta kaldı.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Parametreler

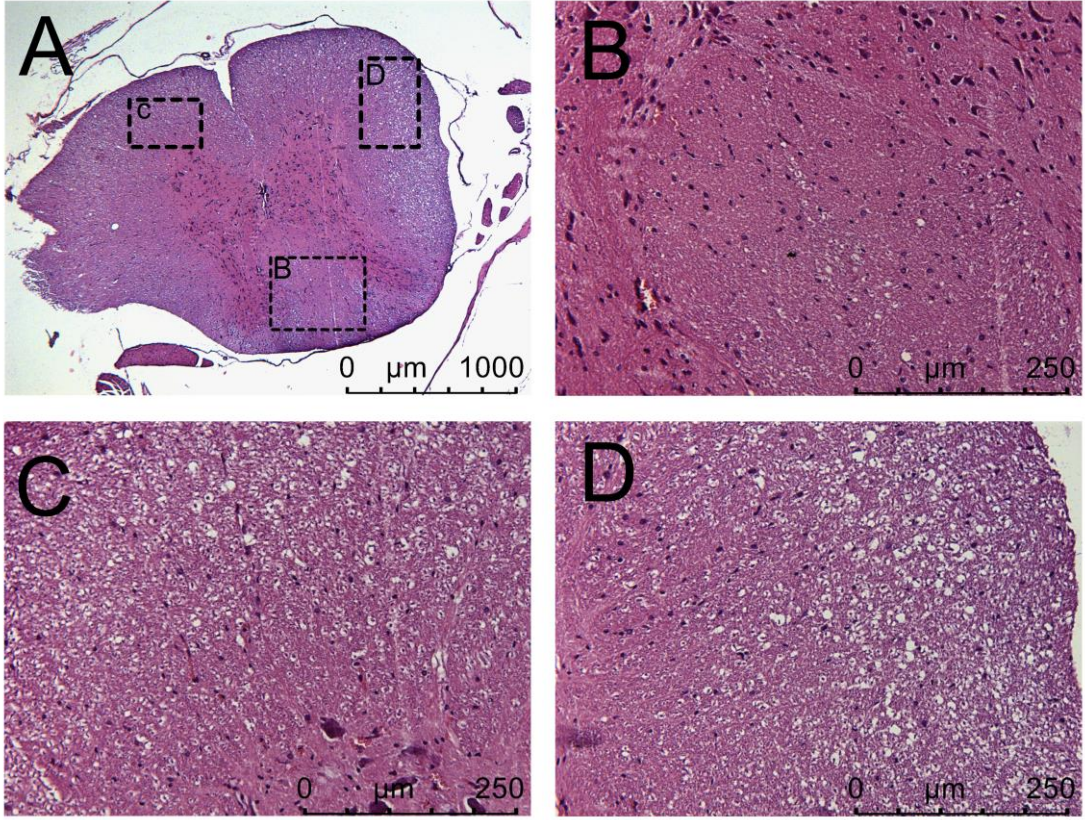
İnsizyon, spinal kord travması ve uzak iskemik ön koşullama sonrası spinal kord travması uygulanan gruplara ait örneklerin skorlamaları ve ışık mikrografları karşılaştırmalı olarak sırasıyla **Tablo 1** ve **Şekil 8**'de verilmiştir.

İnsizyon uygulanan grupta medulla spinalis kesitlerinde akson ve glia hücrelerinin yer aldığı beyaz cevher ve nöron ile glia hücrelerinin yer aldığı gri cevherin bütünlüğünü koruduğu gözlenmiştir (**Şekil 8A, Ai, 9, 10**). İncelenen örneklerde sağlıklı, normal morfoloji gösteren nöronlar ve bunlara eşlik eden glia hücreleri izlenmiştir. Krezil Viole ile yapılan boyama perinükleer yerleşimli Nissl cisimleri ile sağlıklı, normal morfoloji gösteren nöronların varlığını desteklemiştir (**Şekil 11**).



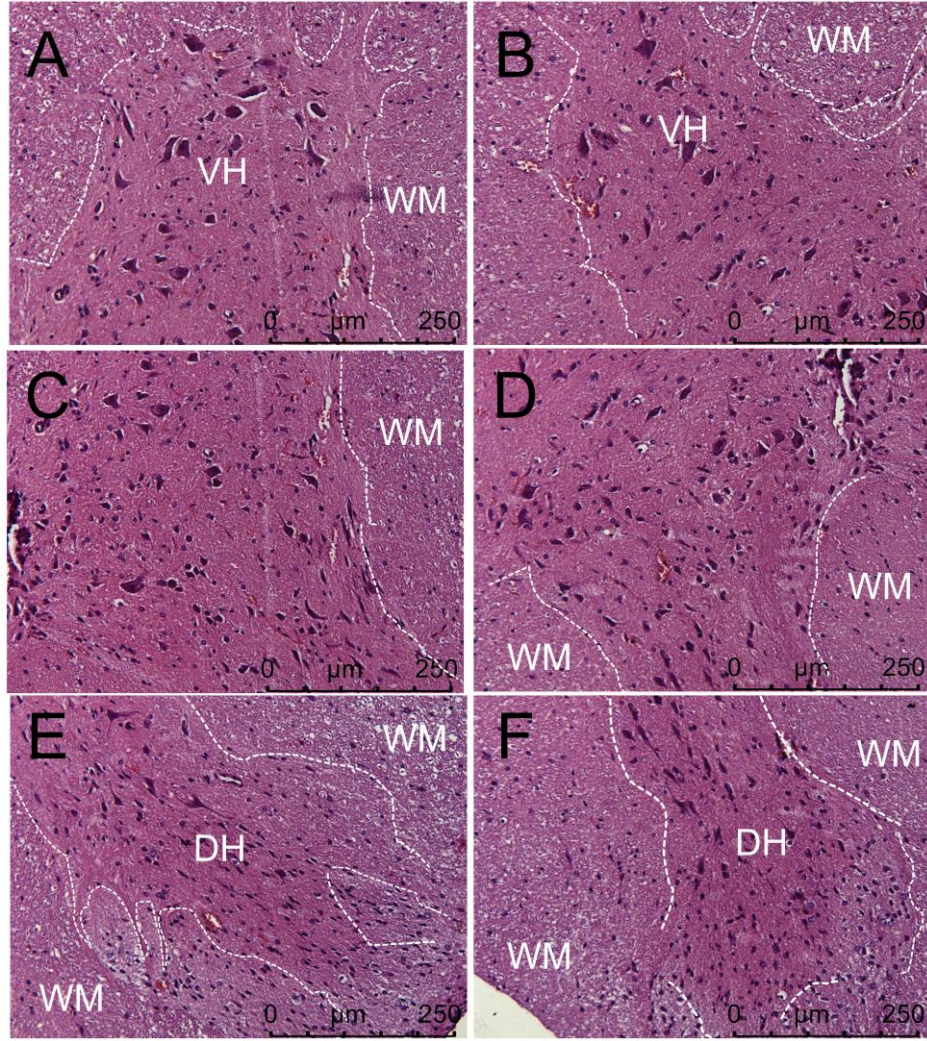
Şekil 8. Deney gruplarına ait örneklerin enine kesitlerinin ışık mikrografları.

Spinal travma ve uzak iskemik önkoşullama sonrası spinal travma uygulanan grupta belirgin hemoraji gözlenmektedir. A: İnsizyon B: Spinal travma C: Uzak iskemik önkoşullama sonrası spinal travma, A, B ve C: Hematoksilen-Eozin, Ai, Bi ve Ci: Krezil Viole X40



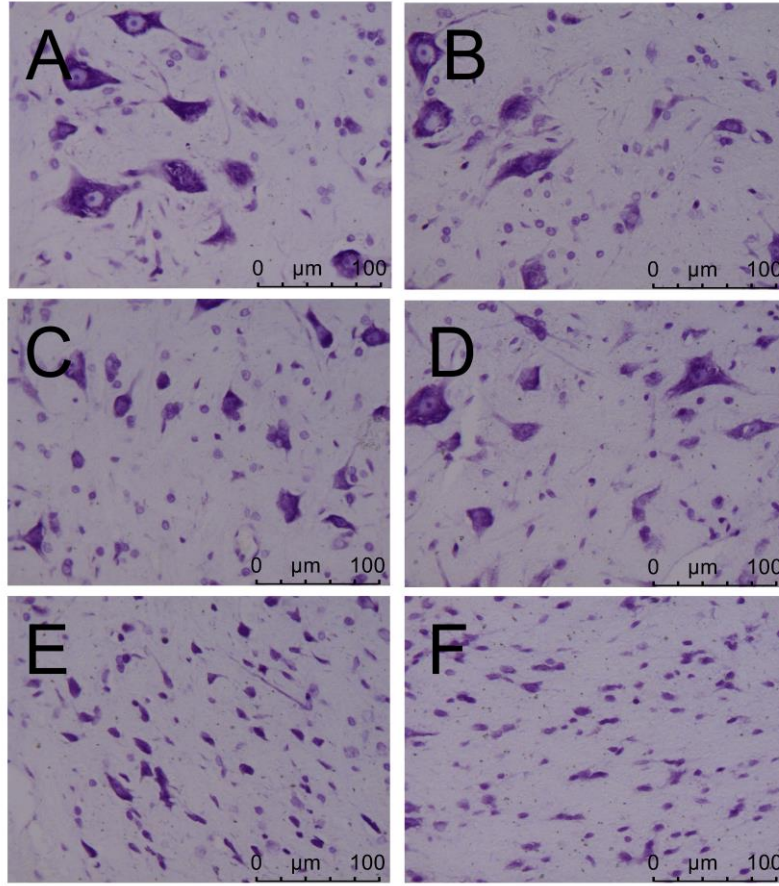
Şekil 9. İnsizyon uygulanan grupta ventral, ventrolateral ve dorsal boynuzlar arasında kalan beyaz cevher alanı.

