



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**ALFA LİPOİK ASİT'İN
İNSAN DEJENERE İNTERVERTEBRAL DİSK DOKUSU
PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE
POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

İRFAN AYDIN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. HANEFİ ÖZBEK

İSTANBUL - 2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın Seviyesi: Yüksek Lisans () Doktora (X)
Anabilim Dalı : Tıbbi Farmakoloji
Öğrenci : İrfan Aydın
Tez Başlığı : Alfa Lipoik Asit'in İnsan Dejenere İntervertebral Disk Dokusu
Primer Hücre Kültürleri Üzerine Potansiyel Etkilerinin
Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 26.07.2022

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	İzmir Bakırçay Üniversitesi	

Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Mustafa GÜZEL	İstanbul Medipol Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Arzu ŞAKUL	İstanbul Medipol Üniversitesi
Dr. Öğr. Üyesi Çağlar MACİT	İstanbul Medipol Üniversitesi
Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU	Marmara Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun
...../...../ tarih ve/..... - sayılı kararı ile şekil
yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür Vekili

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kuralları içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

İrfan AYDIN
İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, çok değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, danıştığım zamanlar da kıymetli zamanını ayırıp elinden gelenin fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini esirgemeyen, öğrettiği tüm değerli bilgilerden mesleki hayatımda da faydalanacağımı düşündüğüm, saygıdeğer tez danışmanı hocam Prof. Dr. Hanefi Özbek'e, bilgi ve tecrübelerini güler yüzlü ve samimi şekilde paylaşan ve yardımlarını benden esirgemeyen İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Dr. Öğr. Üye. Ayşe Arzu Sayın Şakul'a, eğitimime katkı sağlayan İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, olguların araştırmaya dahil edilme ve araştırmadan dışlanma kriterlerinde klinik bilgisini esirgemeyen ve primer kültürlerin kurulmasında kullanılan intervertebral disk dokularının cerrahi rezeksiyonunu sağlayan, Haliç Üniversitesi Tıp Fakültesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Numan Karaarslan'a, farmakomoleküler deneyler esnasında genetik ve moleküler düzeyde bilgi ve tecrübesi ile destek veren Namık Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Duygu Yaşar Şirin'e, eğitim ve öğrenim hayatım boyunca yanımda olan ve beni bugünlere getiren aileme, en kalbî duygularıyla sonsuz saygı ve teşekkürlerimi arz ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
RESİMLER LİSTESİ.....	x
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. İntervertebral Disk Yapısı	5
4.1.1. İntervertebral disk anatomisi ve fizyolojisi	5
4.1.2. İntervertebral disk histolojisi	6
4.1.3. İntervertebral disklerin beslenmesi.....	9
4.2. İntervertebral Disk Dejenerasyonu.....	10
4.2.1. İVD dejenerasyonunda doku beslenmesi.....	13
4.2.2. İVD dejenerasyonunda hücre kaybı.....	14
4.2.2.1. İVD dejenerasyonunda NP hücrelerinde apoptoz iç yolağı.....	14
4.2.2.2. İVD dejenerasyonunda NP hücrelerinde apoptoz dış yolağı.....	15
4.2.2.3. İVD dejenerasyonunda AF hücrelerinde apoptoz.....	16
4.2.2.3. İVD dejenerasyonunda kıkırdak plak hücrelerinde apoptoz.....	16
4.2.2.4. İVD dejenerasyonunda otofaji	16
4.2.3. İVD Dejenerasyonunun tedavisi	16
4.2.3.1. Mevcut tedavi yöntemleri	16
4.2.3.2. Biyolojik tedavi araştırmaları	18
4.3. Alfa Lipoik Asit (ALA).....	18
4.3.1. ALA'nın önemi.....	20
4.3.2. ALA'nın farmakokinetiği	21
4.3.3. ALA'nın farmakodinamiği	22

4.3.3.1. ALA'nın antioksidan potansiyeli.....	22
4.3.3.2. ALA'nın antidiyabetik etkisi.....	23
4.3.3.3. ALA'nın kanser hücreleri üzerine etkisi.....	23
4.3.3.4. ALA'nın Alzheimer hastalığı üzerine etkileri.....	27
4.3.3.5. ALA'nın üreme sistemi üzerine etkileri.....	28
4.3.3.6. ALA ile yapılan klinik araştırmalar.....	29
5. MATERYAL VE METOD.....	34
5.1. Araştırmaya Dahil Edilme ve Araştırmadan Dışlanma Kriterleri.....	34
5.2. Dejenere İVD Dokularının Cerrahi Rezeksiyonu.....	35
5.3. Primer Hücre Kùltürlerinin Hazırlanması.....	35
5.3.1. Primer hücre kùltürlerine ALA uygulanması.....	37
5.4. İnvirt Işık Mikroskopisi ve Floresan Mikroskopisine Yönelik Analizler.....	37
5.5. Molekùler Analizler.....	38
5.5.1. MTT-ELISA hücre canlılık, toksisite ve proliferasyon analizleri.....	38
5.5.2. Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemiyle gen ifadelerinin ölçümü.....	39
5.5.2.1 Hücrelerden total RNA izolasyonu.....	39
5.5.2.2. Ters transkriptaz PCR ile cDNA eldesi.....	40
5.5.2.3 Kantitatif gerçek zamanlı PCR.....	41
5.6. İstatistiksel Analizler.....	42
6. BULGULAR.....	43
7. TARTIşMA.....	48
8. SONUÇ.....	56
9. KAYNAKLAR.....	57
11. ETİK KURUL ONAYI.....	80
12. ÖZGEÇMİş.....	83

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACTβ	: Aktin beta
ADAMTS-7	: Trombospondin motifli disintegrin ve metalloproteinaz üyesi-7 (A member of a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-7)
AF	: Annulus fibrozus
Akt	: Protein kinaz B
ALA	: Alfa lipoik asid
Alb	: Albümin
AMP	: Adenozin mono-fosfat
AMPK	: Adenozin mono-fosfat aktive edici protein kinaz
AO/PI	: Akridin oranj/propidium iodür
ARE	: Arilesteraz
Atg	: Otofaji bağlantılı proteinler
Aβ	: Amiloid-beta
Bcl-2	: İnsan p53 tümör baskılayıcı proteinin kofaktör proteini.
Bax	: Bcl-2-ilişkili X protein (Bcl-2-associated X protein)
BT	: Bilgisayarlı tomografi
CAT	: Katalaz
CHAD	: Kondroaderin gen
COMP	: Kıkırdak oligomerik matriks protein (Cartilage oligomeric matrix protein/thrombospondin-5) (COMP/thrombospondin [TSP]-5)
DHLA	: Dihidrolipoik asid
DM	: Diabetes mellitus
ECM	: Ekstra selüler matriks
EMT	: Epitelyal mezenkimal taşınım
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ERK	: Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz (Extracellular signal-regulated kinase)
FAK	: Fokal adezyon kinaz
FasL	: Fas ligand
GPx	: Glutatyon peroksidaz
GSK3β	: Glikojen sentaz kinaz 3 beta

H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Glikolize hemoglobin
HIF-1α	: Hipoksi ile indüklenbilir faktör-1 alfa
hsCRP	: Yüksek hassasiyetli C-reaktif protein
IL-17A	: İnterlökin 17A
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
iNOS	: İndüklenbilir nitrik oksit sentaz
İVD	: İntervertebral disk
JNKs	: c-Jun N-terminal kinazlar
MAPK	: Mitojen aktive edici protein kinaz
Mcl-1	: İndüklenmiş miyeloid lösemi hücre farklılaşması proteini
MDA	: Malondialdehid
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MRG	: Manyetik rezonans görüntüleme
MS	: Multiple skleroz
MTT	: Metil tiazol difenil tetrazolyum
NO	: Nitrik oksit
NP	: Nükleus pulpozus
NSAIDs	: Non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçlar
PDH	: Piruvat dehidrojenaz
PI3K	: Fosfatidil inositol 3-kinaz
preAlb	: Prealbumin
PTEN	: Fosfataz ve tensin homologu 10
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	: Kantitatif ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
TIMP1	: Metalloproteinaz doku İnhibitörü-1
TIMP2	: Metalloproteinaz doku İnhibitörü-2
TKRs	: Tirozin kinaz reseptörleri
TNF- α	: Tümör nekroze edici faktör alfa
VDR	: Vitamin D reseptör

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.2.1. İVD dejenerasyonu sonrasında meydana gelen değişiklikler	12
Tablo 5.5.1. Ters transkriptaz PCR için gerekli reaksiyon karışımı.....	40
Tablo 5.5.2. Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları.....	41
Tablo 5.5.3. Kantitatif gerçek zamanlı PCR bileşenleri ve miktarları.....	41
Tablo 5.5.4. Gerçek zamanlı PCR'nin sıcaklık ve zaman döngüsü.....	42
Tablo 6.1. Proliferasyona ait verilerin tanımlayıcı istatistik sonuçları.....	43
Tablo 6.2. Hücre canlılık, toksisite ve proliferasyon verilerinin ANOVA ile değerlendirilmesine ait bulgular.....	43



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1. İnsan omurgasının anatomisi	5
Şekil 4.1.2. İntervertebral disk yapısı	6
Şekil 4.1.3. İntervertebral diskin yan taraftan (A) ve üstten görünüşü (B).....	6
Şekil 4.1.4. İVD içeriğinin su, proteoglikan ve kolajen oranları.	8
Şekil 4.1.5. İVD kan damarları	9
Şekil 4.1.6. Sağlıklı İVD'nin besin kaynağı yolları.....	10
Şekil 4.2.1. İVD patolojilerinde güncel tedavi modaliteleri.	17
Şekil 4.3.1. ALA'nın optik izomerlerinin kimyasal yapıları.	19
Şekil 4.3.2. Yıllara göre, ALA ile yapılan araştırma sayısını gösteren histogram... .	20
Şekil 4.3.3. ALA prelinik ve klinik araştırma alanları.....	21
Şekil 4.3.4. ALA'nın tümör oluşumunda rol oynayan farklı sinyal yolları üzerindeki etkileri.. ..	24
Şekil 4.3.5. Yıllara göre, ALA ile yapılan klinik araştırma sayısını gösteren histogram.	29
Şekil 6.1. ALA uygulanan ve uygulanmayan örneklerde zamana bağlı proliferasyon göstergesi	44
Şekil 6.2. CHAD, COMP, IL-1 β , MMP-7 ve MMP-19 gen ifadelerinin Real Time-qPCR değişim göstergesi.	47

