

## Ratlarda Deneysel Spinal Kord Hasar Modelinde Genisteinin Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması, Diffüz Tensor Görüntüleme ile Değerlendirilmesi\*

Gülşah ÖZTÜRK\*\*, Gökalp SİLAV\*\*\*, Said İNCİR\*\*\*\*, Ayça ARSLANHAN\*\*\*\*\*,  
Mustafa Ali AKÇETİN\*\*\*\*\*, Orkun Zafer TOKTAŞ\*\*\*\*\*, Deniz KONYA\*\*\*\*\*

### Öz

**Amaç:** Spinal kord hasarı (SKH), insidansı çok yüksek olmamasına rağmen, bu durumun sonuçları birey, aile ve toplum için son derece önemli sekellerle sonuçlanabilecek bir hastalıktır. Nöral hasar onarımı ile ilgili her geçen gün yeni çalışmalar umut vadetmekle birlikte SKH için kür olabilecek altın standart bir tedavi henüz yoktur. Bu çalışmada ratlarda ağırlık düşürme modeli kullanılarak oluşturulan spinal kord hasarı sonrası tedavi amaçlı verilen; bir tirozinkinaz

### Özgün Araştırma Makalesi (Original Research Article)

**Geliş / Received:** 27.05.2020 & **Kabul / Accepted:** 06.07.2020

**DOI:** <https://doi.org/10.38079/igusabder.742525>

\* Bu makale, Dr. Gülşah ÖZTÜRK'ün 2013 yılında Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi'nde kabul edilmiş ve tez danışmanı Dr. Mustafa Ali AKÇETİN olan "Ratlarda Deneysel Spinal Kord Hasar Modelinde Genistein'in Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması, Diffüz Tensor Görüntüleme ile Görüntülenmesi" başlıklı tıpta uzmanlık tezinden üretilmiştir.

\*\* Dr., Beyin ve Sinir Cerrahisi, Şişli Memorial Hastanesi, İstanbul, Türkiye; Dr. Öğr. Üyesi, İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon, İstanbul, Türkiye, E-posta: [turksah@hotmail.com](mailto:turksah@hotmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-2253-9037>

\*\*\* Doç. Dr., Beyin ve Sinir Cerrahisi, Şişli Memorial Hastanesi, İstanbul, Türkiye; İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Yüksekokulu, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon, İstanbul, Türkiye, E-Posta: [gsilav@yahoo.com](mailto:gsilav@yahoo.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0003-3060-5193>

\*\*\*\* Uzm. Dr., Koç Üniversitesi Hastanesi, Klinik Biyokimya, İstanbul, Türkiye, E-posta: [saidncr@gmail.com](mailto:saidncr@gmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-7700-7388>

\*\*\*\*\* Uzm. Biyolog, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, Türkiye, E-posta: [aycaarslanhan@hotmail.com](mailto:aycaarslanhan@hotmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-3980-0609>

\*\*\*\*\* Op. Dr., Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve sinir Cerrahisi Kliniği, İstanbul, Türkiye, E-posta: [encephalontr@yahoo.com](mailto:encephalontr@yahoo.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0003-1852-5449>

\*\*\*\*\* Doç. Dr., Bahçeşehir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, E-posta: [drzafertoktas@gmail.com](mailto:drzafertoktas@gmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-5842-5891>

\*\*\*\*\* Prof. Dr., Bahçeşehir Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye, E-posta: [drdkonya@hotmail.com](mailto:drdkonya@hotmail.com) **ORCID** <https://orcid.org/0000-0002-4263-6096>

inhibitörü olan Genistein (GEN) isimli fitoöstrojenin etkisi araştırılmış ve geç dönemde sayılı rat üzerindeki diffüzyon tensör görüntüleme (DTG) ile sonuçları değerlendirilmiştir.

**Yöntem:** Çalışma Marmara Üniversitesi Başbüyük Nörolojik Bilimler Enstitüsü'nde yapıldı. Çalışmada toplam 28 adet 200-250 gr ağırlığında Sprague-Dawley sıçan randomize olarak 4 eşit gruba bölündü: Grup 1 (n=7 sıçan) kontrol grubu (sadece laminektomi uygulanan), Grup 2 (n=7 sıçan) travma grubu, Grup 3 (n=7 sıçan) travma + dimetil sülfoksit (DMSO) uygulanmış grup, Grup 4 (n=7 sıçan) travma+DMSO+GEN (0,25 mg /kg/rat GEN) uygulanmış grup. Genistein DMSO aracılığıyla çözülebilen bir maddedir. Grup 1'e sadece T10-12 laminektomi uygulandı. Grup 2, 3 ve 4'e T10-12 total laminektomi sonrası ağırlık düşürme modeli kullanılarak spinal kord travması yapıldı. Grup 4'e 7 gün boyunca 0,25 mg/kg/rat GEN uygulandı. Grup 1'den bir, diğer gruplardan 3'er adet toplam 10 adet randomize seçilen ratın spinal kordu postoperatif 28. günde Diffüzyon tensör görüntüleme ile değerlendirildi. Alınan doku örnekleri Hematoksilen-Eosin (HE), Kristal Viole ve Luksol Fast Blue (LFB) ile boyanıp ışık mikroskopunda incelendi. Çalışmada kullanılan tüm ratlar postoperatif 6. saat, 24. saat, 7., 14., 21. ve 28. günlerde lökomotor derecelendirme skalası (BBB) kullanılarak değerlendirildi.

**Bulgular:** GEN grubunda, diğer travma gruplarına göre fonksiyonel iyileşme puanları daha iyi olmasına rağmen tüm travma grupları arasında anlamlı istatistiksel fark gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Travmadan 28 gün sonra alınan görüntü örneklerinde, travma uygulanan gruplarda, lezyon merkezinde fraksiyonel anizotropi (FA) değerlerinin azaldığı gözlenmiştir.

**Sonuç:** Spinal kord travmasında GEN etkinliği, GEN uygulanmış travma grubunda, diğer travma gruplarıyla karşılaştırıldığında nörolojik iyileşmede BBB motor skala sonuçlarına göre artış göstermiş olup istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmemiştir. Çalışma, spinal kord travmasında GEN kullanımı için temel bir bilgi düzeyi oluşturmuş olup daha geniş kapsamlı bir çalışmada doz bağımlı araştırma yapılabilir. Yardımcı tanısal araç olarak kullanılan DTG'nin travma sonrası takipte önemli rol alabileceği öngörülmüştür.