Glia hücrelerine ait çekirdekler ve myelinli aksonların enine kesitleri izlenmektedir. Hematoksilen–Eozin A: X4, B, C, D: X200



Şekil 10. İnsizyon uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanlarına ait ışık mikrografları.

Bu bölgelerde sağlıklı, normal morfoloji gösteren nöronlar ve bunlara eşlik eden glia hücreleri izlenmektedir. A, C, E: Sağa; B, D, F: Sola ait örnekler. VH: Ventral boynuz, WM: Beyaz cevher, DH: Dorsal boynuz. Hematoksilen-Eozin X200



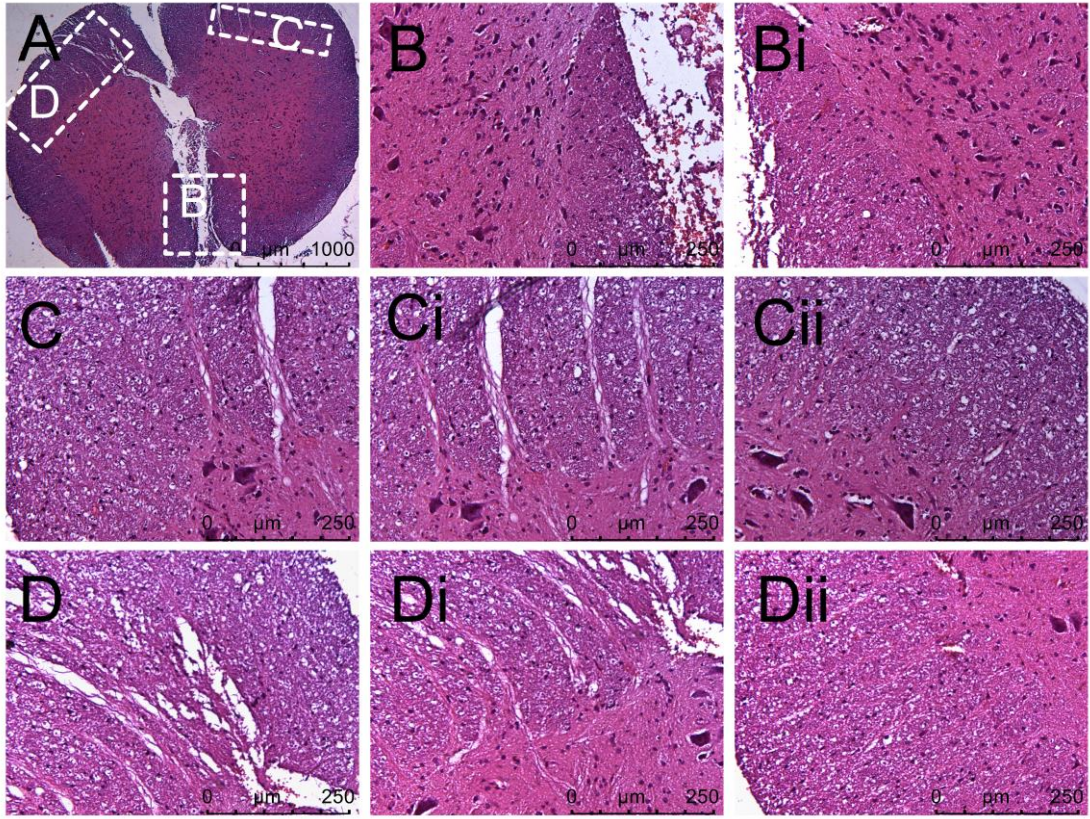
Şekil 11. İnsizyon uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanlarına ait ışık mikrografları.

Krezil Viole ile yapılan boyama ile perinükleer yerleşimli Nissl cisimleri ile sağlıklı, normal morfoloji gösteren nöronlar izlenmektedir. A, C, E: Sağa; B, D, F: Sola ait örnekler. Krezil Viole X400

Spinal kord travması uygulanan gruba ait örneklerde hemoraji (**Şekil 8B, Bi**) damarlarda konjesyon ve hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Bazı örneklerde spinal kordun bütünlüğünün korunamadığı izlenmiştir (**Şekil 12**).

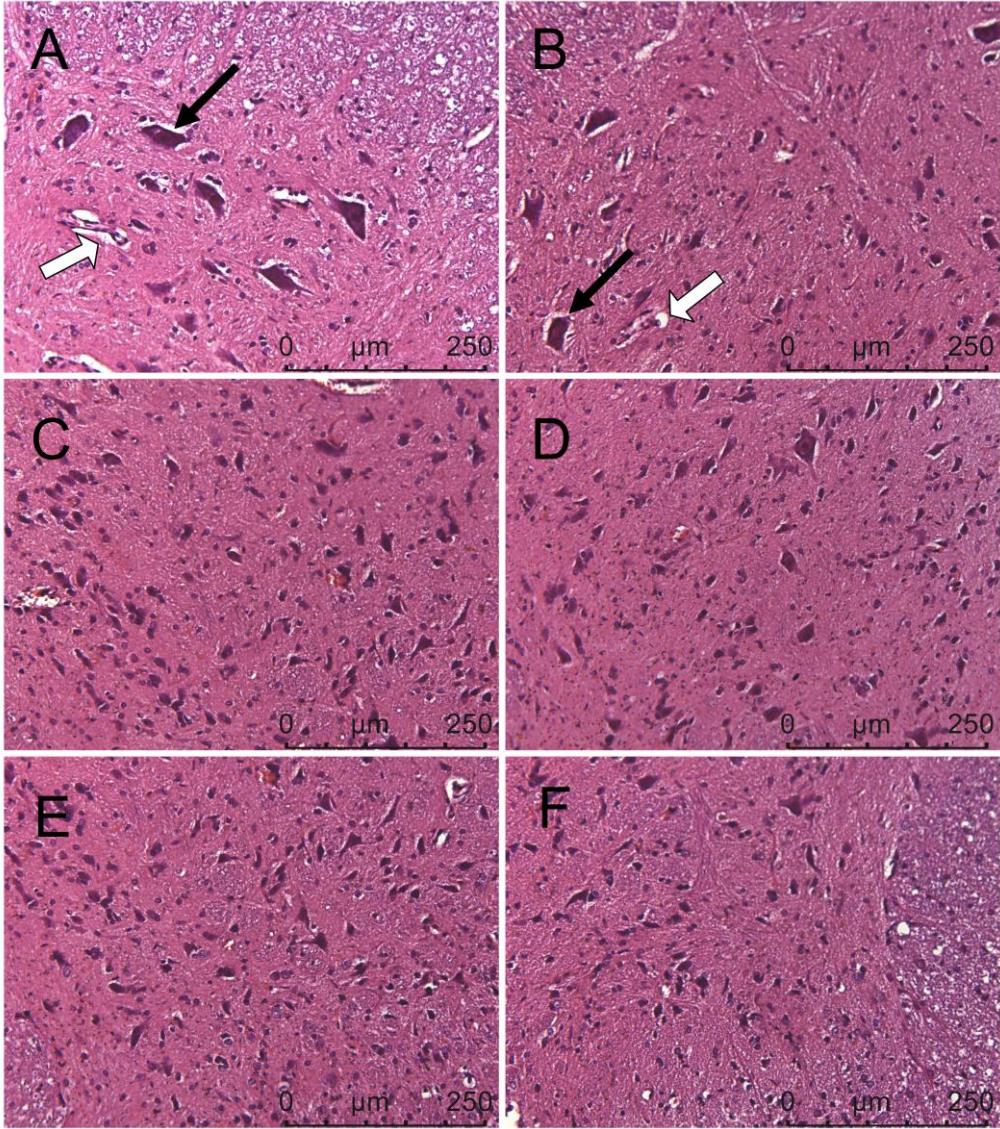
Bu grubun beyaz cevher ventral alanında orta derecede, ventrolateral alanda hafif mikrovakuolizasyon saptanmıştır (**Şekil 12**).

Gri cevher ventral boynuz, ara bölge ve dorsal boynuzda yer alan nöronlar değerlendirildiğinde ön ve dorsal boynuzda yer alan nöronlarda ciddi, orta alanda yer alan nöronlarda orta derecede hasar belirlenmiştir. Ventral boynuzda yer alan multipolar nöronlarda vakuoler dejenerasyon gözlenmiştir (**Şekil 14, 15**).