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1.1. Sağlıklı İVD histolojisi.....	7
Resim 4.2.1. Dejenere İVD histolojisi.....	12
Resim 4.2.2. 30 (A) ve 80 (B) yaşındaki bireylerde artan kalsifikasyon ve kemik iliği kanallarının kapanmasının görüntüsü.	13
Resim 5.1.1. Subligamentöz lomber disk protrüzyonuna ait T2-ağırlıklı sagittal ve aksial MRG	34
Resim 6.1. AF/NP hücrelerinin, AO/PI boyama sonrası floresan ataçmanı, Giemsa boyama sonrası invert ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi..	45



1. ÖZET

ALFA LİPOİK ASİT'İN İNSAN DEJENERE İNTERVERTEBRAL DİSK DOKUSU PRİMER HÜCRE KÜLTÜRLERİ ÜZERİNE POTANSİYEL ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu araştırmada, farklı terapötik etki çeşitliliği nedeni ile son yıllarda bilim insanlarının dikkatini çeken, reçeteli veya reçetesiz olarak kullanılabilen alfa lipoik asit (ALA) suplementasyonunun, insan dejenere intervertebral disk (İVD) dokusundan izole edilen primer hücre kültür modelleri üzerine etkilerinin hücresel ve moleküler düzeyde değerlendirilmesi amaçlandı. Ameliyat sırasında rezeke edilen dejenere İVD dokusundan, primer hücre kültürleri hazırlandı. Herhangi bir madde uygulanmayan primer hücre kültürü örnekleri kontrol grubunu, ALA uygulanan primer hücre kültürü örnekleri ise çalışma grubunu oluşturdu. Tüm gruplara akridin oranj/propidium iyodür (AO/PI) boyamaları yapılarak apoptotik hücre ölümleri floresan mikroskopu ile belirlendi. Hücre yüzey morfolojisi ve ekstraselüler matriks (ECM) yapıları invert ışık mikroskopu altında değerlendirildi. Eşzamanlı olarak; metiltiazol difenil-tetrazolyum (MTT) analizi ile hücre proliferasyonundaki değişimler değerlendirilirken, ECM düzenlenmesiyle ilişkili kondroaderin (CHAD), kırık oligomerik matriks protein (COMP), interlökin-1 beta (IL-1 β), matriks metalloproteinaz (MMP)-7 ve MMP-19 genlerinin ifadeleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time-qPCR) yöntemiyle test edildi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Alfa anlamlılık değeri $<0,05$ olarak kabul edildi. Araştırmamızın bulgularında, ALA uygulanan çalışma grubu hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla proliferasyonun baskılandığı, ECM'nin bozulduğu, iyileşme olmadığı ve gen ifadelerinin değişim gösterdiği saptandı. İVD dejenerasyonu bulunan olgularda ALA kullanımının faydalı olmayabileceği hatta dejenerasyonu ilerletebileceği söylenebilir. Bu sonuçlar *in-vitro* şartlarda elde edilmiş olsa bile ALA'nın reçete edilirken bu olumsuz etkilerinin de göz önünde bulundurulması önerilir.

Anahtar Kelimeler: Alfa lipoik asit, intervertebral disk dejenerasyonu, kırık oligomerik matriks proteini, kondroaderin gen, matriks metalloproteinaz.

2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID ON HUMAN DEGENERATED INTERVERTEBRAL DISC TISSUE PRIMARY CELL CULTURES

In this research, it was aimed at the cellular and molecular level evaluate the effects of alpha lipoic acid (ALA) supplementation, which can be used as prescription or non-prescription, which has attracted the attention of scientists in recent years due to its different therapeutic effects, on primary cell culture models isolated from human degenerated intervertebral disc tissue. Primary cell cultures were prepared from degenerated IVD tissue resected during surgery. Primary cell culture samples, which were not treated with any substance, formed the control group, and primary cell culture samples, which were treated with ALA, formed the study group. All groups were stained with acridine orange/propidium iodide (AO/PI) and apoptotic cell death was determined by fluorescent microscopy. Cell surface morphology and extracellular matrix (ECM) structures were evaluated under an inverted light microscope. Simultaneously; While the changes in cell proliferation were evaluated with methylthiazole diphenyl-tetrazolium analysis (MTT), the expressions of chondroaderin (CHAD), cartilage oligomeric matrix protein (COMP), interleukin-1 beta (IL-1 β), matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-19 genes associated with ECM regulation were tested by quantitative real time polymerase chain reaction (Real Time-qPCR) method. The obtained data were statistically evaluated. Alpha significance value was accepted as <0.05 . In the findings of our study, it was observed that proliferation was suppressed, ECM was deteriorated, there was no improvement and gene expressions changed in the cells of the study group treated with ALA compared to the control group. It can be said that the use of ALA in cases with IVD degeneration may not be beneficial and may even advance degeneration. Even if these results were obtained *in-vitro* conditions, it is recommended to consider these adverse effects when prescribing ALA.

Key Words: Alpha lipoic acid, intervertebral disc degeneration, cartilage oligomeric matrix protein, chondroaderin gene, matrix metalloproteinase.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Son yıllarda yapılan araştırmalarda, bel ağrısının Dünya genelinde yaklaşık 637 milyon kişiye etkilediği (1) ve yaşam boyu görölme oranının %80 olduğu belirtilmiştir (2,3). Bel ağrısının bu kadar yaygın olması hem yaşam kalitesini hem de bireylerin ve devletlerin sağlık ekonomisini olumsuz etkilemektedir. İVD dejenerasyonunda, bel ağrısının önemli sebepleri arasında gösterilmekle (1) birlikte, 70 yaşındaki bireylerde omurlar arasındaki disklerin %60'nın ciddi şekilde dejenere olduğu ve zamanla dejenerasyonun ilerlediği belirtilmektedir (4-6).

İVD dejenerasyonuna, vertebral fraktür sonucu oluşan travmanın (5,7), mesleğe ve vücut kitle indeksine bağlı aşırı mekanik stresin (7,8), sigaranın (9), çevresel faktörlerin (10), ekstraselüler matriksi (ECM) oluşturan veya doğrudan ECM döngüsüne katılan bazı genlerin (11) ve diğer genetik faktörlerin (10) neden olabileceği belirtilmiştir (6). Ayrıca, İVD dejenerasyonunda hücre sayısının önemli oranda azaldığı, hücrelerin transforme olduğu, katabolik aktivitenin arttığı ve azalmış anabolik aktivite nedeniyle ECM üretiminin azaldığının net olarak görüldüğu bildirilmiştir (6,12,13).

Son yıllarda vitamin, mineral ve antioksidan takviyeleri hekimler tarafından reçete edilebilmekle birlikte, sıklıkla reçetesiz olarak da eczane veya internet siteleri üzerinden çok kolay satın alınıp bilinçsiz bir şekilde tüketilebilmektedir. Supplement olarak adlandırılan bu takviye besinler, vücudun üretmediği veya yetersiz miktarlarda ürettiği moleküllerin dışardan tamamlanması amacıyla kullanılmaktadır.

Suda ve yağda çözünen bir koenzim olan alfa lipoik asit (ALA), aerobik metabolizma için gerekli olan ve normalde hayvanlarda kaprilik asitten üretilen bir organosülfür bileşiğidir (14). Ayrıca araştırmalarda, ALA'nın güçlü bir antioksidan olduğu; ayrıca metal şelatlayıcı, serbest radikal temizleyici ve oksidasyonun neden olduğu hasarın onarılması gibi birçok faydalı etkisinin de bulunduğu gösterilmiştir (15). Bu etkileri nedeniyle ALA, son yıllarda bilim insanların dikkatini fazlasıyla çekmiş; diyabet, kanser, Alzheimer, obezite, multiple skleroz (MS), infertilite gibi çeşitli hastalıklar üzerine etkilerinin araştırıldığı çok sayıda klinik ve prelinik araştırma yapılmıştır (16).

Herhangi bir ilaç veya besin takviyesi oral veya parenteral uygulama yollarından alındığında önce hyaluron veya sinoviyal dokulara, oradan da vücut sıvılarına difüze olmakta; sonrasında, İVD'nin kırıldak uç plak (*endplate*) sınırlarında sonlanan kılcak damarlardan difüzyonla çıkarak ve disk porlarından geçerek, annulus fibrozus (AF) ve nükleus pulpozus (NP) gibi disk dokusu hücrelerine ulaşmaktadırlar (17).

Vücudun ihtiyacı dışında bu tür suplementlerin bilinçsiz bir şekilde tüketilmesi fayda sağlamanın yanında hücre ve hücresel yapılara moleküler düzeyde zarar da verebilmektedir. Bu nedenle bilim insanları, hastaları tedavi ederken öncelikle zarar vermeme ilkesini (*minimum nil nocere*) benimsemiştir. Bu ilkeyi baz alan bilim insanları, reçete edilen veya reçete olmaksızın kullanılan ilaç ve gıda takviyelerinin, hücresel ve moleküler boyutta vücuda zarar verip vermediği sorusuna yanıt aramıştır (18,19).

Literatür incelendiğinde ALA'nın biyolojik etkilerinden dolayı son yıllarda çokca araştırıldığı saptandı. Ancak milyonlarca kişinin yaşam kalitesini ve ekonomisini etkileyen İVD dejenerasyonu üzerine ALA'nın etkilerinin araştırılmadığını tespit edildi. Ayrıca insan İVD hücreleri olan AF ve NP hücrelerinin yüzey morfolojisi ve ECM yapıları üzerine etkilerinin değerlendirildiği herhangi bir çalışmaya da rastlanmadı. Tüm bunlara ek olarak ALA'nın insan primer İVD hücre kültürlerinde, proliferasyonla birlikte kondroaderin geni (CHAD), kırıldak oligomerik matriks protein (COMP), interlökin-1 beta (IL-1 β), matriks metalloproteinaz (MMP)-7 ve -19'a ait gen ifadelerinde, ne gibi bir değişim yaratabileceğinin de araştırılmadığı saptandı.