**Anahtar sözcükler:** Genistein, omurilik travması, diffüzyon tensor görüntüleme.

### **Investigation of Neuroprotective Effect of Genistein in Experimental Spinal Cord Injury Model in Rats, Evaluation with Diffuse Tensor Imaging**

#### **Abstract**

**Aim:** Spinal cord injury (SCI) is a wide spectrum of a devastating disease which has significant effects on individuals, families or society even though the incidence is low. Studies on neural tissue repair have huge progress in recent years but spinal cord injury still remains a troublesome condition with no definitive cure. In this study, we aimed to explore the effectiveness of Genistein

(GEN), a phytoestrogen and tyrosine kinase inhibitor in a rat thoracic weight drop SCI model and to evaluate the long term results with diffusion tensor imaging (DTI), locomotion and histopathological changes.

**Method:** This study was conducted at Marmara University Basibuyuk Neurological Sciences Institute. In our study twenty-eight, 250 g weighted, young adult Sprague-Dawley rats were used. They were randomly divided into four equivalent groups: 1.group Sham (n=7) 2. group Experimental spinal cord injury (SCI) (n=7) 3. group SCI + dimethyl sulfoxide (DMSO) (n=7) 4. group SCI+ DMSO+ GEN (0,25 mg /kg/rat GEN)(n=7). In the first sham group, only T10-12 laminectomy was done. Spinal cord trauma was performed in Group 2, 3 and 4 using the weight-drop model after T10-12 total laminectomy. GEN was dissolved in the vehicle DMSO. SCI+ DMSO+ GEN rat model: GEN (0,25 mg /kg/rat GEN) were given to rats subjected to SCI for 7 days. One rat from the first group, three from the 2nd group, three from 4th group, in total 10 rats were randomly chosen and magnetic resonance imaging (MRI) performed with DTI at 28th day. Tissue samples were stained with Hematoxylin-Eosin (HE), Crystal Viole and Luxol Fast Blue (LFB) and examined under a light microscope. The Basso-Beattie-Bresnehan (BBB) locomotor rating scale was performed at 6th hour, 24th hour and weekly for four weeks for all the rats.

**Results:** In GEN group, there was a higher functional improving but, there was no statistical significant differences ( $p>0.05$ ) between all trauma groups. At 28th day of the injury, we took images of all groups which had been chosen randomly and we found that Fractional Anisotropy (FA) decreased at the epicenter zone.

**Conclusion:** According to BBB motor scale results in terms of effectiveness of GEN in the spinal cord injury; although compared to the other groups, we obtained increased neurological recovery. Results were not statistically significant. Study creates a basic level of knowledge about the GEN dosage and activity in the spinal cord injury, but a more comprehensive dose-dependent research study should be performed. DTI seems as a helpful diagnostic tool in study and it can take an important role on follow-up after trauma.

**Keywords.** Genistein, spinal cord injury, diffusion tensor imaging,

## Giriş

Spinal kord hasarı (SKH) bireyin hareket edebilme kabiliyetini, seksüel fonksiyonlarını ve mesane kontrolünü etkileyerek yaşam kalitesini ciddi düzeyde bozan tüm dünyada ağır özürlülük halinin en sık sebeplerinden biridir<sup>1,2</sup>. Dünyada her yıl yüzbinlerce kişi

spinal kord hasarına uğramaktadır<sup>3</sup>. SKH toplumda sık görülmesine rağmen tanı ve prognoz için kullanılan yardımcı teknikler henüz standardize edilememiştir<sup>4</sup>.

Travmanın oluş şekli ve şiddetine sonucunda ortaya çıkan omurilik yaralanması birincil yaralanma olarak tanımlanır ve bu yaralanmayı takiben gelişen hipoksi ile ikincil hasar mekanizmaları aktive olur<sup>5,6</sup>. Nörolojik hasarı azaltabilmek adına SKH patofizyolojisi üzerine yapılan birçok çalışmada ikincil hasar üzerine odaklanılmıştır<sup>7</sup>. İkincil hasarın patofizyolojisi mikrosirkulatuar değişiklikler, oksidatif stres, iskemi, apoptozis, nekrozis ve ödem sonucu gelişir. Bu ikincil hasar, ilk hasar alanını daha da kötüleştirir ve ilk hasarın çevresinde tahrip edici lezyonlara neden olur<sup>8</sup>. Güncel tedavi yöntemlerinde amaç canlı nöral dokunun ikincil hasarını önlemek veya ikincil yaralanma mekanizmalarının sonuçlarını en aza indirmektir. Günümüze kadar yürütülmüş deneysel çalışmalarda SKH'da farklı ajanların etkisi araştırılmış ve bir kısmında nörolojik fonksiyonlarda düzelmeler kaydedilmiştir<sup>9,10</sup>. Özellikle D vitaminiyle ilişkili progesteron, eritropoetin ve metilprednizolonun nörolojik durumu iyileştirebilecek ajanlar olarak umut verici sonuçları yayınlanmıştır<sup>10</sup>. Bununla birlikte deneysel tedaviler klinik çalışmalarda standart tedavi olarak kabul görecektir şekilde başarılı olamamıştır. Özellikle klinik çalışmalar sonucunda SKH olan bireylerde metilprednizolon tedavisinin etkin olduğu görülmesine rağmen ciddi yan etkilere yol açtığı birçok çalışmada raporlanmıştır<sup>10-15</sup>.