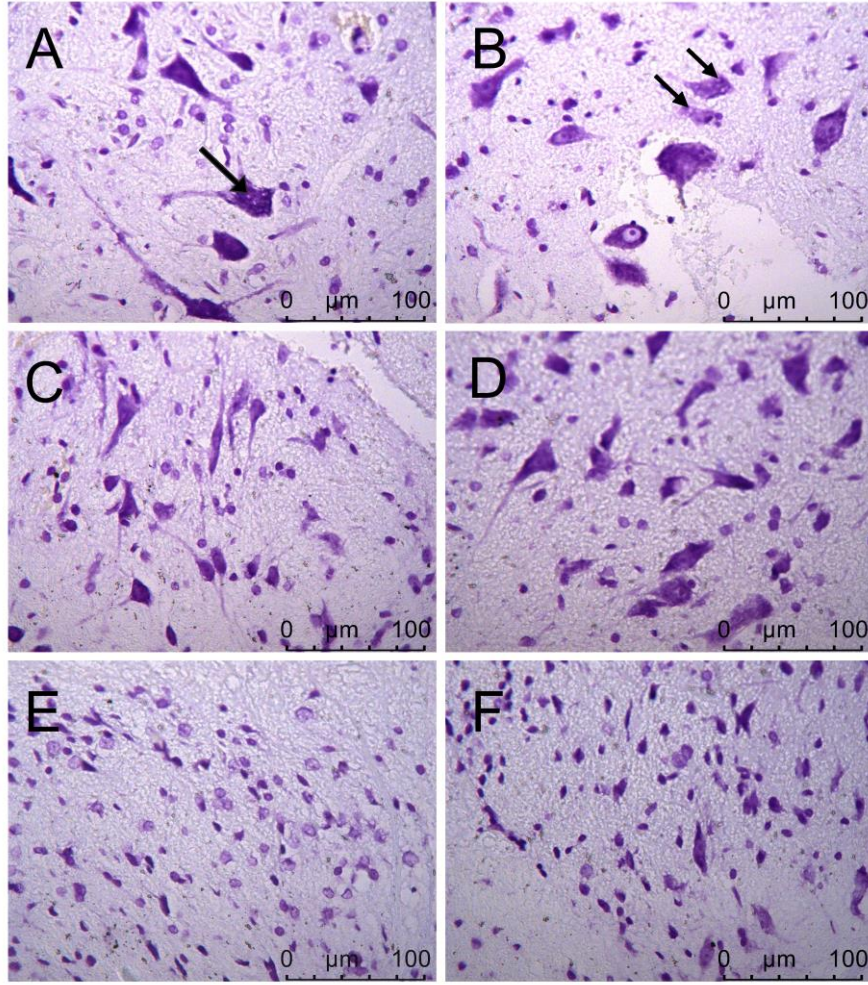
Şekil 12. Spinal kord travması uygulanan gruba ait örneğin ışık mikrosafı.

Ventral, ventrolateral ve dorsal boynuzlar arasında kalan beyaz cevher alanında glia hücrelerine ait çekirdekler ve myelinli aksonların enine kesitleri izlenmektedir. Dorsal boynuzlar arasında kalan alanda hemoraji, beyaz cevher ventral alanda orta derecede, ventrolateral alanda hafif mikrovakuolizasyon gözlenmektedir. Hematoksilen–Eozin A: X40; B, Bi, C, Ci, Cii, D, Di, Dii: X200



Şekil 13. Spinal kord travması uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) alanına ait ışık mikrografları.

Bazı nöronlarda kondensasyon (siyah ok), perivasküler ödem (beyaz ok) izlenmektedir. A, C, E: Sağa; B, D, F: Sola ait örnekler. Hematoksilen-Eozin X200



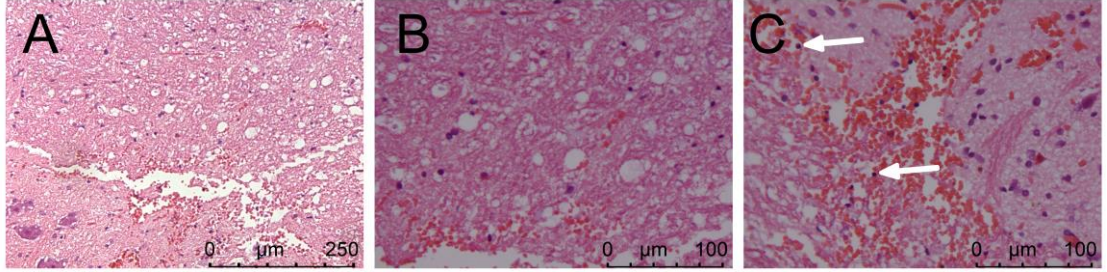
Şekil 14. Spinal kord travması uygulanan grupta ventral boynuz (A ve B), intermediate kolon (B ve C), dorsal boynuz (D ve E) ait ışık mikrografları.

Krezil Viole ile yapılan boyama ile vakuolar dejenerasyon gösteren nöronlar (siyah ok) izlenmektedir. A, C, E: Sağa; B, D, F: Sola ait örnekler. Krezil Viole X400

İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ödem, ciddi hemoraji (**Şekil 8C, Ci, 15, 16**), damarlarda belirgin konjesyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Bu grubun beyaz cevher ventral alanında ciddi, ventrolateral alanda orta derecede mikrovakuolizasyon izlenmiştir (**Şekil 15**). Gri madde ön boynuz, ara bölge ve dorsal boynuzda yer alan nöronlarda ciddi hasar saptanmıştır.

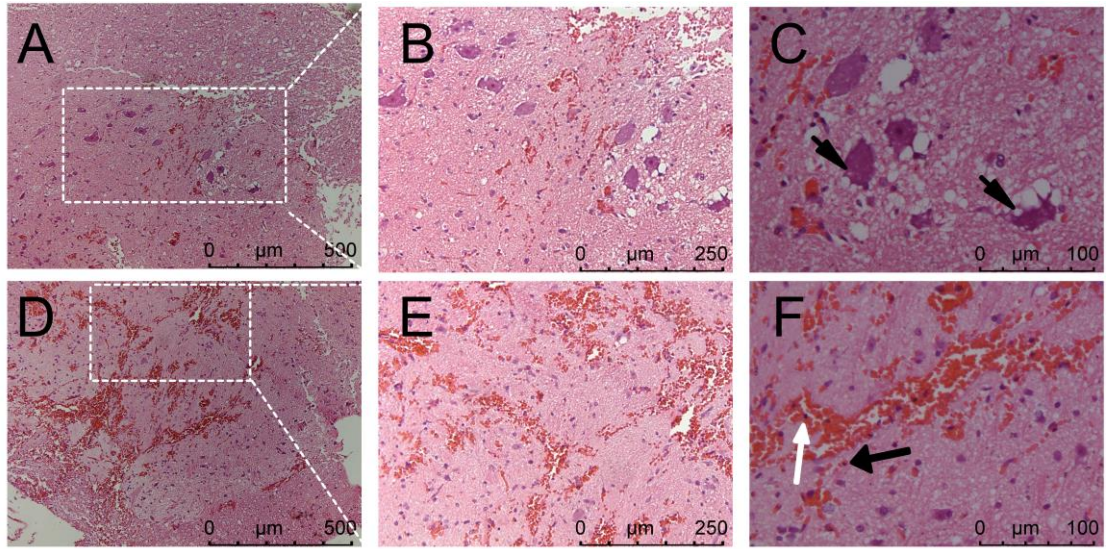
Gri madde ön boynuzda eozinofilik sitoplazma, sitoplazmada vakouller ile multipolar nöronlarda hasar izlenmiştir (**Şekil 16**). Krezil Viole ile gri cevherde

ventralde multipolar motor nöronlarda Nissl cisimlerinde bozulma gözlenmiştir (Şekil 17).



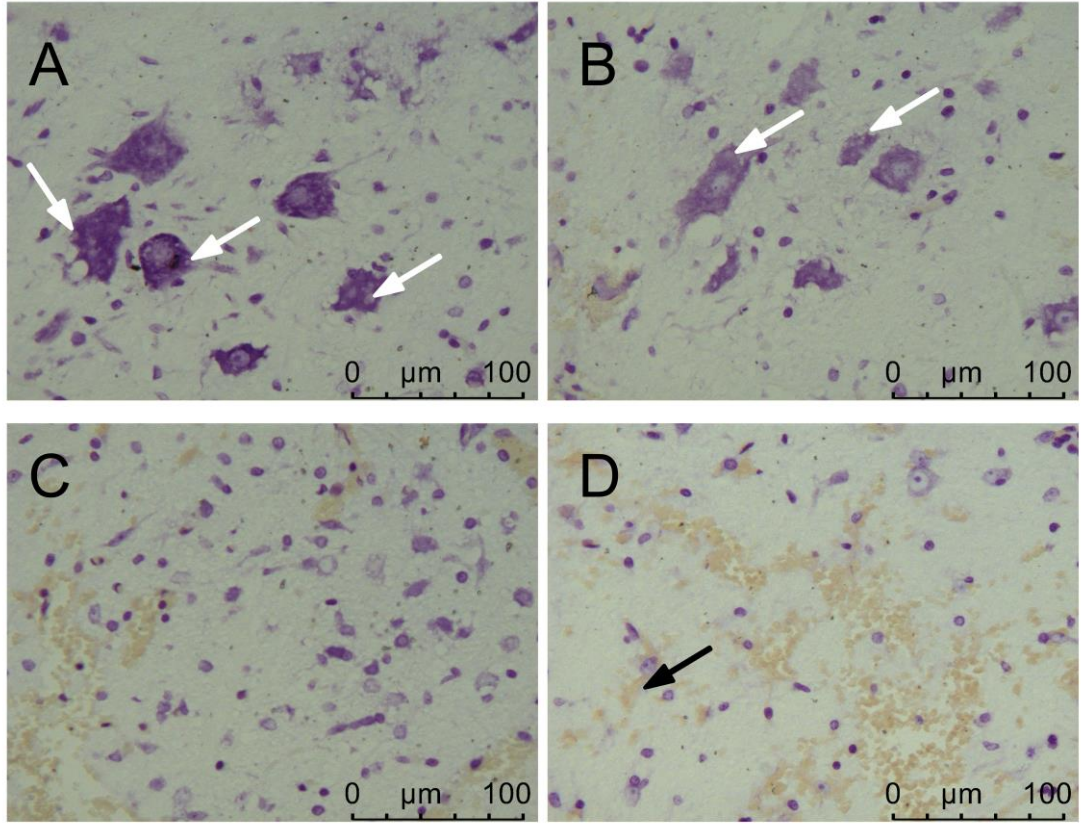
Şekil 15. İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral, ventrolateral ve dorsalde beyaz cevher alanı.