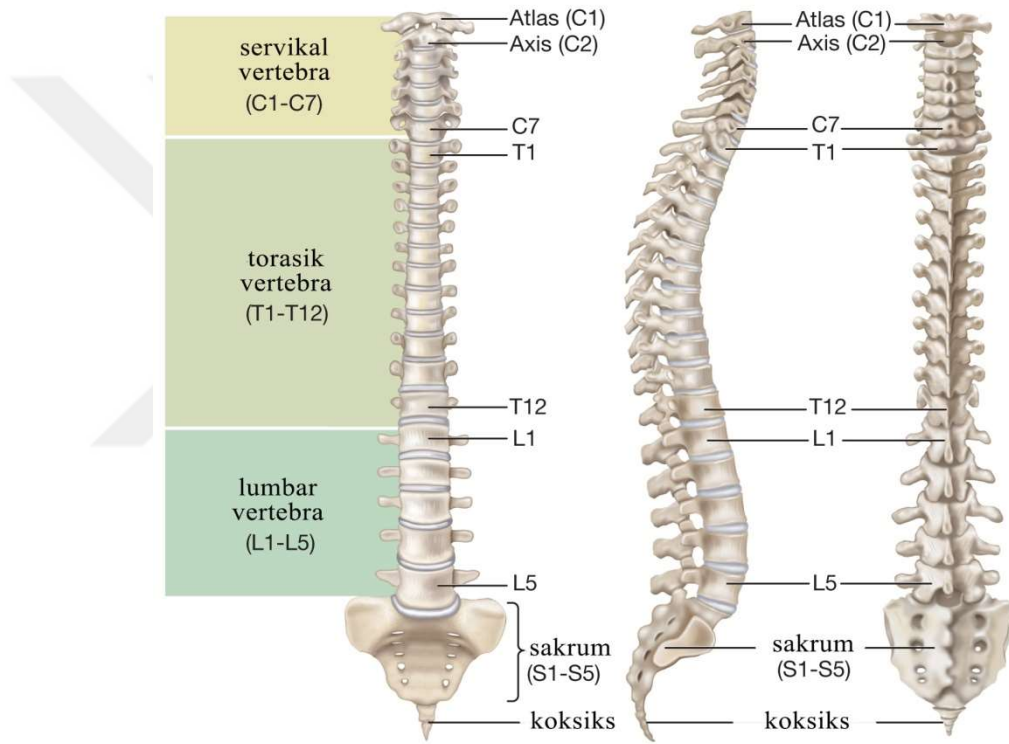
Bu tez çalışmasında ALA'nın, insan dejenere İVD primer hücre kültüründe, hücre ve hücresel yapılara etkilerinin moleküler düzeyde değerlendirilmesi amaçlandı.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İntervertebral Disk Yapısı

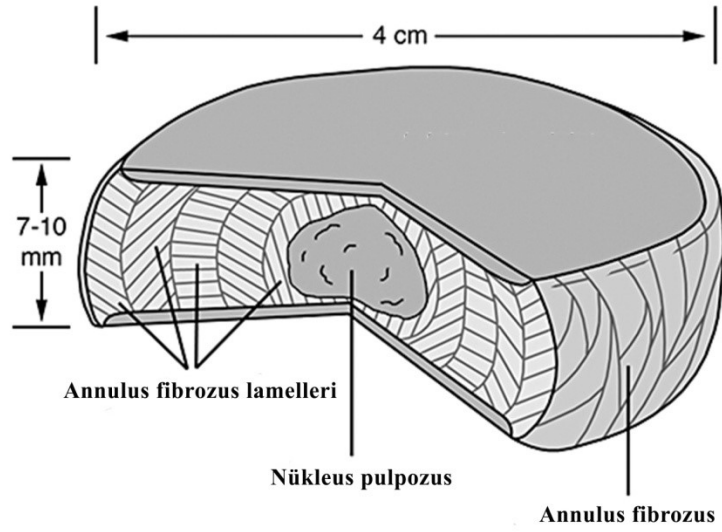
4.1.1. İntervertebral disk anatomisi ve fizyolojisi

İnsan omurgası 5 ayrı bölümden oluşmaktadır. Boyundan aşağıya doğru; 7 adet servikal, 12 adet torasik, 5 adet lomber, 5 adet sakral ve 4 adet de koksigeal olmak üzere toplam 33 adet omur (vertebra) bulunmaktadır (Şekil 4.1.1.).

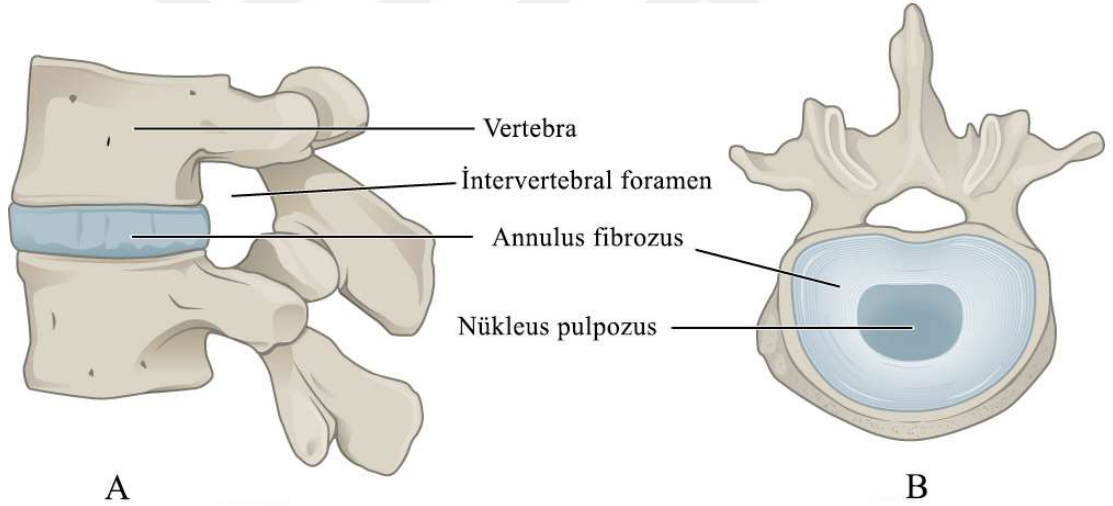


Şekil 4.1.1. İnsan omurgasının anatomisi (20).

Bu 33 vertebra'nın 24'ü birbirine intervertebral disklerle bağlıdır. Toplamda insan vücudunda 23 adet intervertebral disk vardır. İntervertebral diskler; 7-10 mm kalınlığında, 3-4 cm çapında (4) (Şekil 4.1.2.), iskelet omurlarını birbirine bağlayan ve omurlar arasında yastık gibi davranarak ağrısız hareketi sağlayan (2) yapılardır (Şekil 4.1.3.).



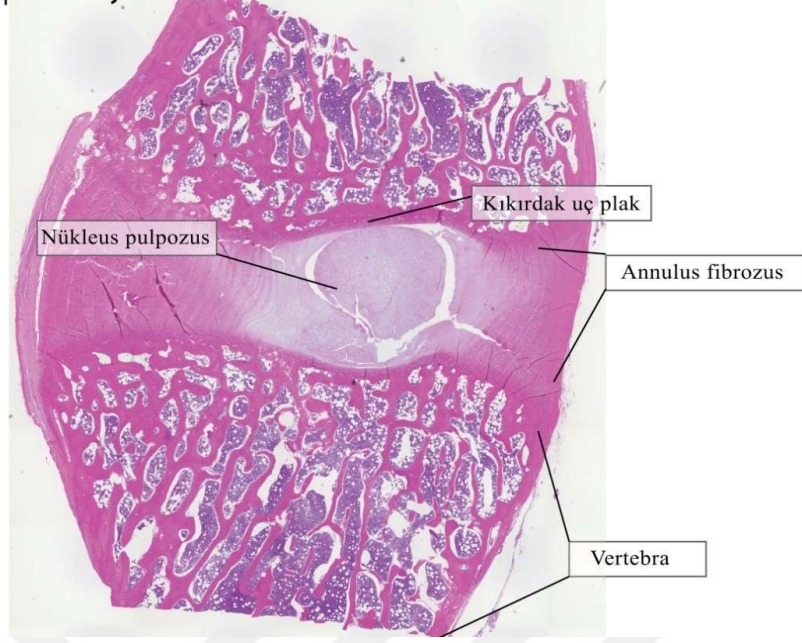
Şekil 4.1.2. İntervertebral disk yapısı (4).



Şekil 4.1.3. İntervertebral diskin yan taraftan (A) ve üstten görünüşü (B) (21).

4.1.2. İntervertebral disk histolojisi

Sağlıklı İVD yapısı, birbiriyle bağlantılı 3 farklı dokudan oluşur, merkezinde yüksek derecede hidrate olmuş jel kıvamındaki NP, onu çevreleyen elastik ve fibriler yapıları AF, alt ve üst vertebral omurlara bağlantı sağlayan kıkırdak uç plaklardan (*endplate*) oluşmaktadır (2) (Resim 4.1.1.).



Resim 4.1.1. Sağlıklı İVD histolojisi (Hematoksilen&Eosin x4 Büyütme) (22).

NP, embriyonik hayatta notokorddan köken alır ve notokordal hücreler doğumdan sonra yaklaşık 10 yaşına kadar dokuda kalır. Bu hücreler daha sonra daha düşük metabolik aktivitelere sahip küçük kondrosit benzeri hücrelerle yer değiştirir (23-25).