Genistein (GEN) bir nonsteroidal fito-östrojendir ve kolaylıkla kan-beyin bariyerini geçebilir<sup>16-18</sup>. Birçok çalışmada antioksidan etki ve düşük östrojen aktivitesi ile nöroprotektif etkinliği gösterilmiştir<sup>19,20</sup>. Tek bir nöronun çevresindeki mikroortam içerisinde enflamasyonu azaltarak nöron ölümünü azaltabileceğine yönelik kanıtlar raporlanmıştır. SKH uygulanmış güncel bir deneysel çalışmada GEN yüklü olan nanofiberler travma sahasına uygulanarak biyokimyasal parametrelerde travmaya sekonder değişiklikler araştırılmış ve sonuç olarak santral sinir sistemi travmalarında enflamatuar durumları tedavi etmek için umut verici sonuçlar raporlamışlardır<sup>20</sup>. Bu çalışmamızda GEN'in SKH sonrası klinik sonuca etkisi araştırıldı. Geç dönemde belirli ratlarda difüzyon tensor görüntüleme (DTG) ile gösterilebilen ak madde hasarının uygulanan tedavi ile ilişkisi, bunun nörolojik fonksiyon sonuçları ve histolojik değerlendirme ile karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma Marmara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul'u tarafından 2012-10 numara ile Nisan 2012 tarihinde onay alınarak yapılmıştır. Çalışmada toplam 28 adet 200-250 g ağırlığında Sprague-Dawley sıçan kullanılmış ve randomize olarak 4 gruba bölünmüştür: Grup 1 (n=7 sıçan) kontrol grubu (sadece laminektomi uygulanan), Grup 2 (n=7 sıçan) travma grubu, Grup 3 (n=7 sıçan) travma + dimetil sülfoksit (DMSO) uygulanmış grup, Grup 4 (n=7 sıçan) travma+ DMSO + GEN uygulanmış grup. Tüm ratlar intraperitoneal (ip) 8 mg/kg xylazin hidroklorür (Rompun Bayer, İstanbul-TR) ve 10 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul-TR) kullanılarak sedatize edildi. Tüm ratlar özel tahtalara tespit edilip torakal bölgesi traş edildi, cerrahi sahaya polyvidon iyot (Batticon, Adeka, Samsun) ile lokal antisepsi yapıldı. İnterskapuler mesafe referans alındı, prone pozisyonda T9- L1 seviyesinde cilt ciltaltı geçildi. Çalışmada mikrocerrahi aletleri ve operasyon mikroskobu (Kaps, Almanya) kullanıldı. Paravertebral kas fasya açıldı ve kaslar laterale diseksiyon ile sıyrıldı. Torakal 10-12 laminaları görülerek total laminektomi uygulandı. Duramaterin sağlam olduğu görüldü, laminektomi sonrası belirli gruba modifiye Allen ağırlık düşürme modeli ile standart omurilik travması uygulandı. 5 mm çaplı 10 cm uzunluğundaki cam boru aracılığı ile 10 cm yükseklikten 10 gr ağırlık sağlam dura materin üzerine düşürülerek SKH gerçekleştirildi. Hemostaz sonrası adele ve deri anatomik yapısına uygun olarak kapatıldı. Ratlar oda ısısında uyandırıldı ve nörolojik motor fonksiyonları değerlendirildi. İlk grup olan kontrol grubunda sadece T10-12 total laminektomi uygulandı. Grup 2, 3 ve 4'e T10-12 total laminektomi sonrası ağırlık düşürme modeli kullanılarak spinal kord travması uygulandı. GEN maddesi dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözülmektedir. Grup 3'e travma uygulandıktan beş dakika sonra 100 µl/kg/rat ip verildi. Grup 4'e yine travmadan 5 dakika sonra 0,25 mg/kg/rat dozunda DMSO içerisinde çözülmüş GEN ip verildi. Sonrasında postoperatif 24.saat, 48.saat, 72.saat, 96.saat, 120.saat, 144.saat ve 168.saat olmak üzere 7 gün boyunca aynı doz GEN (Farmasina Tıbbi ve kimyevi Ürünler San. Tic., İstanbul) ip uygulandı. Daha önce SKH' da deneysel olarak kullanılmamış olan GEN, bu çalışmada ratlarda gastrointestinal sistem üzerine olan geçmiş çalışmalardaki kullanım dozu referans alınarak uygulanmıştır.

## Fonksiyonel Değerlendirme

Travma sonrası ratların nörolojik motor muayenesi Basso ve arkadaşlarının (BBB) tanımladığı semikantitatif lokomotor derecelendirme skalası ile iki araştırmacı tarafından gözlenerek değerlendirilmiştir<sup>21</sup>. Ratlardaki fonksiyonel motor becerilerde iyileşme bu skala ile incelenmiştir. Bu skala ile arka ayaklar ve tüm eklemler ayrıntılı olarak incelendi. Skala 0-21 arasında değişen puanlardan oluşmaktadır: 0 hiç hareketin olmaması, 21 sağlıklı motor muayeneyi göstermektedir. 0-8 arası skorlarda kalça, diz ve bilek eklemlerinin giderek artan derecelerde hareketini tanımlarken, 9-14 arasındakiler değişen düzeylerde ağırlığı taşıma, adımlama ve koordinasyonu göstermektedir. 15-21 arası skorlar ise testin en zayıf yönü olarak değerlendirilen pençenin pozisyonu ve kuyruğun pozisyonunun gözlenmesini içerir. Çalışmadaki tüm ratlara lokomotor derecelendirme skalası postoperatif 6.saat, 24.saat; 7., 14., 21. ve 28. gün bakılmıştır.

## Diffüzyon Tensor Görüntüleme (DTG)

Travma sonrası 28. günde 1. gruptan bir adet, 2., 3. ve 4. gruptan üçer adet rat alınarak ip 8 mg/kg xylazinhidroklorür (Rompun Bayer, İstanbul-TR) ve 10 mg/kg ketamin (Ketalar, Eczacıbaşı, İstanbul-TR) kullanılarak sedatize edilerek diffüz tensör görüntüleme yapıldı. Çalışmada 1.5 T Siemens Magnetom Espree MR ve 8 kanallı koil kullanıldı. Verilerin toplanmasının ardından DTG bilgileri bir Workstation yazılımı olan Syngo MRB 17 ile işlendi. Geometrik bozulmanın baştan düzeltilmesinin ardından, diffüzyon yönlerine göre renk kodlu haritaları, Apparent diffusion coefficient (ADC) haritaları üretildi. Her gruptan randomize seçilen toplam 10 adet ratın nörolojik sonuçlar ile korelasyonuna bakılmıştır. Ratların görüntülenmesinde alınan her kesit korda dik olacak şekilde alınmıştır. Range of interest (ROI) 2 ak madde alanından (V:ventral, D:dorsal) oluşmakta olup bu alanlar 8 kesitte lezyon merkezinden 3 mm kaudal ve 3 mm rostral şeklinde taranarak fraksiyonel anizotropi (FA) değerleri tanımlanmıştır. Repetition time (TR) 4,4 sn iken Echo time (TE) 130 ms idi. Difüzyon yönü 20 yönde alındı. Kullanılan koil 8 kanallı olup çapı 6 cm'dir.

## Histopatoloji

Bu çalışmada alınan örnekler Marmara Üniversitesi Nörolojik Bilimler Enstitüsü Patoloji laboratuvarında incelenmiştir. 4. haftanın sonunda tüm ratlar derin anestezi sonrası %4'lük parformaldehid intrakardiyak yolla perfüze edilip sakrifiye edildi. DTG

yapılmış olan 1. gruptan bir adet, 2., 3., ve 4. gruptan üçer adet ratın spinal kordu mikroskop altında T6-12 arası laminektomi genişletilerek formaldehidde saklanmak üzere alındı. Parafin blokların hazırlanması sonrası lezyon alanından 5µm kalınlığında kesitler alındı ve hemotoksilen-eozin boyası ile boyanarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

### İstatistiksel Değerlendirme

Veri istatistiklerinde ortalama, standart sapma değerleri kullanılmıştır. Değişken dağılımı Kolmogorov Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Niceliksel veri analizinde ANOVA test kullanıldı. Varyans homojenliğine göre alt analizlerde Tukey test ve Tamhane test kullanılmıştır. Analizlerde SPSS 21.0 programı kullanılmıştır.