Beyaz cevherde damarlarda belirgin konjesyon, yer yer eritrosit ekstravazasyonu, inflamatuvar hücreler (beyaz ok) ve mikrovakuolizasyon izlenmektedir. Hematoksilen–Eozin A: ventral X200; B: ventrolateral, C: dorsal X400



Şekil 16. İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral ve dorsalde gri ve beyaz cevher alanları.

Gri cevherde damarlarda belirgin konjesyon, yer yer eritrosit ekstravazasyonu, ventral multipolar motor nöronlarda vakuoler dejenerasyon (ok başı), damar içinde (beyaz ok) ve gri cevherde (siyah ok) inflamatuvar hücreler gözlenmektedir. A, B, C: ventral; D, E, F: dorsal alan. Hematoksilen–Eozin A, D: X100; B, E: X200; C, F: X400



Şekil 17. İskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması uygulanan grupta ventral ve dorsalde gri cevher alanları.

Gri cevherde ventralde multipolar motor nöronlarda Nissl cisimlerinde bozulma ve kondense hasarlı nöronlar (beyaz ok), damarlarda belirgin konjesyon, yer yer eritrosit ekstravazasyonu (siyah ok) gözlenmektedir. A, B: ventral; D, E: dorsal gri cevher. Krezil Viole X400

Medulla spinaliste gri cevherde ön boynuz, ara gri cevher ve arka boynuzda akut gri cevher hasarı dejenere nöronların yüzdesi üzerinden (0-nöron hasarı yok, 1-hafif hasar (<%10), 2-orta hasar (%10 - %50), 3-ciddi hasar (>%50) skorlandı.

Beyaz cevherde akut hasar ventral ve ventrolateral funikulusta vakuolizasyon üzerinden (0-normal (vakuolizasyon yok), 1-hafif hasar (etkilenmiş alan <%10), 2-orta hasar (%10 - %50), 3-ciddi hasar (>%50) değerlendirildi. Veriler ortanca (minimum – maksimum) olarak verilmiştir (**Tablo 1**).

Tablo 1. Gri ve beyaz cevherde bölgelerin skorlaması

	GRİ CEVHER			BEYAZ CEVHER	
	Ventral Boynuz	Intermediate Kolon	Dorsal Boynuz	VWM	VLWM
GRUP 1 (İnsizyon)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
GRUP 2 (Spinal kord travması)	3 (0-3)	2 (0-3)	3 (0-3)	2 (0-3)	1 (0-3)
GRUP 3 (Uzak iskemik önkoşullama sonrası spinal kord travması)	3 (3-3)	3 (2-3)	3 (3-3)	2,5 (1-3)	2 (1-3)

Histolojik analizler, sham grubuna kıyasla hem İ/R hem de UİÖK+İ/R gruplarında önemli ölçüde daha yüksek beyaz ve gri cevher hasar skorlarını ortaya koydu (sırasıyla $p = 0,001$ ve $p < 0,001$) (**Tablo 2**). UİÖK+İ/R grubunda beyaz ve gri cevher ve içerdikleri bölgeler için medyan puanlar İ/R grubuna göre nispeten daha yüksek olmasına rağmen, ikili karşılaştırma ile sonuçların istatistiksel olarak benzer olduğu görüldü. KYNA konsantrasyonu, S100B konsantrasyonu ve histolojik skorlar arasında anlamlı bir korelasyon yoktu.

Tablo 2. Tüm bölgelerdeki histolojik hasar skorlarının, gruplar arası karşılaştırmalı özeti

	Sham (n = 9)	İ/R (n = 11)	UİÖK + İ/R (n = 8)	pvalue
	Median (min–max)	Median (min–max)	Median (min–max)	
Beyaz cevher	0 (0–0.5)	1.5 (1.35–2.65) ^a	2.5 (2–2.5) ^a	0.001
Ventral WM	0(0–0.5)	1.75 (0.7–2.3) ^a	2.3 (2.2–2.8) ^a	<0.001
Ventrolateral WM	0 (0–0.5)	2 (1–3) ^a	2.3 (1.7–2.8) ^a	0.001
Gri cevher	0 (0–0.08)	2.08 (1.5–2.93) ^a	3 (2.9–3) ^a	<0.001
Ventral boynuz	0 (0–0)	2.45 (1.8–3) ^a	3 (3–3) ^a	<0.001
Intermediate kolon	0 (0–0)	1.55 (1.2–2.8) ^a	3 (2.7–3) ^a	<0.001
Dorsal boynuz	0 (0–0.25)	2.1 (1–3) ^a	3 (3–3) ^a	<0.001

WM: White matter (beyaz cevher).

Tüm grupların karşılaştırmaları Kruskal-Wallis testi ile yapılmıştır.

Aynı harfler ikili karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılığın olmadığını gösterir (Bonferroni düzeltmesi).

4.2. Biyokimyasal Parametreler

KYNA ve S100B seviyelerinin karşılaştırılması, sham ve İ/R grupları arasında anlamlı farklılıkların varlığını ortaya koydu (sırasıyla, $p = 0,016$ ve $p = 0,022$) (**Tablo 3**). Her iki karşılaştırmada da İ/R ve UIÖK+İ/R grupları için post hoc ikili karşılaştırmalar anlamlı olmamasına rağmen, UIÖK uygulanan ratlar, yalnızca İ/R grubuna kıyasla nispeten daha düşük KYNA ve S100B konsantrasyonlarına sahipti (**Tablo 3, Şekil 18, Şekil 19**).

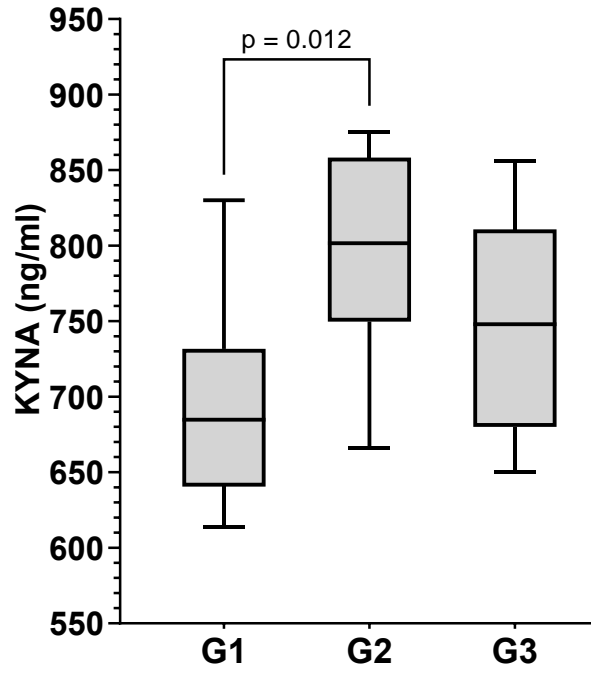
Tablo 3. Gruplar arası KYNA ve S100B seviyelerinin karşılaştırılması

	G1		G2		G3		
	Median (min-max)		Median (min-max)		Median (min-max)		p-value
KYNA (ng/ml)	684.8 (614 - 830.1) ^a		801.6 (666.4 - 875.4) ^b		748 (650.4 - 855.8) ^{a,b}		0.016*
S100B (ng/ml)	4.4 (1.9 - 6.7) ^a		7 (2.9 - 12.3) ^b		5.7 (4 - 10.2) ^{a,b}		0.022*

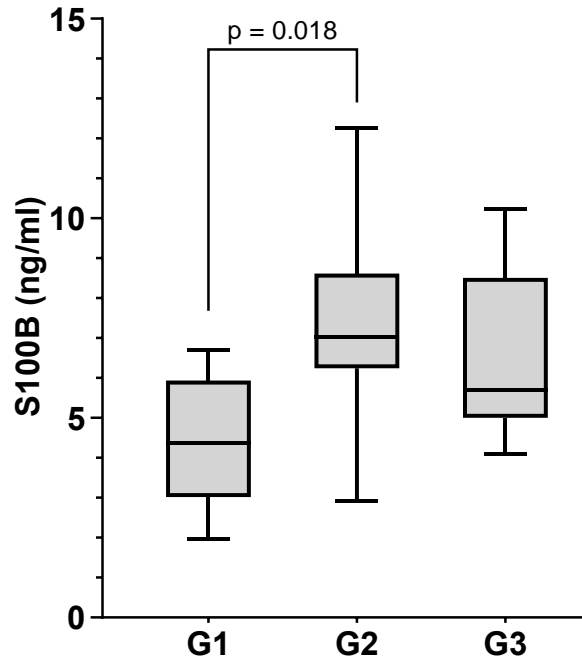
KYNA: kynurenic acid, S100B: S100 calcium binding protein B.