AF ve kıkırdak uç plaklar ise sklerotomdan köken alır (26). İki bölgede de hücre yoğunluğu oldukça düşüktür, AF bölgesinde mm^3 başına yaklaşık 9.000 hücre ve NP bölgesinde mm^3 başına yaklaşık 4.000 hücre bulunur (27,28).

NP matriksi, agrekan ve versikan gibi proteoglikan, rastgele düzenlenmiş tip II kolajen lifler ve radyal olarak düzenlenmiş elastinlerden oluşur. Negatif yüklü yan zincirleri olan proteoglikanlar, NP bölgesine yüksek ozmolarite ve yüksek hidrate özelliği kazandırır ve suyun İVD çevresine çekilmesini ve tutulmasını sağlar. Sonuç olarak NP bölgesindeki su oranı %70-90 civarında olur ve bu da İVD'nin mekanik baskıyı eşit olarak dağıtarak baskıya direnmesini ve geri dönüşümlü olarak deforme olmasını sağlar (2,4,6,29,28).

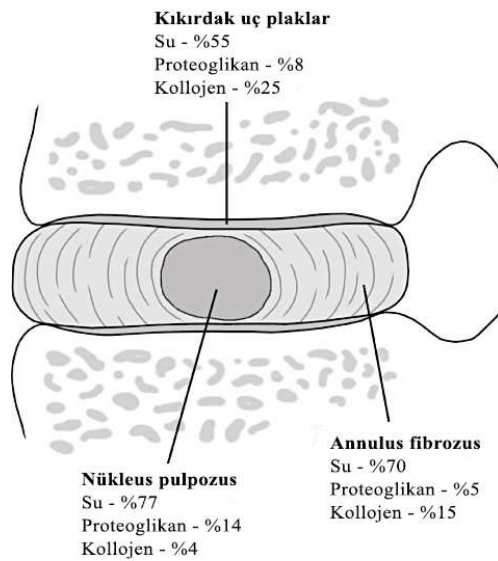
AF bölgesi, iç kısımlarda fibrokartilaj hücrelerden (30), dış kısımlarda fibroblast benzeri iğ şekilli hücrelerden (2,30) ve lamellerden oluşur, her lamelin içinde de

paralel uzanan kolajen fibriller bulunmaktadır. Bu yapı gerilme mukavemeti ve herhangi bir yönden uygulanan kuvvetlere dayanma yeteneği sağlar (31). AF iç bölgesi birkaç fibröz kıkırdak (fibrokartilaj) tabakadan oluşurken, dış bölge ise yoğun tip I kolajen bulunduran oldukça organize fibriller içeren, gerilme kuvvetine dayanmayı sağlayan fibriler bir dokudur (32). Proteoglikan ve tip II kolajen yapısı dış AF bölgesine gidildikçe azalır ve yerini tip I kolajene bırakır (6,33).

İVD dokusunda yoğun olarak tip I ve tip II kolajen bulunmasına rağmen, diskte başka kolajen türleri de bulunmuştur. AF bölgesinde tip I, II, III, V, VI, IX, XI kolajen bulunurken, NP bölgesinde tip II, VI, IX ve XI kolajen türleri bulunur (27,28). Kolajen İVD'ye gerilme mukavemeti sağlar ve dokuyu kemiğe tutturur (4).

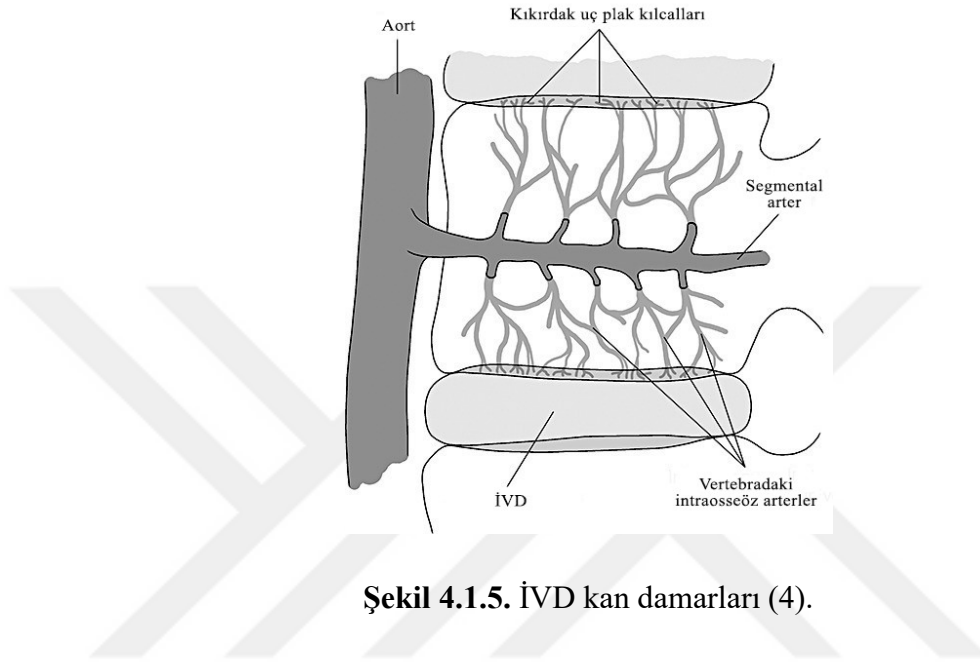
İVD'lerin 3. bölgesi ise, omurlar ile diskleri birbirine bağlayan 1 mm'den daha ince olan hyalin kıkırdak uç plaklarıdır (*endplate*). Yapısında kolajen fibriller ve az miktarda proteoglikan bulunur (4); bu kolajen fibriller omurlara paralel uzanır. Kıkırdak uç plaklar sadece diskleri omurlara yapıştırmakla kalmayıp, aynı zamanda disklere besin difüzyonunda da önemli görev üstlenir (2,34).

İVD bölgelerinin su, proteoglikan ve kolajen oranları farklılık göstermektedir (Şekil 4.1.4.) (4);



Şekil 4.1.4. İVD içeriğinin su, proteoglikan ve kolajen oranları (4).

Sağlıklı yetişkinlerin disklerinde, varsa eğer çok az segmental arter dallarının kapillerleri ve dış lamellerle sınırlı bazı sinirler bulunur (Şekil 4.1.5) (4).



Şekil 4.1.5. İVD kan damarları (4).

4.1.3. İntervertebral disklerin beslenmesi

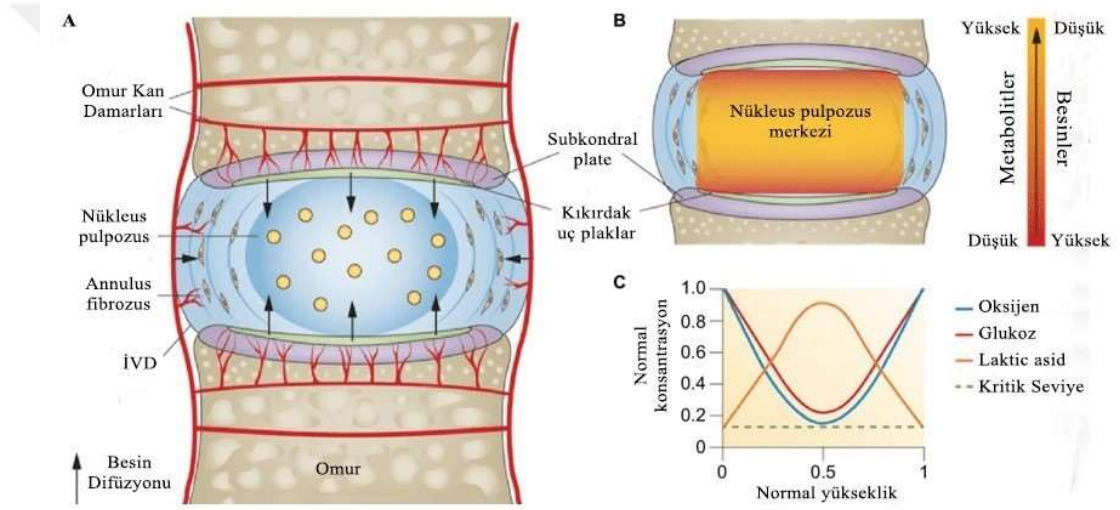
Vücuttaki en büyük avasküler dokuyu içeren İVD'lerde, hücrelerin hayatta kalması ve işlevlerini yerine getirebilmeleri için optimal bir besin/metabolit ortamının sağlanması özel bir sorundur (35,36).

Disk hücrelerinde, besinlerin alınması ve metabolitlerin atılması iki farklı yoldan yapılır. Diskin dış kısmında bulunan, AF hücreleri diski çevreleyen yumuşak dokulardaki kılcal damarlar ile yaparken, merkeze ve kıkırdak uç plaklara yakın hücreler ise omur kan damarlarından çıkan kemik iliği boşluklarından subkondral plakaya nüfuz eden ve subkondral plaka ile kıkırdak uç plakların birleşim yerinde sonlanan kılcal damarlar ile yapar (Şekil 4.1.6. A) (37).

Besinler esas olarak, kılcal damarlardan, kıkırdak uç plaklardan ve yoğun disk matrisinden difüzyon yoluyla (17), geçerek İVD hücrelerine hareket eder; metabolitler

ise ters yönde hareket eder. Bundan sonraki konsantrasyon seviyeleri, hücreler tarafından besin kaynağı ve tüketim oranları arasındaki denge ile belirlenir (Şekil 4.1.6. B) (36).

Sonuç olarak, glikoz, oksijen ve diğer besin maddelerinin konsantrasyonları diskin merkezinde en düşük düzeydedir. Bu seviye, hücrelerin canlı ve aktif kalması için gerekli olan kritik eşiğin üstünde olmalıdır (Şekil 4.1.6. C); bu nedenle, besin konsantrasyon seviyelerini olumsuz etkileyen faktörler bu avasküler dokudaki hücre sayısını sınırlar (38,39).



Şekil 4.1.6. Sağlıklı İVD'nin besin kaynağı yolları (A, B, C) (35).