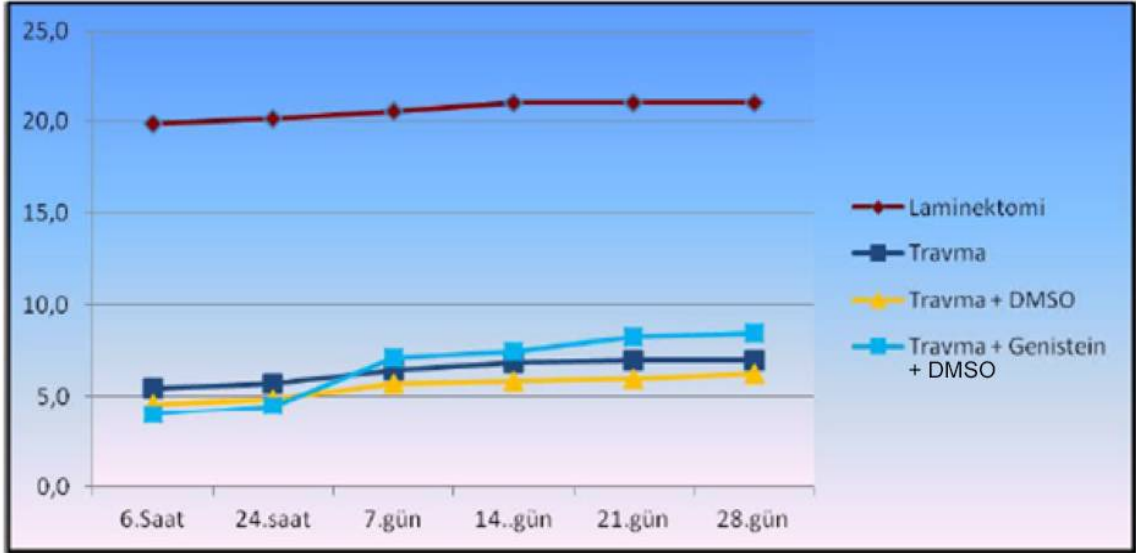
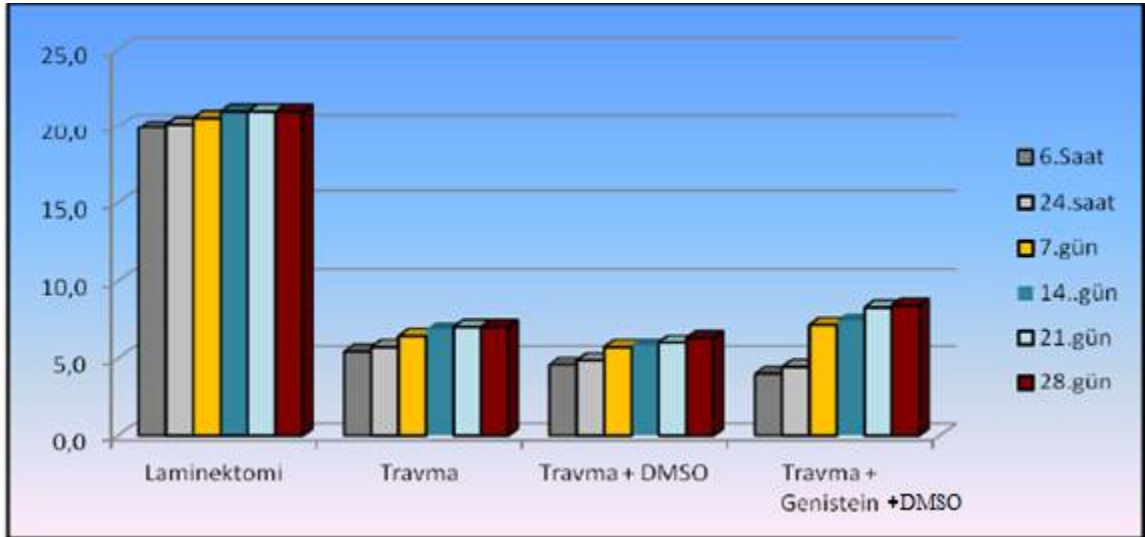
### Bulgular

Gruplardaki lökomotor değerlendirme Tablo 1, Grafik 1 ve 2’de gösterilmiştir.

**Tablo 1:** Dört grubun BBB skalası ile zamana göre motor fonksiyon değerlendirilmesi

	Laminektomi	Travma	Travma + DMSO	Travma + Genistein	p
	Ort.±s.s	Ort.±s.s	Ort.±s.s	Ort.±s.s	
6.Saat	19,86 ± 0,69	5,43 ± 1,99*	4,57 ± 2,23*	4,00 ± 1,83*	0,000
24.saat	20,14 ± 0,69	5,71 ± 1,89*	4,86 ± 1,86*	4,43 ± 1,51*	0,000
7.gün	20,57 ± 0,53	6,43 ± 1,99*	5,71 ± 2,06	7,14 ± 1,77*	0,000
14.gün	21,00 ± 0,00	6,86 ± 2,04*	5,86 ± 1,95*	7,43 ± 1,81*	0,000
21.gün	21,00 ± 0,00	7,00 ± 2,08*	6,00 ± 1,91*	8,29 ± 1,25*	0,000
28.gün	21,00 ± 0,00	7,00 ± 2,08*	6,29 ± 1,60*	8,43 ± 0,98*	0,000

ANOVA (Tukey test / Tamhane test) / \* p < 0,05 Laminektomi grubu ile kıyas

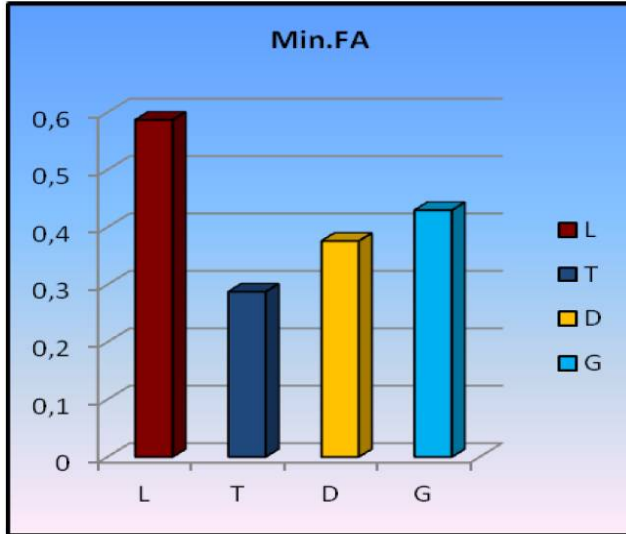
**Grafik 1:** Travma ve tedavi gruplarının zamana göre motor skorları**Grafik 2:** Dört grubun zamana göre fonksiyonel motor değerlendirilmesi