*Kruskal Wallis test

Aynı harfler, Bonferroni düzeltmesi ile ikili karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlılığın olmadığını gösterir.



Şekil 18. Gruplar arası KYNA seviyelerinin karşılaştırılması.



Şekil 19. Gruplar arası S100B seviyelerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada SKT oluşturulan ratlarda, kan S100B düzeyleri ve histopatolojik görüntüler karşılaştırılarak UIÖK'nin nöroprotektif etkinliğinin ve UIÖK mekanizmasında bir triptofan metabolizması ürünü olan KYNA'nın rolünün varlığının gösterilmesi amaçlandı. İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, S100B düzeylerinin UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha düşük olduğu saptandı. KYNA düzeyleri, beklenenin aksine UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha düşük seviyelerdeydi ve gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Histolojik değerlendirmede de, beklenenin aksine, medulla spinalis hasar skoru UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha yüksekti.

İskemi reperfüzyon hasarı medulla spinalis travması sonrasında ortaya çıkabilen klinik bir problemdir. Dokuya reperfüzyonla enerji temini sağlanır ve toksik metabolitler uzaklaştırılır. Ancak toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma dönmesi ciddi metabolik sonuçlara yol açar ve reperfüzyon lokal doku hasarını artırır. Reperfüzyonla aktive olan birçok mekanizma ile ortaya çıkan toksik ürünler, başta akciğer olmak üzere kalp, beyin, böbrek gibi uzak organlarda hasar oluşturur ve uzun süreli yoğun bakım izlemi gerektirebilecek *MOF*'a neden olabilmektedir (67; 104).

UIÖK, ilk olarak 1993'te Przyklenk ve arkadaşları tarafından kalp üzerinde tanımlanmıştır (5). Daha sonra yapılan çalışmalarda UIÖK'nin; kalp dışında karaciğer, bağırsak, pankreas, beyin ve akciğer dokularında da koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (6). Son 10 yılda UIÖK'nin serebral iskemik hasar üzerindeki etkisini değerlendiren bir dizi deneysel çalışma görülmüştür ve sonraki incelemelerde olası mekanizmalar tartışılmıştır (105); ayrıca, sayıca daha az ve genellikle ölçek olarak daha küçük olmasına rağmen, omurilik İ/R yaralanmasında UIÖK'nin (genellikle ekstremitte iskemisi yoluyla) değerini değerlendiren çeşitli çalışmalar vardır (14; 106; 107; 108). Bu çalışmaların çoğu, UIÖK ile bir dereceye kadar koruyucu etki olduğunu göstermiştir; bununla birlikte, sadece birkaçı bu etkinin elde edildiği potansiyel mekanizmaları araştırmıştır. Bu çalışmalarda, hasarı önlemeye atfedilen mekanizmalar, ilk İ/R hasarına yanıt olarak artan antioksidan kapasiteyi (14), glutamat salınımının ve KYNA aracılığıyla ventral boynuzda

bulunan glutamat kapılı katyon kanallarının (N-metil-D-aspartat; NMDA) baskılanmasını (107) ve kannabinoid reseptörleri aracılığıyla kan-beyin bariyeri hasarının önlenmesini içermektedir (109).

UIÖK' nin İ/R hasarını azaltmaktaki etkisini gösteren çalışmalar, spinal kord İ/R hasarından korunmada noninvaziv bir yöntem arayışını gündeme getirmiştir. Küntscher ve arkadaşları (110), geçici iskemi oluştururken damar kan akımını klemple direkt kesmek yerine noninvaziv turnike uygulamasının UIÖK'de alternatif bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple çalışmamızda, ekstremiteye turnike uygulaması ile yapılan UIÖK yöntemi kullanıldı.

Bu çalışmada kolay temin edilebilmesi, deneysel İ/R ve UIÖK modellerinin kullanıldığı çalışmalarda daha çok rat kullanılmış olması nedeniyle deney hayvanı olarak rat seçildi (106; 107).

Kalsiyum bağlayıcı proteinler ailesinin bir üyesi olan ve esas olarak glial hücrelerin sitozolünde bulunan S100B, nöronal hasarın biyokimyasal belirteçlerindedir. S100B; glial hücre hasarından sonra, BOS ve serumda artan konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Yüksek serum S100B seviyeleri; minör kafa travması (55; 56), stroke (57; 58; 59; 60; 61; 62) ve kardiyopulmoner bypass sonrası nörolojik komplikasyonlarla başvuran kardiyak cerrahi hastalarında (63; 64; 65; 66) bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda, serum S100B proteininin, nörolojik hasarı, NSE'ye göre daha yüksek özgüllük, duyarlılık, pozitif ve negatif prediktif değerler ile öngördüğü; nöron hasarının en umut verici serum belirteci olduğu belirtilmiştir (11). Bu nedenle çalışmamızda, İ/R hasarı göstergesi olarak S100B ve histopatolojik hasar skoru kullanıldı.

KYNA, bir triptofan metabolizma ürünüdür ve triptofanın kinürenin yolu aracılığıyla parçalanması, indolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) tarafından başlatılır. IDO sentezi, interferon gama ve diğer proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılır. IDO, triptofanın N-formil kinürenine dönüşümünü katalize eder, bu ürün daha sonra kinürenin formamidaz tarafından kinürenine (KYN) dönüştürülür. KYN, kinürenin amino transferazlar (KATs) tarafından KYNA'ya dönüştürülebilir. KYNA, N-metil-D-aspartik asit (NMDA) reseptör antagonisti olduğu için nöroprotektif olarak kabul edilmektedir. Kinürenin 3-monooksijenaz (KMO) ise, KYN'yi 3-hidroksikinürenine (3OHKYN) dönüştürür. N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör agonisti bir nörotoksik

ajan olan kinolinik asit (QUIN) de bu yolda oluşur (99). Kinürenin yolunu araştıran önceki çalışmalar; KYNA'nın, murin modellerinde İ/R ile ilişkili retinal ganglion ölümünü (99) ve insanlarda şiddetli travmatik beyin hasarı sonrası meydana gelen nörotoksisiteyi önlediğini (111) öne sürmüştür. UIÖK'nin mekanizması tam olarak açıklanamamaktadır (7). Ancak son zamanlarda yapılan deneysel gözlemler, oksijen algılayan enzim PHD2'nin hipoksik inhibisyonunun; alfa-ketoglutaratın artmış seviyelerine ve dolaşımdaki KYNA miktarında artışlara yol açabileceğini, böylece UIÖK'ye büyük ölçüde aracılık edebileceğini göstermiştir (8). Bu nedenle çalışmamızda, UIÖK mekanizmasında bir triptofan metabolizması ürünü olan KYNA'nın rolünün varlığının gösterilmesi amaçlandı.

Çalışmamıza benzer şekilde erkek Sprague-Dawley cinsi erişkin ratlar ile gerçekleştirilen, UIÖK'nin spinal kord iskemik hasarı sonrası, ekstremitelerdeki motor ve duysal fonksiyonlar üzerine etkisini inceleyen başka bir çalışmanın deney modelinde UIÖK; arka ekstremiteye 10'ar dakikalık 3 döngü şeklinde uygulanmıştır (106). Bu sebeple çalışmamızda da, UIÖK deney modeli, arka ekstremiteye 10'ar dakikalık 3 döngü olacak şekilde belirlendi.

Spinal travma oluşturulmasında standardizasyonu sağlayabilmek için Rivlin ve Tator tarafından tarif edilen klip kompresyon modeli uygulandı (112). Bu modelde daha önce ratlarla yapılmış çalışmalara benzer şekilde, 63 g kapanma basıncı uygulayan anevrizma klipi (Aesculap FE 721K) kullanıldı ve sıkıştırma süresi 1 dk. olarak belirlendi (113).

Bu çalışmada SKT sonrasında nörolojik hasar olduğu biyokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle gösterildi. İ/R grubundaki histopatolojik ve biyokimyasal (S100B ve KYNA) değişikliklerin *Sham* grubundan anlamlı olarak farklı oluşu İ/R modelinin doğru uygulandığını göstermektedir.