4.2. İntervertebral Disk Dejenerasyonu

İVD dejenerasyonunda, hücre sayısında azalma, hücrelerde transformasyon, artan katabolik aktivite ve azalmış anabolik aktivite nedeniyle ECM üretiminin azalması gibi etkiler görülür. Daha sonra İVD'nin yapısal bütünlüğü kaybolur ve dejenerasyon daha da hızlanır (6,12,13).

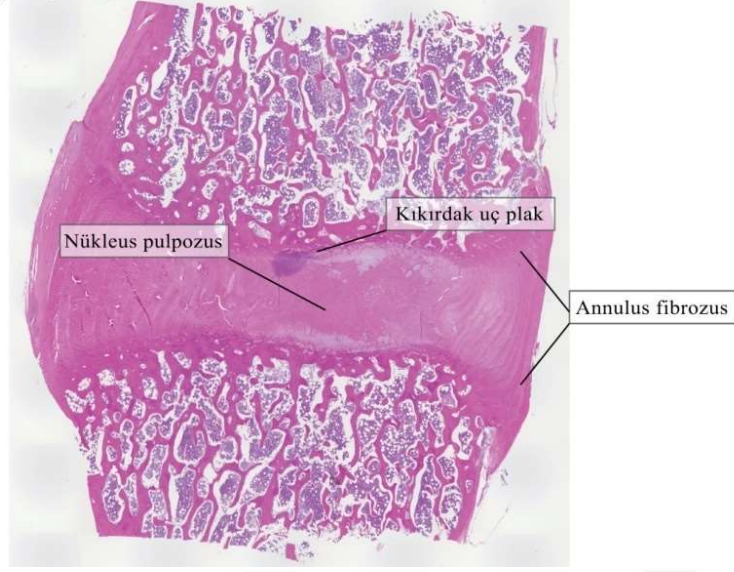
İnsanlarda İVD dejenerasyonunda, tip II kolajen üretiminde genel bir azalma (6,40) ve artan enzimatik reaksiyon sebebiyle de daha fazla denatürasyon görülür

(4,41,42). Dejenerasyon ilerledikçe de NP hücreleri veya iç kısımdaki AF hücreleri tarafından tip I kolajen sentezinde artış gözlemlenmektedir (40). Ek olarak, kolajen liflerin enzimatik olmayan glikozilasyonunda bir artış olur ve bu da gelişmiş glikasyon son ürünlerinin birikmesine yol açar. Sonuç olarak, kolajen liflerin çapraz bağlanması arttığı için doku sertliği olur ve İVD'ler dejenerasyon sırasında mekanik hasara karşı daha duyarlı hale gelir (6,43).

Kolajenlerin ekspresyonundaki değişikliklere benzer şekilde, dejenerasyon sırasında insan İVD'sinin proteoglikan içeriğinde de bir azalma görülür (6,41,44-46). Özellikle, sülfatlanmış glikozaminoglikan yan zincirleri ile kovalent olarak etkileşime giren ve osmolaliteyi koruyan agrekan miktarı yirmili yaşlardan sonra sürekli azaldığı belirtilmiştir (2,47). Ek olarak, İVD'nin su içeriği azaltılır ve glikozaminoglikan zincirlerinin kompozisyonu kondroitin sülfattan keratin sülfata doğru geçiş yapar (52). Tip I kolajenin artan ekspresyonu ile İVD daha fibrotik hale gelir ve mekanik strese daha az dayanıklı hale gelir (6). NP'nin su içeriği azaldığı için, baskıyı eşit dağıtma yeteneğini de tehlikeye girer. Eğer dejenerasyon devam ederse, NP'nin hernie olması ve AF rüptürleri de görülebilir (2,48,49).

Dejenerasyonun fibronektin içeriğini arttırdığı (4,50), artan fibronektinlerin agrekan sentezini baskılayıp bazı MMP enzimlerinin sentezini arttırdığı *in-vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (4). Sonuç olarak dejenerasyonun daha da ilerlemesine sebep verdiği düşünülmektedir.

İVD dejenerasyonunda, yukarıda belirttiğimiz değişikliklerin sonucunda dokunun mikroskopik görüntüsünde histolojik olarak değişiklikler de olmaktadır (Resim 4.2.1.). NP ve AF sınırlarının kaybolması, fissür varlığı ve hücre kümelerinin oluşması görülür (6,51). AF bölgesinde, kolajen liflerin lamel yapısında bozulma, fissür varlığı ve artmış vaskülarizasyon ve inervasyon derecesi gözlenir (52). Ayrıca kırık uç plaklarda çatlaklar, incelme, mineralizasyon, bitişik subkondral kemikte mikrokırık ve kemik sklerozu gözlenmektedir (53).



Resim 4.2.1. Dejenere İVD histolojisi (Hematoksilen&Eosin x4 Büyütme) (22).

Üst kısımda bahsedilen moleküler, histolojik ve biyomekanik tüm değişiklikler tablo 4.2.1.'deki gibidir (6);

Tablo 4.2.1. İVD dejenerasyonu sonrasında meydana gelen değişiklikler.

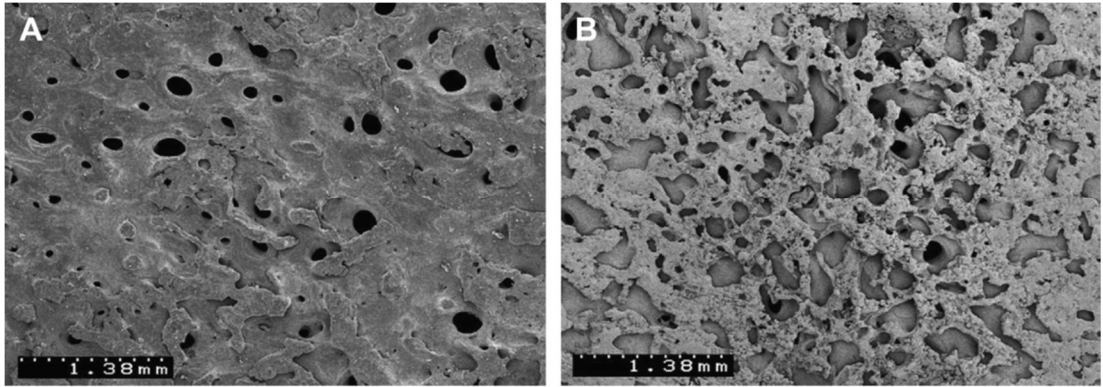
	Nükleus pulposus	Annulus fibrozus	Kıkırdak uç plaklar
Moleküler düzeydeki değişiklikler	<ul style="list-style-type: none"> • Proteoglikan azalması • Tip II kolajen azalması • Tip I kolajen artışı 	<ul style="list-style-type: none"> • Kolajen liflerinin çapraz bağlantısı 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteoglikan azalması
Histolojik değişiklikler	<ul style="list-style-type: none"> • Yarık ve fibrosis • Hücre kümesi görünümü • Notokordal hücrelerin kaybı ve kondrosit benzeri hücrelerin görünümü 	<ul style="list-style-type: none"> • Lamel bozulması • Yarık • Vaskülarizasyon ve innervasyon 	<ul style="list-style-type: none"> • Subkondral kemiğin mikro kırığı ve sklerozu • İncelme • Vasküler kanal sayısında azalma
Biyomekanik değişiklikler	<ul style="list-style-type: none"> • Genleşme kuvvetinin azalması 	<ul style="list-style-type: none"> • Mekanik strese karşı dayanıksızlık 	

4.2.1. İVD dejenerasyonunda doku beslenmesi

Besin kaynağı ve besin tüketimi arasındaki denge İVD'lerde çok önemlidir, eğer parametrelerden biri bozulursa, besin konsantrasyonu veya metabolit birikimi sonucu pH seviyesi hücresel aktiviteyi ve canlılığı olumsuz etkileyebilecek seviyelere düşebilir (35, 36). Dejenere disklerde görülen olumsuz besin koşullarını modelleyen *in-vitro* deneylerde, hücre proliferasyonunda ve matriks moleküllerinde azalma, hücre ölümünde artış olduğu gösterilmiştir (6,39,54-56).

Lomber omurgayı besleyen arterlerin ateroskleroza (57,58) ve aynı zamanda mikro sirkülasyonu olumsuz etkileyen ve disklere besin arzını azaltan *Gaucher* hastalığı, orak hücre anemisi ve *Caisson* hastalığı gibi bozukluklar da disk dejenerasyonu ile ilişkilidir (36). Ayrıca vibrasyon ve vasoaktif maddelerde kılcal damarlardan besinlerin disklere taşınmasını etkileyebilir (35,59-61).

Kıkırdak uç plaklarında meydana gelen dejenerasyonlar veya farklılaşmalar da İVD dejenerasyonunu olumsuz yönde ilerletebilir (Resim 4.2.2.). Örneğin kıkırdak uç plaklarında kalsifikasyonun artması (62-64), kemik iliği boşluklarının tıkanması (plak sklerozu), diskteki *Modic* değişiklikler, *Schmorl* nodülleri (komşu kemik sınırları içine fitik) ve diğer disk lezyonları (65) besin ve metabolit döngüsünü değiştirir bu da hücresel aktiviteyi ve homeostazı bozarak apoptoza sebep olur (66), sonuç olarak dejenerasyon ilerler.



Resim 4.2.2. 30 (A) ve 80 (B) yaşındaki bireylerde artan kalsifikasyon ve kemik iliği kanallarının kapanmasının görüntüsü (Taramalı elektron mikroskobu görüntüsü) (63).

4.2.2. İVD dejenerasyonunda hücre kaybı

İVD hücrelerinde, dejenerasyon süreci boyunca çeşitli sinyal yolları üzerinden hücre ölümünün gerçekleştiği ve buna bağlı olarak toplam hücre sayısında önemli azalmaların olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. İVD dokusundaki hücrelerde farklı moleküller üzerinden farklı hücre ölüm çeşitleri gözlemlenmiştir. Hücre ölümünün dejenerasyonla ilişkili olduğu da yine literatürde gösterilmiştir. Bu nedenle İVD dejenerasyonunun tedavisinde hücre kaybının durdurulması ve kaybedilen hücre sayısının yerine koyulması çok önemlidir.