Laminektomi grubunda tüm zamanlardaki BBB skala değeri diğer gruplardan anlamlı olarak ( $p < 0.05$ ) daha yüksektir. Travma uygulanan tüm gruplarda motor muayenenin BBB skalasına göre travma sonrası 6. saatte anlamlı azaldığı gözlenmiştir ( $p < 0.001$ ). Omurilik travması oluşturulan sıçanlarda 6. saatteki motor fonksiyon skorları arasında anlamlı fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Travma gruplarının eşit travmaya maruz

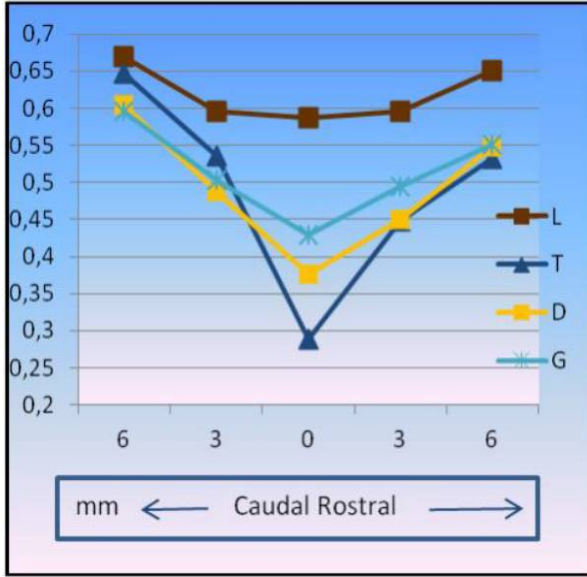


bırakıldığını göstermektedir. Tüm travma grupları içerisinde fonksiyonel iyileşmede GEN verilenlerde daha iyi sonuçlar elde edilse de, istatistiksel olarak anlamlı ( $p>0.05$ ) farklılık bulunmamıştır. Travma oluşturulan tüm gruplar ile sham grubu arasında motor fonksiyonların azalmasında anlamlı farklılık saptanmıştır ( $p<0.001$ ). Spinal kord travması uygulanan tüm ratlarda yapılan BBB skalasında 6. saatte anlamlı farklılık gözlenmemiştir ( $p>0.05$ ). Tüm gruplarda eşit travma uygulandığı tespit edilmiştir. Geç dönemde çekilen DTG sonucunda elde edilen minimum FA değerlerinin ortalaması Grafik 3'te özetlenmiştir.

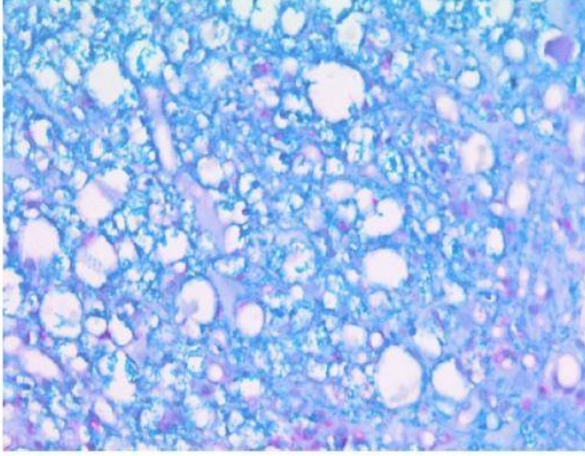
**Grafik 3:** Her gruptan alınan ratların ortalama en düşük FA değerleri L:Laminektomi T:Travma D:DMSO G:GEN



Travmadan 28 gün sonra her gruptan alınan görüntüler sonucunda, travma gruplarında lezyon merkezinde FA değerlerinin azaldığı gözlenmiştir (Grafik 4).

**Grafik 4:** Lezyon merkezi ve çevresindeki FA değerleri özeti

Lezyon sıfır noktasına denk gelecek şekilde 3 mm aralıklarla alınan FA değerlerinin ortalamasını grafikte ortaya konmuştur. Sonuçta travma gruplarında anlamlı düzeyde FA değerlerinde azalma gözlenmiştir. Lezyon düzeyinde travma grubunda en düşük FA düzeyi gözlenmiş olup en yüksek FA değeri laminektomi grubunun ardından GEN grubuna ait olduğu görüldü. Bu çalışmada tüm gruplardan alınmış olan spinal kord preparatlarından sadece 2'şer örnek kullanılmıştır, kalan preparatlar başka bir çalışmada kullanılmak üzere formolde saklanmıştır. İlk grupta yer alan (laminektomi) ratların Hematoksilen-Eosin (H&E), Kristal Viole (KV) ve Luksol Fast Blue (LFB) ile boyanmış omurilik enine kesitlerinde, medulla spinalis ve çevre periferik sinir dokusunda dikkati çeken histopatolojik bulgu izlenmemiştir. Saf travma grubunda beyaz cevherde demiyelinizasyon, vakoulizasyon, minimal inflamasyon DMSO + travma grubunda minimal inflamasyon, vakoulizasyon ve GEN kullanılan ratlarda reaktif gliozis, minimal inflamasyon, nissl maddesinde nükleol belirginliği gözlenmiş olup (Resim 1); travma uygulanan 3 grupta da ödem görülmüştür.