Çalışmamızda; UIÖK+İ/R uygulanan grup ve İ/R uygulanan grup arasındaki S100B düzeylerindeki farklılık, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Gruplar arası anlamlı bir fark bulunmaması, koruyucu etkinliğin biyokimyasal olarak gösterilemediğine işaret etmektedir. Denek sayısının daha fazla olması durumunda, bu farkın anlamlılık kazanabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; KYNA düzeyleri, beklenenin aksine UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha düşük seviyelerdeydi ve gruplar arası farklılık istatistiksel

olarak anlamlı bulunmadı. Bu sonuçlar, UIÖK mekanizmasında bir triptofan metabolizması ürünü olan KYNA'nın rolünün varlığının biyokimyasal olarak gösterilemediğine işaret etmektedir. Ancak KYNA düzeylerinin gruplar arasındaki değişim eğiliminin S100B ile benzerlik göstermesi, KYNA'nın da S100B gibi, bir nörolojik hasar belirteci olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Denek sayısının daha fazla olması durumunda, gruplar arasındaki farkın anlamlılık kazanabileceği ve gelecekte yapılacak daha fazla çalışmayla KYNA'nın da bir nörolojik hasar belirteci olarak kullanılıp kullanılmayacağına açıklığa kavuşabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; UIÖK+İ/R ve İ/R gruplarının, gri cevher ventral ve dorsal boynuz histopatolojik hasar skorlarının eşit; gri cevher intermediate kolon, ventral ve ventrolateral beyaz cevher histopatolojik hasar skorlarının ise beklenenin aksine, UIÖK+İ/R grubunda İ/R grubuna göre daha yüksek olduğu sonucuna varıldı. Bu durum, UIÖK'nin koruyucu etkinliğinin histopatolojik olarak gösterilemediğine işaret etmektedir. Denek sayısının daha fazla olması durumunda, koruyucu etkinliğin gösterilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, histopatolojik değerlendirme sırasında, bazı örneklerde spinal kordun bütünlüğünün tam olarak korunamadığı izlendi. Spinal kordun tam bir bütün olarak izole edilebileceği gelecek çalışmalarda, sonuçların da değişiklik gösterebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda; tüm ratlardan işlem sonrası 1. saatte kan alındı, daha sonra tüm ratlar kurban edildi ve histopatolojik inceleme için, her birinin medulla spinalisinden doku örneği alındı. Ancak; elektif servikal dekompresyon cerrahisi uygulanan hastalarda uzak iskemik önkoşullamanın biyokimyasal belirteçler ve nörolojik sonuçlar üzerine etkilerini inceleyen başka bir insan deneyinde, S100B seviyeleri postoperatif 6. saatten itibaren, postoperatif 7. güne kadar belirli aralıklarla takip edilmiş ve sonuçlarda gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (9). Bizim çalışmamızın, ağırlıkları 250-300 g arasında değişen Sprague-Dawley cinsi ratlarla gerçekleştirilmiş olması ve bu ratların postoperatif dönemde uzun süre yaşatılamaması sebebiyle, kan ve histopatolojik örneklerin tek bir rattan belirli aralıklarla, uzun süreçte eldesi gerçekleştirilemedi. Ağırlığı daha fazla olan deney hayvanları veya insanlar ile yapılacak deneylerde, daha farklı ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. İlk olarak, biyokimyasal ve histolojik sonuçlarla İ/R hasar gelişimi kanıtlanmış olmasına rağmen, UIÖK'nin yeterli süre ve sayıda uygulanıp uygulanmadığını tespit edebileceğimiz bir yöntem yoktu. Bu, 2 tur UIÖK'nin (24 saatlik aralık) İ/R ile ilişkili biyokimyasal belirteçler açısından tek bir UIÖK turundan nispeten daha iyi olduğunun gösterildiği yakın tarihli bir çalışma (106) tarafından önemli olduğu belirtilen kritik bir noktadır ve farklı UIÖK uygulamalarına sahip ek grupların dahil edildiği gelecekteki çalışmalara fayda sağlayabilir. İkinci olarak, her gruptaki düşük rat sayısı, anlamlı istatistiksel analiz eldesini önlemiş olabilir. Bununla birlikte, bu durum, hayvan çalışmalarında doğal ve kaçınılmazdır ve bu sınırlama, bu çalışmada, UIÖK+İ/R grubundaki üç sıçanın erken ölümüyle belirginleşmiş olabilir. Üçüncü olarak, medulla spinalis İ/R hasarının tek biyokimyasal belirteci olarak S100B seviyesini kullandık. S100B'nin bu bağlamda doğru bir belirteç olduğu bilinmesine rağmen, diğer olası belirteçler de dahil edilerek veriler genişletilebilir ve KYNA seviyeleri ile ilişkiler hakkında daha fazla bilgi sağlanabilirdi. Son olarak, kinürenin yolundaki bir nörotoksik ajan olan kinolinik asit düzeyinin ölçümü de sonuçlar açısından yol gösterici olabilirdi.

UIÖK; SSS'de ek stres oluşturmada, operasyon sırasında cerrahi süre ve kan kaybını arttırmaksızın kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir yöntem olabilir. Bu çalışma modeli, SKT öncesinde kolay uygulanabileceği ve kliniğe katkı sağlayabileceği nedeniyle tercih edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, S100B ve KYNA seviyelerinin ve nöronal hasar için histolojik skorların, bir rat spinal İ/R hasarı modelinde önemli ölçüde arttığını, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, S100B ve KYNA düzeylerinin UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha düşük olduğunu gösterdi. Histolojik değerlendirmede de, medulla spinalis hasar skoru UIÖK+İ/R grubunda, İ/R grubuna göre daha yüksekti. Veriler KYNA'nın UIÖK mekanizmasındaki rolüne ve UIÖK'nin nöroprotektif etkisine ilişkin sonuç çıkarmak için yetersizdi. Daha geniş metabolit analizi ile daha uzun süreli takip kullanan daha ileri çalışmaların KYNA'nın ve/veya kinürenin yolunun medulla spinalisin İ/R hasarı ile ilişkili olup olmadığını aydınlatmak için değerli olabileceğine inanıyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology*. 2001;94(6):1133-1138. doi:10.1097/00000542-200106000-00030
2. Uysal Aİ. Ratlarda karaciğer iskemi reperfüzyon modelinde uzak iskemik önkoşullama ve uzak iskemik önkoşullamaya eklenen n-asetil sisteinin etkilerinin karşılaştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. 2011.
3. Ozcan O, Erdal H, Yonden Z. İskemi-reperfüzyon hasarı ve oksidatif stress ilişkisine biyokimyasal bakış. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*. 2015 Sep 30;6(23):27-33.
4. Akkoç H, Kelle İ, Ebru KA, Kılınç N. Sıçan Modelinde Uzak İskemik Önkoşullamanın Akciğerdeki İskemi Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*. 2008;35(3):159-66.
5. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*. 1993;87(3):893-899. doi:10.1161/01.cir.87.3.893
6. Öncel TU, Dinçer PÇ, Cinel İ. İskemik önkoşullamanın klinik önemi. *Göğüs-Kalp-Damar Anestezi ve Yoğun Bakım Derneği Dergisi*. 2012;2012(1):1-0.
7. Hausenloy DJ, Yellon DM. Remote ischaemic preconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Cardiovasc Res*. 2008;79(3):377-386. doi:10.1093/cvr/cvn114
8. Gleadle JM, Mazzone A. Remote ischaemic preconditioning: closer to the mechanism?. *F1000Res*. 2016;5:2846. Published 2016 Dec 13. doi:10.12688/f1000research.9633.1
9. Hu S, Dong HL, Li YZ, et al. Effects of remote ischemic preconditioning on biochemical markers and neurologic outcomes in patients undergoing elective cervical decompression surgery: a prospective randomized controlled trial [published correction appears in *J Neurosurg Anesthesiol*. 2010 Apr;22(2):157]. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2010;22(1):46-52. doi:10.1097/ANA.0b013e3181c572bd

10. Selimoglu O, Ugurlucan M, Basaran M, et al. Efficacy of remote ischaemic preconditioning for spinal cord protection against ischaemic injury: association with heat shock protein expression. *Folia Neuropathol.* 2008;46(3):204-212.
11. Raabe A, Grolms C, Seifert V. Serum markers of brain damage and outcome prediction in patients after severe head injury. *Br J Neurosurg.* 1999;13(1):56-59. doi:10.1080/02688699944195
12. Hajduková L, Sobek O, Prchalová D, et al. Biomarkers of Brain Damage: S100B and NSE Concentrations in Cerebrospinal Fluid--A Normative Study. *Biomed Res Int.* 2015;2015:379071. doi:10.1155/2015/379071
13. Sharif S, Jazaib Ali MY. Outcome Prediction in Spinal Cord Injury: Myth or Reality. *World Neurosurg.* 2020;140:574-590. doi:10.1016/j.wneu.2020.05.043
14. Dong HL, Zhang Y, Su BX, et al. Limb remote ischemic preconditioning protects the spinal cord from ischemia-reperfusion injury: a newly identified nonneuronal but reactive oxygen species-dependent pathway. *Anesthesiology.* 2010;112(4):881-891. doi:10.1097/ALN.0b013e3181d0486d
15. Cambria RP, Clouse WD, Davison JK, Dunn PF, Corey M, Dorer D. Thoracoabdominal aneurysm repair: results with 337 operations performed over a 15-year interval. *Ann Surg.* 2002;236(4):471-479. doi:10.1097/00000658-200210000-00010
16. Coselli JS, LeMaire SA, Miller CC 3rd, et al. Mortality and paraplegia after thoracoabdominal aortic aneurysm repair: a risk factor analysis. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(2):409-414. doi:10.1016/s0003-4975(99)01478-2
17. Ong B, Wilson JR, Henzel MK. Management of the Patient with Chronic Spinal Cord Injury. *Med Clin North Am.* 2020;104(2):263-278. doi:10.1016/j.mcna.2019.10.006
18. vanMiddendorp JJ, Goss B, Urquhart S, Atresh S, Williams RP, Schuetz M. Diagnosis and prognosis of traumatic spinal cord injury. *Global Spine J.* 2011;1(1):1-8. doi:10.1055/s-0031-1296049
19. Li S, Hafeez A, Noorulla F, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia. *Prog Neurobiol.* 2017;157:79-91. doi:10.1016/j.pneurobio.2017.01.001

20. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current Mechanistic Concepts in Ischemia and Reperfusion Injury. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(4):1650-1667. doi:10.1159/000489241
21. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2012;298:229-317. doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00006-7
22. Boengler K, Schulz R, Heusch G. Loss of cardioprotection with ageing. *Cardiovasc Res*. 2009;83(2):247-261. doi:10.1093/cvr/cvp033
23. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev*. 2007;59(4):418-458. doi:10.1124/pr.107.06002
24. Cerretelli P. Muscle energetics and ultrastructure in chronic hypoxia. *Respiration*. 1992;59Suppl 2:24-29. doi:10.1159/000196117
25. Buttgerit F, Brand MD. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells. *Biochem J*. 1995;312(Pt 1)(Pt 1):163-167. doi:10.1042/bj3120163
26. Boutilier RG, St-Pierre J. Surviving hypoxia without really dying. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2000;126(4):481-490. doi:10.1016/s1095-6433(00)00234-8
27. Bulkley GB. Free radical-mediated reperfusion injury: a selective review. *Br J Cancer Suppl*. 1987;8:66-73.
28. JENNINGS RB, SOMMERS HM, SMYTH GA, FLACK HA, LINN H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68-78.
29. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007;357(11):1121-1135. doi:10.1056/NEJMra071667
30. Baines CP. The mitochondrial permeability transition pore and ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2009;104(2):181-188. doi:10.1007/s00395-009-0004-8
31. Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(6):850-857.

- doi:10.1016/j.yjmcc.2009.02.007
32. Baines CP. The cardiac mitochondrion: nexus of stress. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:61-80. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135929
 33. Murphy E, Steenbergen C. Ion transport and energetics during cell death and protection. *Physiology (Bethesda).* 2008;23:115-123. doi:10.1152/physiol.00044.2007
 34. Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301(5):H1723-H1741. doi:10.1152/ajpheart.00553.2011
 35. Talukder MA, Zweier JL, Periasamy M. Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovasc Res.* 2009;84(3):345-352. doi:10.1093/cvr/cvp264
 36. Szydlowska K, Tymianski M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium.* 2010;47(2):122-129. doi:10.1016/j.ceca.2010.01.003
 37. Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797(6-7):607-618. doi:10.1016/j.bbabi.2010.05.005
 38. Croall DE, Ersfeld K. The calpains: modular designs and functional diversity. *Genome Biol.* 2007;8(6):218. doi:10.1186/gb-2007-8-6-218
 39. Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(3):F509-F517. doi:10.1152/ajprenal.2000.279.3.F509
 40. Sorimachi Y, Harada K, Saido TC, Ono T, Kawashima S, Yoshida K. Downregulation of calpastatin in rat heart after brief ischemia and reperfusion. *J Biochem.* 1997;122(4):743-748. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021818
 41. Ornellas FM, Ornellas DS, Martini SV, et al. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Therapy Accelerates Renal Ischemia-Reperfusion Injury Recovery by Modulating Inflammatory, Antioxidant and Apoptotic Related Molecules. *Cell Physiol Biochem.* 2017;41(5):1736-1752.

doi:10.1159/000471866

42. Granger DN. Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation*. 1999;6(3):167-178.
43. Granger DN, Korthuis RJ. Physiologic mechanisms of post ischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol*. 1995;57:311-332. doi:10.1146/annurev.ph.57.030195.001523
44. Kvietys PR, Granger DN. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2012;52(3):556-592. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.002
45. Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2012;133(2):230-255. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.11.004
46. Lindemann S, Klingel B, Fisch A, Meyer J, Darius H. Increased platelet sensitivity toward platelet inhibitors during physical exercise in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*. 1999;93(2):51-59. doi:10.1016/s0049-3848(98)00155-8
47. Pigazzi A, Heydrick S, Folli F, Benoit S, Michelson A, Loscalzo J. Nitric oxide inhibits thrombin receptor-activating peptide-induced phosphoinositide 3-kinase activity in human platelets. *J Biol Chem*. 1999;274(20):14368-14375. doi:10.1074/jbc.274.20.14368
48. Nieswandt B, Pleines I, Bender M. Platelet adhesion and activation mechanisms in arterial thrombosis and ischaemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2011;9 Suppl1:92-104. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04361.x
49. Thomas WS, Mori E, Copeland BR, Yu JQ, Morrissey JH, del Zoppo GJ. Tissue factor contributes to microvascular defects after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 1993;24(6):847. doi:10.1161/01.str.24.6.847
50. Ordy JM, Wengenack TM, Bialobok P, et al. Selective vulnerability and early progression of hippocampal CA1 pyramidal cell degeneration and GFAP-positive astrocyte reactivity in the rat four-vessel occlusion model of transient global ischemia. *Exp Neurol*. 1993;119(1):128-139.

doi:10.1006/exnr.1993.1014

51. Kristián T. Metabolic stages, mitochondria and calcium in hypoxic/ischemic brain damage. *Cell Calcium*. 2004;36(3-4):221-233. doi:10.1016/j.ceca.2004.02.016
52. Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. Brain tissue responses to ischemia. *J Clin Invest*. 2000;106(6):723-731. doi:10.1172/JCI11003
53. Adibhatla RM, Hatcher JF. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [published correction appears in *Antioxid Redox Signal*. 2010 Feb;12(2):321. Khanna, Savita [removed]; Kulkarni, Shrinivas K [removed]; Maher, Pamela [removed]; Mancuso, Cesare [removed]; Rapoport, Stanley I [removed]; Smith, Mark [removed]; Thomas, Bobby [removed]; Yagami, Tatsurou [removed]]. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(1):125-169. doi:10.1089/ars.2009.2668
54. Damle SS, Moore EE, Babu AN, Meng X, Fullerton DA, Banerjee A. Hemoglobin-based oxygen carrier induces heme oxygenase-1 in the heart and lung but not brain. *J Am Coll Surg*. 2009;208(4):592-598. doi:10.1016/j.jamcollsurg.2009.01.015
55. Ingebrigtsen T, Romner B, Kongstad P, Langbakk B. Increased serum concentrations of protein S-100 after minor head injury: a biochemical serum marker with prognostic value?. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1995;59(1):103-104. doi:10.1136/jnnp.59.1.103-a
56. Hu DN, McCormick SA, Ritch R. Isolation and culture of iris pigment epithelium from iridectomy specimens of eyes with and without exfoliation syndrome [published correction appears in *Arch Ophthalmol* 1997 May;115(5):650]. *Arch Ophthalmol*. 1997;115(1):89-94. doi:10.1001/archophth.1997.01100150091015
57. Persson L, Hårdemark HG, Gustafsson J, et al. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke*. 1987;18(5):911-918. doi:10.1161/01.str.18.5.911
58. Kim JS, Yoon SS, Kim YH, Ryu JS. Serial measurement of interleukin-6,

- transforming growth factor-beta, and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke*. 1996;27(9):1553-1557. doi:10.1161/01.str.27.9.1553
59. Fagnart OC, Sindic CJ, Laterre C. Particle counting immunoassay of S100 protein in serum. Possible relevance in tumors and ischemic disorders of the central nervous system. *Clin Chem*. 1988;34(7):1387-1391.
 60. Büttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke*. 1997;28(10):1961-1965. doi:10.1161/01.str.28.10.1961
 61. Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1997;28(10):1956-1960. doi:10.1161/01.str.28.10.1956
 62. Abraha HD, Butterworth RJ, Bath PM, Wassif WS, Garthwaite J, Sherwood RA. Serum S-100 protein, relationship to clinical outcome in acute stroke. *Ann Clin Biochem*. 1997;34 (Pt 5):546-550. doi:10.1177/000456329703400510
 63. Johnsson P, Lundqvist C, Lindgren A, Ferencz I, Alling C, Ståhl E. Cerebral complications after cardiac surgery assessed by S-100 and NSE levels in blood. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 1995;9(6):694-699. doi:10.1016/s1053-0770(05)80231-9
 64. Westaby S, Johnsson P, Parry AJ, et al. Serum S100 protein: a potential marker for cerebral events during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 1996;61(1):88-92. doi:10.1016/0003-4975(95)00904-3
 65. Taggart DP, Mazel JW, Bhattacharya K, et al. Comparison of serum S-100 beta levels during CABG and intracardiac operations. *Ann Thorac Surg*. 1997;63(2):492-496. doi:10.1016/s0003-4975(96)01229-5
 66. Astudillo R, Van der Linden J, Radegran K, Hansson LO, Aberg B. Elevated serum levels of S-100 after deep hypothermic arrest correlate with duration of circulatory arrest. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1996;10(12):1107-1113. doi:10.1016/s1010-7940(96)80358-7
 67. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255-266. doi:10.1002/(SICI)1096-