Apoptozun İVD dejenerasyonuna katıldığı, hastalardan alınan İVD'lerin sağlıklı kontrol disklerine kıyasla *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) pozitif hücrelerinin daha fazla olduğunun bulunmasıyla kanıtlanmıştır (67,68). Daha sonra, çok sayıda çalışma NP ve AF hücrelerinin dejeneratif disklerde karmaşık mekanizmalar yoluyla apoptoz geçirdiğini belirlemiştir (67).

Kıkırdağa spesifik ECM bileşenleri üreten NP hücrelerinin aşırı apoptozu (Şekil 8), İVD dejenerasyonu sırasında ortaya çıkan belirgin bir hücresel değişikliktir (67,69,70), bu yüzden apoptoz çalışmaları NP hücreleri üzerine yoğunlaşmıştır.

4.2.2.1. İVD dejenerasyonunda NP hücrelerinde apoptoz iç yolu

Yapılan araştırmalar, dejenerasyonda NP hücrelerindeki apoptozun intrinsik yolunun, esas olarak Bcl-2 ve kaspaz-3 üzerinden gerçekleştiğini göstermektedir. Bcl-2'nin çeşitli hücre sistemlerinde apoptozun intrinsik yolunu inhibe ettiği, mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek ve sitokrom c'nin mitokondriden salınmasını önleyerek veya Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'e (Apaf-1) bağlanarak apoptozu düzenlediği (71), özellikle kaspaz-3 aktivitesini inhibe ederek İVD dejenerasyonu sırasında apoptozu önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir (72).

İnsan p53 tümör baskılayıcı proteinin kofaktör proteini olan (Bcl-2)'nin nükleotid bağlama alanı ve lösin açısından zengin tekrar içeren protein 1 (NLRP1)'e bağlandığı ve aktivasyonunu baskıladığı, böylece kaspaz-1 ile aktif formuna işlenen bir proenflamatuvar sitokin olan IL-1 β salınımını inhibe ettiği bulunmuştur (73).

Birçok çalışma, oksidatif stresin İVD dejenerasyonu sırasında NP hücrelerinin apoptozuna yol açtığını göstermiştir. H₂O₂ ile tedavi edilen NP hücrelerinde apoptoz artar ve agrekan ve tip II kolajenin mRNA seviyeleri azalır (74). Özellikle, H₂O₂ veya IL-1β'nin zararlı etkileri, NP hücrelerini apoptozdan koruyan güçlü bir antioksidan olan glutatyon (74) tarafından etkili bir şekilde önlenir.

4.2.2.2. İVD dejenerasyonunda NP hücrelerinde apoptoz dış yolağı

NP hücrelerinin dejenerasyon sırasında, tümör nekroz faktör (TNF) ailesine ait tip-II transmembran proteini olan Fas ve Fas ligand (FasL) seviyelerini düzenleyerek ekstrensek yoldan apoptoz geçirdiği belirtilmiştir (75,76).

ADAMTS-7 enziminin hem insan hem de sıçan dejeneratif NP dokularında kontrol grubuna kıyasla belirgin düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu etkiyi IL-17A'nın, TNF-α sinyal yolu üzerinden ADAMTS-7 ekspresyonunu indükleyerek oluşturduğu düşünülmektedir (77).

Apoptoz, post transkripsiyonel regülatörlerin anahtarı olan mikro ribonükleik asit (miRNA)'lar tarafından düzenlenir. İVD dejenerasyonunun nedenleri arasında miRNA'ların anormal ekspresyon seviyeleri de bulunmaktadır (78). Dejeneratif NP hücrelerinde miRNA ekspresyon profillerini inceleyen bir çalışmada, 29 miRNA'nın farklı şekilde eksprese edildiğini ve miR-155 ekspresyonunun önemli ölçüde düştüğünü ortaya koymuştur (74). Ek olarak, miR-155'in FADD ve kaspaz-3 üzerinden Fas aracılı apoptozu tetiklediğini göstermiştir (78).

Ek çalışmalar, miR-27a'nın yakın zamanda fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)'yı hedefleyerek NP hücrelerinde apoptozu düzenlediği (79), miR-21'in insan dejeneratif NP dokularında yüksek ekspresyon gösterdiği, miR-21'in aşırı ekspresyonunun fosfataz ve tensin homologu 10 (PTEN) üzerinden Akt fosforilasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur (80).

Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ailesi üyeleri (hücre dışı sinyalle düzenlenen kinazlar (ERKs), c-Jun N-terminal kinazlar (JNKs) ve p38-MAPKs) hücre gelişiminin sürdürülmesi için çok önemlidir (81). ERK'ler hücre sağ kalımında, JNK'lar ve p38-MAPK'lar ise apoptozun hem iç hem de dış yollarında yer alırlar. NP

hücrelerinde p38-MAPK, JNK1/2 ve ERK1/2 sinyal yollarının varlığı gösterilmiştir (81).

4.2.2.3. İVD dejenerasyonunda AF hücrelerinde apoptoz

AF hücrelerinde, iç yolak apoptozun özellikle kaspaz 9 üzerinden (82-85), dış yolak apoptozun ise kaspaz 3 ve kaspaz 8 üzerinden etkilendiği çeşitli çalışmalarda vurgulanmıştır (83).

4.2.2.3. İVD dejenerasyonunda kıkırdak plak hücrelerinde apoptoz

İVD dejenerasyonunda kıkırdak plak hücrelerinde apoptoz net olarak görülür (86-88). MAPK'ler, kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün kıkırdak plaklarda mekanik stres kaynaklı apoptozda etkili olduğu belirtilmiştir (88).

4.2.2.4. İVD dejenerasyonunda otofaji

Otofaji, Atg proteinleri ve LC3 tarafından yüksek oranda düzenlenen çoklu süreçlerden oluşur (89). Beclin 1, memeli hücrelerinde otofajiyi yönlendiren Bcl-2 gen ailesinin BH3 üyesidir (90,91). Çeşitli çalışmalar otofajinin hem NP hem de AF hücrelerinde meydana geldiğini göstermiştir. Örneğin, yüksek glikoz konsantrasyonlarında kültürlenmiş sıçan NP ve AF hücreleri, beclin 1, LC3 ve Atg3, 5, 7 ve 12'nin artan ekspresyonunu gösterdi (92).

4.2.3. İVD Dejenerasyonunun tedavisi

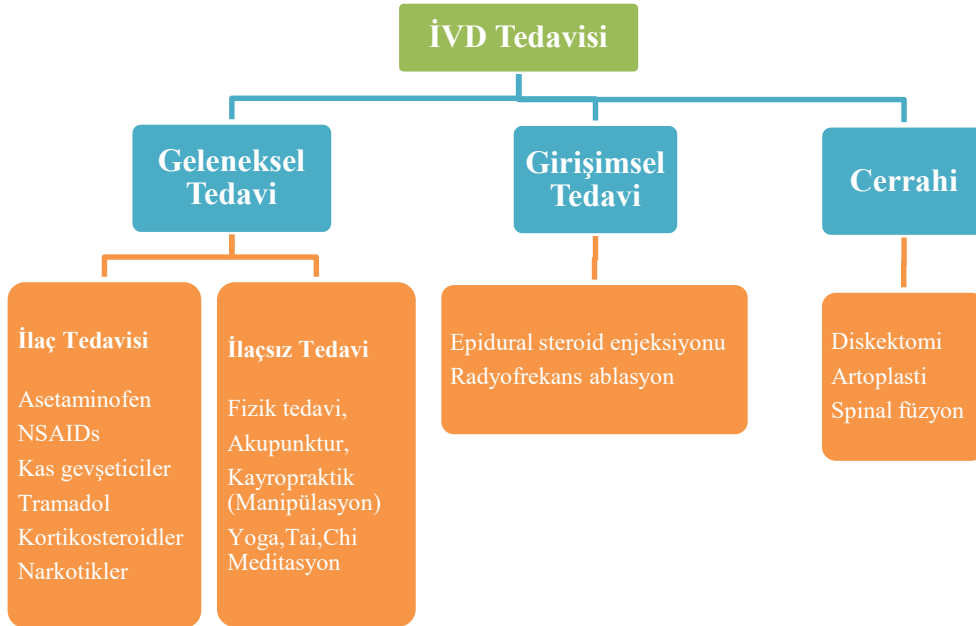
4.2.3.1. Mevcut tedavi yöntemleri

İntervertebral lomber disk hernisi olan birçok kişinin cerrahi müdahaleler olmadan kendiliğinden iyileşme olasılığı yüksek olduğu ve bazı insanların iyi cerrahi adayı olmadığı gerçeği göz önüne alındığında, bu durumda ağrıyı yönetmek için kullanılan birçok yöntem vardır (Şekil 4.2.1.). Tedavi konservatif tedavi ve invaziv tedavi şeklinde olabilir. Konservatif tedavi farmakolojik ve farmakolojik olmayan yöntemlerin kombinasyonu şeklinde olabilir.

Farmakolojik müdahaleler, Dünya Sağlık Örgütü'nün kronik ağrıyı yönetmeye yönelik yaklaşımına uygun olarak, asetaminofen, non-steroidal antiinflamuar ilaçlar (NSAIDs), kas gevşeticiler, tramadol, kortikosteroidler ve hatta orta ila şiddetli ağrı için kısa opioid kürlerini içerir. Farmakolojik stratejiler esas olarak ağrı azalincaya kadar semptom kontrolünü amaçlamaktadır. Farmakolojik olmayan stratejiler arasında fizik tedavi, akupunktur, kayropratik manipülasyon veya yoga, tai-chi veya meditasyon gibi terapiler bulunur. Konservatif tedavi semptomların giderilmesini sağlamazsa, genellikle daha invaziv tedaviler düşünülür (93).

Epidural glukokortikoid enjeksiyonları, semptomatik intervertebral hernie disklerin invaziv girişimsel yönetiminde ilk adım olarak uzun zamandır lanse edilmiştir. Epidural enjeksiyonların ağrı skorlarını ve hareket kaybını genellikle iki hafta gibi kısa süreli olarak azalttığı ve cerrahi müdahale ihtiyacını ise 13-28 ay kadar geciktirdiği gösterilmiştir (94).