**Resim 1:** Travma + GEN Grubu: LFB ile boyama, yoğun vakoulizasyon**Tartışma**

İkincil spinal kord hasarı, ilk hasar sonrası ortaya çıkan multifaktöryel inflamatuvar süreçler sonucu oluşur<sup>5,7-10</sup>. Sentetik bir glukokortikoid olan Metilprednizolon halen klinikte SKH sonrası ilk tercih edilen ilaçtır<sup>11,22</sup>. Ciddi yan etkileri kullanımını kısıtlamaktadır. Laboratuvarında faydası görülmüş ama klinik pratikte hasta üzerinde net etkisi gözlenen standart tedavi haline gelmiş bir medikal tedavi henüz bulunmamaktadır. Bu yüzden yeni tedavi ajanları araştırılmaya devam etmektedir<sup>10</sup>. SKH sonrası kan beyin bariyerinin bozulması enflamasyona ve oksidatif strese yol açarak doku hasarı ve nörolojik defisit gelişmesinde anahtar roledir<sup>22</sup>. Akut SKH sonrası östrojen (17- $\beta$ -estradiol) kullanımı ile antiinflamatuvar, antioksidan etki ve apoptoziste azalma ve beyaz madde koruyuculuğunda artış sağlandığı deneysel çalışmalarda raporlanmıştır<sup>23,24</sup>. Ayrıca östrojen tedavisi sonrası ratlarda myelin kaybında ve ödemde azalma gözlenmiştir<sup>25</sup>. Östrojenin ratlarda SKH sonrası pozitif etkileri raporlanmış olmasına rağmen, insanlarda uzun dönem östrojen kullanımının özellikle meme olmak üzere endometriyal ve over kanser riskini arttırdığı bilinmekle birlikte, ciddi tromboz riski, felç, kalp hastalığı ve erkeklerdeki feminizasyon gibi yan etkileri nedeniyle nörodejeneratif hastalıklarda kullanımı yasaklanmıştır<sup>20,26</sup>. Yan etkileri olmayan doğal içeriklerden GEN doğal bir non-steroidal fitoöstrojen olup östrojen reseptör  $\beta$  agonisti (ER $\beta$ ) olarak hücresel fonksiyonlarda antiinflamatuvar ve antioksidan etki göstererek rol alır<sup>27-29</sup>. Tümör nekroz faktörünü (TNF- $\alpha$ ) suprese eder ve reaktif oksijen çeşitlerinin

(ROS) üretimini azaltır, lipid peroksidasyonu ve apoptotik sinyal kaskadını inhibe eder<sup>30,31</sup>. GEN ile hücre korunması; radikal oksijen ürünlerinin üretimini ve hücreye Ca girişinin önlenmesi, apoptotik faktörlerin aktivasyonunda azalma ile sağlanır<sup>32,33</sup>. Benzer bir koruma östrojen ile primer kortikal nöronlarda raporlanmıştır<sup>34</sup>. Bu açıdan GEN, melatonin gibi iyi bilinen ve daha önce ventral spinal kord hücre dizisinde bakılmış olan antioksidan olup, oksidatif strese anlamlı azalma gösterir<sup>35</sup>. Yapılan çalışmalarda GEN'in Erβ reseptörüne göre östrojen α reseptörüne (Erα) daha düşük düzeyde bağlandığı gözlenmiştir<sup>36</sup>. Bu sayede istenmeyen Erα agonist yan etkileri görülmez<sup>37</sup>. Bunun yanında östrojen benzeri aktivitesi dışında protein tirozin kinaz inhibisyonu veya down regülasyonu, immun sistem modülasyonu ve antioksidan aktivite gösterir<sup>38</sup>. Yine başka bir çalışmada Liu ve arkadaşları GEN'in kan beyin bariyerini geçerek santral sinir sistemine ulaşabildiğini raporlamıştır<sup>39</sup>. Sinir sistemi hücrelerinin ve immun hücrelerin neredeyse hepsinde Erβ reseptörü olduğu bilinmekte olup, bir ERβ agonisti olan GEN'in östrojen benzeri nöronal koruma etkisi ile SSS hasarında kullanımı önerilmektedir<sup>16,37,40</sup>.

## Sonuç

Bu çalışmada SKH uygulanmış ratlarda GEN kullanarak, bu maddenin kliniğe nasıl yansıdığı araştırılmıştır. GEN dozajları literatürde GEN'in gastrointestinal sistem üzerindeki etkisini araştıran farklı birçok çalışma değerlendirilerek uygulanmıştır<sup>41</sup>. BBB skalasına göre yapılan motor fonksiyonel değerlendirmede, travmaya uğrayan tüm deney gruplarında skorun kontrol grubuna göre anlamlı derecede düştüğü görülmüştür ( $p < 0.001$ ). Travmaya uğrayan tüm gruplarda (grup II, grup III, grup IV) 6. saatte yapılan motor fonksiyon değerlendirmelerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık yoktu ve tümü eşit travmaya uğramıştır ( $p > 0.05$ ). Travma sonrası GEN uygulamasının motor fonksiyon skorlarını artırdığı saptanmış, ancak istatistiksel olarak diğer gruplardan anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar; çalışmada uygulanmış olan GEN dozunun yetersiz olabileceğini ve çalışmada kullanılan dozun arttırılarak daha geniş kapsamlı bir çalışmada iyi sonuçlar alınabileceğini göstermektedir.

Çalışmaya başlarken DTG ile verilen medikal tedavinin etkinliğini görmek amaçlanmıştır. Bu da erken dönem ve geç dönem görüntülemeler arasındaki değişimi göstermek üzere planlanmıştır. Klasik MRG spinal kord hasarı sonrası aksonal içerik durumunu göstermede yeterli düzeyde sensitif değildir<sup>42,43</sup>. DTG altta yatan nöral

yapılardaki ince geometrik değişimlerde ve çeşitli patolojik evreleri gösterebilmede duyarlıdır<sup>44-47</sup>. Çok sayıda yapılmış olan hayvan ve insan üzerinde denenmiş ex vivo ya da in vivo çalışmalarda, çeşitli ek sekanslar ve teknik işlemler kullanılarak spinal travma sonrasında su difüzyonunda değişimler gözlenmiştir. Geçmişte yapılan çalışmalarda travmatik lezyonun merkezinde tipik olarak ADC değerinin arttığı, difüzyon anizotropinin azaldığı in vivo hayvan modellerinde ve ex vivo spinal kord preparatlarında gösterilmiştir<sup>44,48,49</sup>.