- 9896(200002)190:3<255::AID-PATH526>3.0.CO;2-6
68. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, et al. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(8):4760-4765. doi:10.1073/pnas.95.8.4760
 69. Souza DG, Mendonça VA, de A Castro MS, Poole S, Teixeira MM. Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*. 2002;135(2):303-312. doi:10.1038/sj.bjp.0704464
 70. DEMİRCAN S, YEŞİLDAG O, SOYLU K. İskemik Ön Koşullanma ve Warm-Up Fenomeni. *Türk Kardiyol Dern Arş*. 2002;30:640-646.
 71. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-1136. doi:10.1161/01.cir.74.5.1124
 72. Ovize M, Kloner RA, Hale SL, Przyklenk K. Coronary cyclic flow variations "precondition" ischemic myocardium. *Circulation*. 1992;85(2):779-789. doi:10.1161/01.cir.85.2.779
 73. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84(1):350-356. doi:10.1161/01.cir.84.1.350
 74. Li Y, Kloner RA. The cardioprotective effects of ischemic 'preconditioning' are not mediated by adenosine receptors in rat hearts. *Circulation*. 1993;87(5):1642-1648. doi:10.1161/01.cir.87.5.1642
 75. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet*. 1993;342(8866):276-277. doi:10.1016/0140-6736(93)91819-8
 76. Hakim AM. Could transient ischemic attacks have a cerebroprotective role?. *Stroke*. 1994;25(3):715-717. doi:10.1161/01.str.25.3.715
 77. DAHL NA, BALFOUR WM. PROLONGED ANOXIC SURVIVAL DUE TO ANOXIA PRE-EXPOSURE: BRAIN ATP, LACTATE, AND PYRUVATE. *Am J Physiol*. 1964;207:452-456. doi:10.1152/ajplegacy.1964.207.2.452

78. Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res.* 1991;561(2):203-211. doi:10.1016/0006-8993(91)91596-s
79. Dawson VL, Dawson TM. Neuronal ischaemic preconditioning. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(11):423-424. doi:10.1016/s0165-6147(00)01560-1
80. Kirino T. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(11):1283-1296. doi:10.1097/01.WCB.0000040942.89393.88
81. Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 2003;26(5):248-254. doi:10.1016/S0166-2236(03)00071-7
82. Hagberg H, Dammann O, Mallard C, Leviton A. Preconditioning and the developing brain. *Semin Perinatol.* 2004;28(6):389-395. doi:10.1053/j.semperi.2004.10.006
83. Sharp FR, Ran R, Lu A, et al. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 2004;1(1):26-35. doi:10.1602/neurorx.1.1.26
84. Li G, Chen S, Lou W, Lu E. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in canine lung transplantation. *Chin Med J (Engl).* 1998;111(10):870-873.
85. Li G, Chen S, Lu E, Hu T. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 1999;24(4):319-321.
86. Gasparri RI, Jannis NC, Flameng WJ, Lerut TE, Van Raemdonck DE. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rabbit. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999;16(6):639-646. doi:10.1016/s1010-7940(99)00335-8
87. Friedrich I, Spillner J, Lu EX, et al. Ischemic pre-conditioning of 5 minutes but not of 10 minutes improves lung function after warm ischemia in a canine model. *J Heart Lung Transplant.* 2001;20(9):985-995. doi:10.1016/s1053-2498(01)00290-x
88. Gueler F, Park JK, Rong S, et al. Statins attenuate ischemia-reperfusion injury by inducing heme oxygenase-1 in infiltrating macrophages. *Am J Pathol.* 2007;170(4):1192-1199. doi:10.2353/ajpath.2007.060782
89. Takaoka A, Nakae I, Mitsunami K, et al. Renal ischemia/reperfusion remotely improves myocardial energy metabolism during myocardial ischemia via

- adenosine receptors in rabbits: effects of "remote preconditioning". *J Am Coll Cardiol.* 1999;33(2):556-564. doi:10.1016/s0735-1097(98)00559-2
90. Liu ZJ, Chen C, Li XR, et al. Remote Ischemic Preconditioning-Mediated Neuroprotection against Stroke is Associated with Significant Alterations in Peripheral Immune Responses. *CNS Neurosci Ther.* 2016;22(1):43-52. doi:10.1111/cns.12448
91. Meng R, Asmaro K, Meng L, et al. Upper limb ischemic preconditioning prevents recurrent stroke in intracranial arterial stenosis. *Neurology.* 2012;79(18):1853-1861. doi:10.1212/WNL.0b013e318271f76a
92. Hess DC, Blauenfeldt RA, Andersen G, et al. Remote ischaemic conditioning-a new paradigm of self-protection in the brain. *Nat Rev Neurol.* 2015;11(12):698-710. doi:10.1038/nrneurol.2015.223
93. Hess DC, Khan MB, Hoda N, Morgan JC. Remote ischemic conditioning: a treatment for vascular cognitive impairment. *Brain Circ.* 2015;1(2):133-139. doi:10.4103/2394-8108.172885
94. Trumbower RD, Jayaraman A, Mitchell GS, Rymer WZ. Exposure to acute intermittent hypoxia augments somatic motor function in humans with incomplete spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair.* 2012;26(2):163-172. doi:10.1177/1545968311412055
95. Schega L, Peter B, Törpel A, Mutschler H, Isermann B, Hamacher D. Effects of intermittent hypoxia on cognitive performance and quality of life in elderly adults: a pilot study. *Gerontology.* 2013;59(4):316-323. doi:10.1159/000350927
96. Hayes HB, Jayaraman A, Herrmann M, Mitchell GS, Rymer WZ, Trumbower RD. Daily intermittent hypoxia enhances walking after chronic spinal cord injury: a randomized trial. *Neurology.* 2014;82(2):104-113. doi:10.1212/01.WNL.0000437416.34298.43
97. Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo. *Circulation.* 2002;106(23):2881-2883. doi:10.1161/01.cir.0000043806.51912.9b
98. Konstantinov IE, Li J, Cheung MM, et al. Remote ischemic preconditioning of the recipient reduces myocardial ischemia-reperfusion injury of the denervated

- donor heart via a Katp channel-dependent mechanism. *Transplantation*. 2005;79(12):1691-1695. doi:10.1097/01.tp.0000159137.76400.5d
99. Nahomi RB, Nam MH, Rankenberg J, et al. Kynurenic Acid Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Retinal Ganglion Cell Death in Mice. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5):1795. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/ijms21051795
 100. Egea-Guerrero JJ, Murillo-Cabezas F, Rodríguez-Rodríguez A, et al. Modelo experimental de lesión cerebral tipo masa en rata: expresión del daño cerebral mediante enolasa neuroespecífica y proteína S100B [An experimental model of mass-type brain damage in the rat: expression of brain damage based on neurospecific enolase and protein S100B]. *Med Intensiva*. 2014;38(4):218-225. doi:10.1016/j.medin.2013.03.015
 101. Faridaalee G, Keyghobadi Khajeh F. Serum and Cerebrospinal Fluid Levels of S-100 β Is A Biomarker for Spinal Cord Injury; a Systematic Review and Meta-Analysis. *Arch Acad Emerg Med*. 2019;7(1):e19. Published 2019 Feb 12.
 102. Dimar JR 2nd, Ante WA, Zhang YP, Glassman SD. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1996;21(16):1870-1876. doi:10.1097/00007632-199608150-00006
 103. van Gorp S, Leerink M, Kakinohana O, et al. Amelioration of motor/sensory dysfunction and spasticity in a rat model of acute lumbar spinal cord injury by human neural stem cell transplantation. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):57. Published 2013 May 28. doi:10.1186/scrt209
 104. Şahin E, Olguner Ç, Bodur H, Koca U ve ark. Uzak ve doğrudan iskemik önkoşullamanın karaciğerin reperfüzyon hasarı üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *Turkiye Klinikleri J Med Sci*. 2009;29(2):381-7.
 105. Sharma D, Maslov LN, Singh N, Jaggi AS. Remote ischemic preconditioning-induced neuroprotection in cerebral ischemia-reperfusion injury: Preclinical evidence and mechanisms. *Eur J Pharmacol*. 2020;883:173380. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173380
 106. Bashir SO, Morsy MD, El Agamy DF. Two episodes of remote ischemia preconditioning improve motor and sensory function of hind limbs after spinal

- cord ischemic injury. *J Spinal Cord Med.* 2020;43(6):878-887. doi:10.1080/10790268.2019.1600829
107. Mukai A, Suehiro K, Kimura A, et al. Protective effects of remote ischemic preconditioning against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2022;163(2):e137-e156. doi:10.1016/j.jtcvs.2020.03.094
 108. Karimipour M, Farjah GH, Molazadeh F, Ansari M, Pourheidar B. Protective Effect of Contralateral, Ipsilateral, and Bilateral Remote Ischemic Preconditioning on Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury in Rats. *Turk Neurosurg.* 2019;29(6):933-939. doi:10.5137/1019-5149.JTN.26237-19.3
 109. Jing N, et al. Remote Ischemia Preconditioning Attenuates Blood-Spinal Cord Barrier Breakdown in Rats Undergoing Spinal Cord Ischemia Reperfusion Injury: Associated with Activation and Upregulation of CB1 and CB2 Receptors. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43(6):2516-2524.
 110. Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann G. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery.* 2002;22(6):221-226. doi:10.1002/micr.10041
 111. Yan EB, Frugier T, Lim CK, et al. Activation of the kynurenine pathway and increased production of the excitotoxin quinolinic acid following traumatic brain injury in humans. *J Neuroinflammation.* 2015;12:110. Published 2015 May 30. doi:10.1186/s12974-015-0328-2
 112. Rivlin AS, Tator CH. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surg Neurol.* 1978;10(1):38-43.
 113. Polat E. Ratlarda oluşturulan medulla spinalis travma modelinde Aktive Protein C'nin nöroprotektif etkinliğinin araştırılması. *Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi.* 2010.