Hastalar bir süre rahatlama yaşayabilir, ancak ağrı nüksünden sonra tekrar enjeksiyonlar gerektirebilir (95). En son olarak da diskektomi, artoplasti veya spinal füzyon tekniklerini içerebilen cerrahi tedavi modaliteleri planlanmaktadır.



Şekil 4.2.1. İVD patolojilerinde güncel tedavi modaliteleri.

4.2.3.2. *Biyolojik tedavi araştırmaları*

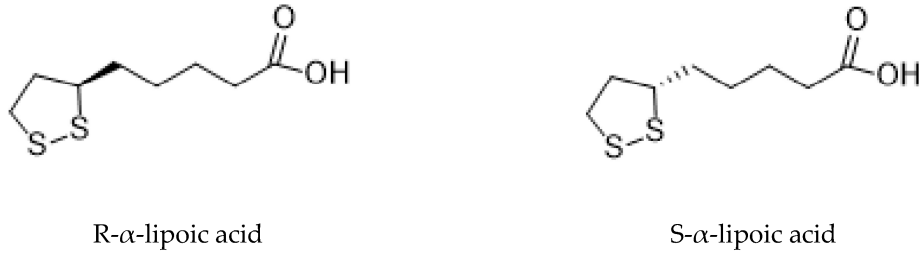
İVD rejenerasyonu ile ilgili araştırmalar yirmi yılı aşkın bir süredir devam etmektedir, fakat son on yılda diskin hücrenel onarımına olan ilgi, disk biyolojisi üzerine araştırmaları hızlandırdı. Hayvanlarda yapılan, büyüme faktörlü, hücrenel ve biyomalzeme temelli tedavilerin başarısı bu alandaki bilgilerimizi önemli oranda artırdı. Fakat, klinik çalışmalarında sadece birkaç tedavi ilerlemiş ve hiçbirini henüz ticari ürün olarak mevcut değildir (35).

İVD dejenerasyonunu biyolojik olarak onarmak için çeşitli tedavi çalışmalarını yapılmaktadır. Bu çalışmalar arasında, aktif İVD hücre implantasyonu (55,96,97), biyomalzeme implantasyonu (98,99), mezenkimal kök hücre implantasyonu (100,101), büyüme faktörlerinin mevcut hücrelere enjeksiyonu (102), enflamatuvar sitokinlerin inhibisyonu için gen tedavileri veya disk içi molekül enjeksiyonu (103, 104), bozulmamış veya yapay disk transplantasyonu (105,106) gibi çalışmalar yapılmış veya halen devam etmektedir. Fakat bu çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarının disk büyüklükleri, hücre yoğunlukları hatta metabolizma hızları insanlardan farklı olduğu için çalışma sonuçlarının uygulanabilirliğinin iyi değerlendirilmesi gerekmektedir (35).

4.3. Alfa Lipoik Asit (ALA)

ALA, hücredeki mitokondri organeli içinde yoğun bulunan, farklı enzimatik reaksiyonlar için gerekli bir bileşiktir (107). İlk olarak 1937 yılında (108) laktik asit bakterileri olan *Lactobasilluslar*'ların gelişimi için büyüme faktörlerinin araştırıldığı bir çalışmada tespit edilmiş, fakat 1951 yılında izole edilip (109), klinikte ise ilk defa 1959 yılında Almanya'da *Amanita phalloides* kaynaklı akut mantar zehirlenmesinin tedavisinde kullanılmıştır (110).

ALA'nın kimyasal yapısından bahsedecek olursak, tek bir kiral merkeze ve iki optik izomere neden olan asimetrik karbona sahiptir. Bu optik izomerler -R ve -S enantiomere sahip olan lipoik asit'tir (Şekil 4.3.1.) (111).



Şekil 4.3.1. ALA'nın optik izomerlerinin kimyasal yapıları.

ALA'nın S ve R enantiomerleri olarak adlandırılan ve birbirlerinin ayna görüntüleri olarak kabul edilen iki enantiomerik formu olan "S" ve "R" enantiomerleri ALA'da eşit olarak bulunur, ancak -R izomerik formu doğal olarak bulunurken, -S izomeri kimyasal süreçler sonucunda elde edilen sentetik formudur (112). Hayvansal ve bitkisel gıdalar -R enantiyomerinin doğal kaynağıdır, sentetik takviyeler ise -R ve -S izomerlerinin rasemik bileşiminden oluşur.

ALA bitki, hayvan, insan metabolizmasında üretilen organosülfür bir bileşiktir. Mitokondride enzimatik reaksiyonlar ile oktanoik asitten sentezlenebilir (113,114), fakat bu yetersiz olduğu için eksik kalan miktar sebze (ıspanak, brokoli, domates, brüksel lahanası ve pirinç kepeği), meyve, et veya karaciğer, böbrek gibi iç organlarla beslenerek ekzojen olarak tamamlanabilir (107,115).

ALA, Krebs döngüsünde hücrenin enerji üretimiyle ilgili çeşitli kimyasal reaksiyonlarda (115) ve mitokondri yoluyla enerji iletiminde de önemli işleve sahip (116, 117) olduğu literatürde belirtilmiştir.

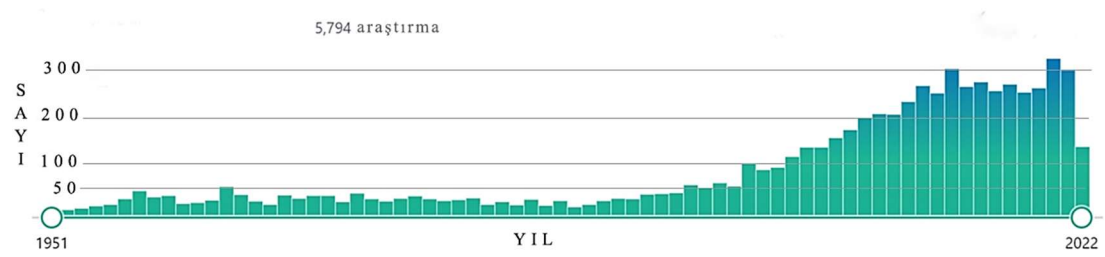
ALA'nın küçük molekülünde indirgenmiş veya oksitlenmiş iki tiol grubu bulunur. Oksitlenmiş form ALA veya lipoik asit olarak bilinirken, indirgenmiş form dihidrolipoik asit (DHHLA) olarak belirtilir. ALA, serbest radikalleri etkisiz hale getirir ve indirgenmiş formu ayrıca reaktif oksijen türleri (ROS) ile etkileşime girer (118). Doğal olarak, ALA, mitokondride E2 alt birimine bağlı bulunur ve hem piruvat dehidrojenaz (PDH) hem de α -ketoglutarat dehidrojenaz kompleksleri için bir kofaktör olarak kullanılır (119).

4.3.1. ALA'nın önemi

ALA'nın hem suda hem de yağda çözünebilen bir bileşik olması klinik olarak onu değerli kılmıştır ve klinik etkileri üzerine de çok sayıda yayın yapılmıştır. Özellikle güçlü antioksidan etkisi ve diğer bazı antioksidanların tekrardan üretilmesine olan katkısından yayınlarda bahsedilmektedir.

Bilim insanları, Diabetes mellitus (DM), kanser ve Alzheimer gibi toplumda oldukça sık görülen hastalıkların tanı ve tedavi modalitelerine odaklanmış durumdadır (120,121). ALA, yaygın görülen bu tür hastalıkların hem tedavisinde hem de bu hastalıklarda gözlemlenen yaşam kalitesini düşüren olumsuz etkilerin giderilmesinde birçok araştırmada test edilmiş ve edilmeye de devam etmektedir (122-124).

ALA ile yapılan prelinik ve klinik tüm araştırmalar pubmed üzerinden tarandığında, yapılan çalışma sayısının zamanla arttığı ve özellikle son dekatta bilim insanlarının dikkatini çekerek oldukça popüler bir molekül haline geldiği yayın sayısının artışından da anlaşılmaktadır (Şekil 4.3.2.).



Şekil 4.3.2. Yıllara göre, ALA ile yapılan araştırma sayısını gösteren histogram.

ALA'nın, zamanla terapötik etkileri ortaya çıktıkça bilim insanları çalışmalarında bazı alanlar üzerine yoğunlaşmıştır (Şekil 4.3.3.). Fakat literatürler incelendiğinde ALA'nın etki mekanizmasının tam anlamıyla açıklanabilmesi için daha fazla araştırma yapılması gerektiği vurgulanmaktadır.



Şekil 4.3.3. ALA prelinik ve klinik araştırma alanları.

4.3.2. ALA'nın farmakokinetiği

ALA'nın birçok biyolojik aktivitesi vardır, fakat çözünürlüğünün düşük olması, midedeki kararsız durumu nedeniyle biyoyararlanım oranının %30 civarında olması, karaciğerdeki eliminasyon oranının yüksek olması ve yarılanma ömrünün kısa olması gibi farmakokinetik özelliklerinin biyolojik etkilerini sınırlandırdığı belirtilmektedir (125).

Mide boşken oral olarak alınan ALA'nın emiliminin %40 arttığı, diğer gıdalarla birlikte alındığında ise emilimin %20 azaldığı belirtilmiştir. Asidik pH'ın ALA'nın mideden emilimine katkı sağladığı, bu nedenle açken alınmasının daha faydalı olacağı belirtilmiştir.

Maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşmak için gereken süre yaklaşık 30-60 dakikadır. Ayrıca, -R enantiyomerinin maksimum plazma konsantrasyonunun -S enantiyomerinden %40-50 daha yüksek olduğu bulunmuştur (126).

ALA, karaciğer, kalp, böbrekler ve kan-beyin bariyeri de dahil olmak üzere vücudun birçok bölgesinde bulunan “sodyum bağımlı multivitamin taşıyıcı” olarak isimlendirilen transmembran protein tarafından taşınır (117,127,128). ALA bu taşıyıcı sistem sayesinde kan beyin bariyerini bile geçmektedir (129).