Normal kord ve travmatik lezyonlu bölgesinin difüzyon özellikleri ile ilgili bilgi literatürde genişçe yer almaktadır<sup>50-52</sup>. Aparna ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada akut hasar döneminde DTG değişimleri, yüksek mortalite nedeni ile incelenememiştir ve bu da travmanın erken döneminde tekrarlayan anesteziye maruz kalmaya bağlanmıştır<sup>53-54</sup>. Bu çalışmada yapılan erken dönem görüntüleme mortalite olmamıştır. Yapılan çekimlerde görüntü, lokal manyetik inhomojenite, metal implantlar, manyetik duyarlılık etkileri (spinal kanalın kemik yapıları), kimyasal kayma artefaktları (vertebradaki yağ dokusu ve paravertebral yumuşak doku), BOS pulsasyonu, nefes alma, yutma kaynaklı hareket artefaktları veya iç organlardaki fizyolojik hareket nedeniyle bozulabilir. Bu yüzden torasik ve üst lomber segmentlerde spinal kordun daha küçük olması ve bu bölgelerde daha fazla olası artefakta maruz kalınması nedeniyle en kaliteli DTG çekimleri servikal spinal kordda elde edilir<sup>47,55-58</sup>. Yeni tekniklerde, paralel görüntüleme ve kardiyak perdeleme ile DTG'nin kalitesi artmaktadır<sup>59,60</sup>. Bu çalışmada yapılan erken çekimlerde yukarıda bahsedilen artefaktlar ile baş edilemediği için erken çekimlere son verilmiştir. 28. günde sakrifiye edilmeden önce yapılan çekim sonuçlarına göre GEN kullanılan grupta travma uygulanmış olan diğer 2 gruba göre FA değerlerinin anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlenmiştir. Nörolojik muayane ile karşılaştırıldığında muayenesinde düzelme olan ratlarda, diğer gruplara göre FA değerlerinde yüksek düşüş gözlenmemiştir.

Sonuçlar ağırlık düşürme ile oluşturulan spinal kord travmasında ilk kez kullanılmış olan GEN'in nörolojik muayenede istatistiksel anlamlı düzeyde farkını gösterememiş olsa da, yapılan çalışmada GEN dozunun ilk kez uygulandığı ve yetersiz olabileceği için umut verdiği düşünülmüştür. GEN doz bağımlı bir şekilde çalışılabilir ve yapılacak daha kapsamlı bir çalışmada GEN'in histopatolojik etkileri örnek sayısı artırılarak gösterilebilir. DTG nörobilim camiasında; çeşitli hastalıklarda anatomik değişiklikler,

düzelme mekanizmalarının ve nöral yolların gösterilmesinde yaygın kullanım adayı olan bir tekniktir. Çalışmada kullanılmış olan MRG cihazının 1.5 tesla olması nedeniyle alınan görüntülerde artefaktların bulunması, erken dönem DTG çekimi yapılmamış olunması, çekimin her rata uygulanamamış olması, bu çalışmadaki geliştirilmesi gereken konulardır.

### KAYNAKLAR

1. DeVivo MJ, Krause JS, Lammertse DP. Recent trends in mortality and causes of death among persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80(11):1411-1419.
2. Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, Wing PC. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. *Spinal Cord.* 2014;52(2):110-116.
3. McKinley WO, Jackson AB, Cardenas DD, DeVivo MJ. Long-term medical complications after traumatic spinal cord injury: a regional model systems analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 1999;80(11):1402-1410.
4. Ramer MS, Harper GP, Bradbury EJ. Progress in spinal cord research - a refined strategy for the International Spinal Research Trust. *Spinal Cord.* 2000;38(8):449-472.
5. Del Bigio MR, Johnson GE. Clinical presentation of spinal cord concussion. *Spine (Phila Pa 1976).* 1989;14(1):37-40.
6. Wilberger JE. *The Merck Manuals: The Merck Manual for Healthcare Professionals;* 2011.
7. Hilton BJ, Moulson AJ, Tetzlaff W. Neuroprotection and secondary damage following spinal cord injury: concepts and methods. *Neurosci Lett.* 2017;652:3-10.
8. Zwimpfer TJ, Bernstein M. Spinal cord concussion. *J Neurosurg.* 1990;72(6):894-900.

9. Griffin JM, Bradke F. Therapeutic repair for spinal cord injury: combinatory approaches to address a multifaceted problem. *EMBO Mol Med.* 2020;12(3):e11505.
10. Joaquim AF, Daniel JW, Schroeder GD, Vaccaro AR. Neuroprotective agents as an adjuvant treatment in patients with acute spinal cord injuries: a qualitative systematic review of randomized trials. *Clin Spine Surg.* 2020;33(2):65-75.
11. Bracken MB. Steroids for acute spinal cord injury. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;1:CD001046.
12. Young W, Bracken MB. The second national acute spinal cord injury study. *J Neurotrauma.* 1992;9(Suppl 1):S397-405.
13. Bracken MB, Shepard MJ, Collins WF, et al. A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the second national acute spinal cord injury study. *N Engl J Med.* 1990;322(20):1405-1411.
14. Bracken MB, Aldrich EF, Herr DL, et al. Clinical measurement, statistical analysis, and risk-benefit: controversies from trials of spinal injury. *J Trauma.* 2000;48(3):558-561.
15. Evaniew N, Belley-Cote EP, Fallah N, Noonan VK, Rivers CS, Dvorak MF. Methylprednisolone for the treatment of patients with acute spinal cord injuries: a systematic review and meta-analysis. *J Neurotrauma.* 2016;33(5):468-481.
16. Liu LX, Chen WF, Xie JX, Wong MS. Neuroprotective effects of genistein on dopaminergic neurons in the mice model of Parkinson's disease. *Neurosci Res.* 2008;60(2):156-161.
17. McClain RM, Wolz E, Davidovich A, Pfannkuch F, Bausch J. Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(10):1461-1482.

18. Tsai TH. Concurrent measurement of unbound genistein in the blood, brain and bile of anesthetized rats using microdialysis and its pharmacokinetic application. *J Chromatogr A*. 2005;1073(1-2):317-322.
19. McDowell ML, Das A, Smith JA, Varma AK, Ray SK, Banik NL. Neuroprotective effects of genistein in VSC4.1 motoneurons exposed to activated microglial cytokines. *Neurochem Int*. 2011;59(2):175-184.
20. Ismail M, Ibrahim S, El-Amir A, El-Rafei AM, Allam NK, Abdellatif A. Genistein loaded nanofibers protect spinal cord tissue following experimental injury in rats. *Biomedicines*. 2018;6(4):96.
21. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
22. Bracken MB. Methylprednisolone and spinal cord injury. *J Neurosurg*. 2000;93(1 Suppl):175-179.
23. Sribnick EA, Samantaray S, Das A, et al. Postinjury estrogen treatment of chronic spinal cord injury improves locomotor function in rats. *J Neurosci Res*. 2010;88(8):1738-1750.
24. Kachadroka S, Hall AM, Niedzielko TL, Chongthammakun S, Floyd CL. Effect of endogenous androgens on 17beta-estradiol-mediated protection after spinal cord injury in male rats. *J Neurotrauma*. 2010;27(3):611-626.
25. Ritz MF, Hausmann ON. Effect of 17beta-estradiol on functional outcome, release of cytokines, astrocyte reactivity and inflammatory spreading after spinal cord injury in male rats. *Brain Res*. 2008;1203:177-188.
26. Morrow AL, Biggio G, Serra M, et al. The role of neuroactive steroids in ethanol/stress interactions: proceedings of symposium VII at the Volterra conference on alcohol and stress. *Alcohol*. 2009;43(7):521-530.
27. Simpkins JW, Singh M, Brock C, Etgen AM. Neuroprotection and estrogen receptors. *Neuroendocrinology*. 2012;96(2):119-130.



28. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*.1998;139(10):4252-4263.
29. Han S, Wu H, Li W, Gao P. Protective effects of genistein in homocysteine-induced endothelial cell inflammatory injury. *Mol Cell Biochem*. 2015;403(1-2):43-49.
30. Fotsis T, Pepper MS, Montesano R, et al. Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1998;12(4):649-666.
31. Kousidou O, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Effects of the natural isoflavonoid genistein on growth, signaling pathways and gene expression of matrix macromolecules by breast cancer cells. *Mini Rev Med Chem*. 2006;6(3):331-337.
32. Fuhrman B, Aviram M. Flavonoids protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2001;12(1):41-48.
33. McConkey DJ, Orrenius S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;239(2):357-366.
34. Sribnick EA, Ray SK, Nowak MW, Li L, Banik NL. 17beta-estradiol attenuates glutamate-induced apoptosis and preserves electrophysiologic function in primary cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2004;76(5):688-696.
35. Das A, McDowell M, Pava MJ, et al. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF-alpha toxicity involves membrane melatonin receptors. *J Pineal Res*. 2010;48(2):157-169.
36. Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, et al. Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(7):2690-2694.
37. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem*. 2001;276(21):17808-17814.

38. Duffy C, Perez K, Partridge A. Implications of phytoestrogen intake for breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 2007;57(5):260-277.
39. Liu J, Xu K, Wen G, et al. Comparison of the effects of genistein and zoledronic acid on the bone loss in OPG-deficient mice. *Bone.* 2008;42(5):950-959.
40. Groyer G, Eychenne B, Girard C, Rajkowski K, Schumacher M, Cadepond F. Expression and functional state of the corticosteroid receptors and 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in Schwann cells. *Endocrinology.* 2006;147(9):4339-4350.
41. Incir S, Bolayirli IM, Inan O, et al. The effects of genistein supplementation on fructose induced insulin resistance, oxidative stress and inflammation. *Life Sci.* 2016;158:57-62.
42. Ford JC, Hackney DB, Alsop DC, et al. MRI characterization of diffusion coefficients in a rat spinal cord injury model. *Magn Reson Med.* 1994;31(5):488-494.
43. Ellingson BM, Salamon N, Holly LT. Imaging techniques in spinal cord injury. *World Neurosurg.* 2014;82(6):1351-1358.
44. Schwartz ED, Hackney DB. Diffusion-weighted MRI and the evaluation of spinal cord axonal integrity following injury and treatment. *Exp Neurol.* 2003;184(2):570-589.
45. Ellingson BM, Ulmer JL, Kurpad SN, Schmit BD. Diffusion tensor MR imaging in chronic spinal cord injury. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(10):1976-1982.
46. Ellingson BM, Ulmer JL, Kurpad SN, Schmit BD. Diffusion tensor MR imaging of the neurologically intact human spinal cord. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008;29(7):1279-1284.
47. Demir A, Ries M, Moonen CT, et al. Diffusion-weighted MR imaging with apparent diffusion coefficient and apparent diffusion tensor maps in cervical spondylotic myelopathy. *Radiology.* 2003;229(1):37-43.

48. Ellingson BM, Kurpad SN, Schmit BD. Ex vivo diffusion tensor imaging and quantitative tractography of the rat spinal cord during long-term recovery from moderate spinal contusion. *J Magn Reson Imaging*. 2008;28(5):1068-1079.
49. Ellingson BM, Kurpad SN, Li SJ, Schmit BD. In vivo diffusion tensor imaging of the rat spinal cord at 9.4T. *J Magn Reson Imaging*. 2008;27(3):634-642.
50. Ellingson BM, Ulmer JL, Schmit BD. Morphology and morphometry of human chronic spinal cord injury using diffusion tensor imaging and fuzzy logic. *Ann Biomed Eng*. 2008;36(2):224-236.
51. Ellingson BM, Ulmer JL, Prost RW, Schmit BD. Morphology and morphometry in chronic spinal cord injury assessed using diffusion tensor imaging and fuzzy logic. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2006;2006:1885-1888.
52. Ellingson BM, Schmit BD, Kurpad SN. Lesion growth and degeneration patterns measured using diffusion tensor 9.4-T magnetic resonance imaging in rat spinal cord injury. *J Neurosurg Spine*. 2010;13(2):181-192.
53. Deo AA, Grill RJ, Hasan KM, Narayana PA. In vivo serial diffusion tensor imaging of experimental spinal cord injury. *J Neurosci Res*. 2006;83(5):801-810.
54. Madi S, Hasan KM, Narayana PA. Diffusion tensor imaging of in vivo and excised rat spinal cord at 7 T with an icosahedral encoding scheme. *Magn Reson Med*. 2005;53(1):118-125.
55. Lee JW, Kim JH, Park JB, et al. Diffusion tensor imaging and fiber tractography in cervical compressive myelopathy: preliminary results. *Skeletal Radiol*. 2011;40(12):1543-1551.
56. Motovylyak A, Skinner NP, Schmit BD, Wilkins N, Kurpad SN, Budde MD. Longitudinal in vivo diffusion magnetic resonance imaging remote from the lesion site in rat spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2019;36(9):1389-1398.
57. Kelley BJ, Harel NY, Kim CY, et al. Diffusion tensor imaging as a predictor of locomotor function after experimental spinal cord injury and recovery. *J Neurotrauma*. 2014;31(15):1362-1373.

58. Pease A, Miller R. The use of diffusion tensor imaging to evaluate the spinal cord in normal and abnormal dogs. *Vet Radiol Ultrasound*. 2011;52(5):492-497.
59. Wang F, Huang SL, He XJ, Li XH. Determination of the ideal rat model for spinal cord injury by diffusion tensor imaging. *Neuroreport*. 2014;25(17):1386-1392.
60. Wang-Leandro A, Hobert MK, Kramer S, Rohn K, Stein VM, Tipold A. The role of diffusion tensor imaging as an objective tool for the assessment of motor function recovery after paraplegia in a naturally-occurring large animal model of spinal cord injury. *J Transl Med*. 2018;16(1):258.