Çalışmalar ALA'nın karaciğer ilk geçişinde ve dokulara dağıldıktan sonra kandan hızla temizlendiğini göstermektedir. Bu nedenle, metabolizma hızı farkından dolayı ALA'nın biyoyararlanımı ve pik plazma konsantrasyonu genç/orta yaşa (18-45) kıyasla yaşlılarda (75 ve üzeri) daha yüksektir. Bunların yanında ALA biyoyararlanımına cinsiyetin etkisinin görülmediği belirtilmiştir (117).

ALA'nın klinik ve prelinik çalışmalarda çeşitli hastalıklar üzerine tedavi edici etkisinden ve klinik çalışmalarda güvenli bir takviye (129) olarak kullanılabilceğinden bahsedilmesine rağmen, nadirde olsa ALA'dan zehirlenen vakalarda (130) literatürde vardır. Genelde bu vakaların, kazara veya intihar girişimi nedeniyle ortaya çıktığı belirtilmektedir.

4.3.3. ALA'nın farmakodinamiği

4.3.3.1. ALA'nın antioksidan potansiyeli

ALA ve indirgenmiş formu olan DHLA'nın antioksidan etkileri hakkında geniş literatür verileri vardır. Bu literatürlerde ALA'nın metal şelatlayıcı, serbest radikal temizleyici, endojen antioksidanların (glutatyon (131), vitamin C ve Vitamin E) tekrar üretilmesine ve oksitlenmeden kaynaklı hasarın onarılmasına yaptığı katkılar gösterilmiştir (15). ALA'nın metal şelatlama etkisinin, yapılarında bulunan tiyol gruplarından kaynaklandığı belirtilmiştir (131,132).

Goralska ve ark., ALA'nın epitel hücrelerinde demir iyonlarında azalmaya yol açtığını ve ALA'nın oksidatif stresin azaltılmasında doğrudan etkisi olduğunu söylemişlerdir (133).

Kısaca, ALA hem suda hem de yağda çözünen ve vücudun her yerinde, hücrelerin içinde ve dışında ROS'u nötralize edebilen biyolojik bir antioksidan olarak düşünülür ve bu nedenle ALA, evrensel antioksidan olarak adlandırılır (134-136).

4.3.3.2. ALA'nın antidiyabetik etkisi

Dünya sağlık örgütünün açıkladığı verilere göre, DM dünya çapında 422 milyon insanı etkileyen ciddi karbohidrat, lipit ve protein metabolizması bozukluğu gösteren sağlık sorunudur (137). Ayrıca DM, ateroskleroz, hipertansiyon, kalp yetmezliği, miyokard enfaktüs, nöropatik ağrı ve inme gibi çeşitli insan hastalıklarının gelişimi için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir (138).

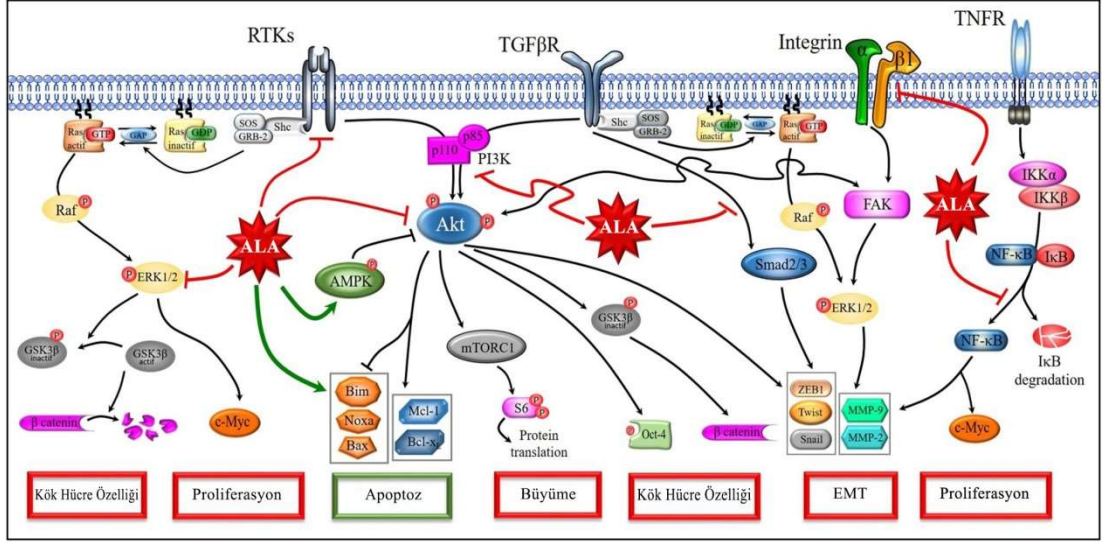
Çalışmalar, DM'nin aşırı ROS oluşumundan ve antioksidan potansiyelin bozulmasından kaynaklandığını göstermektedir (139-141). Bazı çalışmalarda, ALA'nın insüline duyarlı ve insüline dirençli kas hücrelerinde hücre içine glikoz alımını arttırdığı (142,143), Bu etkiyide insülin reseptör substrat 1'de tirozin fosforilasyonu ve membrandaki glikoz taşıyıcıların glukoz taşınımını stimule etmesiyle yaptığı gösterilmiştir (144).

Obez sıçanlarda, kaslardaki AMPK seviyesi azalır, bu sıçanlara ALA verildiğinde aktif AMPK miktarının arttığı, bunun sonucunda da insülin duyarlılığına bağlı glikoz yakımının ve lipit oksidasyonunun arttığı belirtilmiştir (145).

Diyabetin, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) aktivitesini bozarak ROS üretimini arttırdığı, bunun sonucunda da azalmış nitrik oksit (NO) biyoyararlanımı ve artmış oksidatif stres meydana gelir (146). Yaşlı sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, düşen eNOS fosforilasyon düzeyinin ALA verilmesinden sonra kısmen arttığı söylenmiştir (147,148). Bu bilgiler doğrultusunda ALA'nın DM tedavisinde faydalı olabileceği çalışmalarda söylenmiştir.

4.3.3.3. ALA'nın kanser hücreleri üzerine etkisi

Birçok klinik öncesi çalışmada ALA'nın kanser hücreleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Yapılan araştırmalar incelendiğinde, ALA'nın kanserleşme sürecine ve kanser hücreleri üzerine farklı sinyal yolları ve moleküller üzerinden önemli etkilerinin olduğunu görülmektedir (Şekil 4.3.4.) (16).



Şekil 4.3.4. ALA'nın tümör oluşumunda rol oynayan farklı sinyal yolları üzerindeki etkileri. (Yeşil oklar etkinleştirmeyi, kırmızı çizgiler engellemeyi gösterir) (16).

Kanser kök hücreleri, kendi kendini yenileme ve farklılaşma kapasiteleri olan nadir ölümsüz hücrelerdir ve tümöre neden olan farklı hücre tiplerini üretebilirler. Bu popülasyon, hücre proliferasyonunu ve yayılmasını indükleyebilir. Tümör kitlesini hedefleyen tedavilerdeki ilerlemelere rağmen, kanser kök hücreleri etkilenmeden kalabilir ve kanserin tekrar nüksetmesini ve terapötik ilaç direncine neden olabilirler (16).

Bu kök hücre özelliği, Akt yolunun aktivasyonu ile tetiklenir, bu da GSK3β'nin fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna yol açar, bu da β-katenin'in stabilizasyonuna ve fosforilasyon ile POU5F1 geni tarafından kodlanan Oct-4 proteininin aktivasyonuna yol açar. Bu olaylar, kök hücre özelliğinde hayati bir rol oynar. Yapılan bir çalışma, ALA'nın Akt sinyal yolunun fosforilasyonunu azaltarak aktivasyonunu inhibe ettiği, bu sayede kanser kök hücresi benzeri fenotipleri negatif olarak düzenlediği ve oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (Oct-4)'ün proteozomal bozulmasına yol açtığını ortaya koymuştur (16,149).

Çeşitli çalışmalar, ALA'nın kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirdiğini göstermiştir. Özellikle sırasıyla, nükleer faktör kappa-B (NF-κB) sinyalini ve integrin β1/β3'ü inhibe ederek meme ve akciğer kanseri hücrelerinde

tedavide kullanılan paklitaksel'in etkinliğini arttırdığı söylenmiştir (Şekil 4.3.4.) (16,150,151). Benzer şekilde, ALA'nın kemoterapi ilaçlarıyla birlikte kullanılmasının apoptozu (152) ve ilacın sitotoksitesini (153) arttırdığı, aynı zamanda ilaca karşı oluşan direncinde kırıldığını (153) belirten çalışmalar mevcuttur (16).

Hücrel çoğalma ve büyüme, ERK ve PI3K/Akt yollarının aktivasyonu ile kontrol edilir. ALA, ERK'nin fosforilasyonunu, özellikle kanser gelişiminde yer alan çeşitli süreçlerin merkezi olan selüler miyelositomatozisin (c-Myc) aktivasyonunu bloke ederek önler. Ayrıca ALA, Akt aktivasyonunu inhibe eder, bu da translasyon sürecini indükleyen mTORC1'in inhibisyonuna yol açar, böylece hücrel çoğalma ve büyüme azalır (16).

ALA'nın, AMPK aktivasyonunu engelleyerek de Akt sinyal yolunun inhibisyonunu tetikler, böylece kanser hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı belirtilmiştir (145,154-156).

Ayrıca ALA, birçok kanser türünde hücre siklusunun durmasına yol açan sikline bağlı kinaz inhibitörleri olan p27^{kip1} ve p21^{Cip1}'in sentezlenmesini artırır ve kanser hücrelerinin çoğalma hızını yavaşlatıcı etki sağlar (157).

Apoptoz iki protein türü, proapoptotik ve antiapoptotik proteinler tarafından kontrol edilir. Akt'ın fosforilasyonu, anti-apoptotik proteinlerin (örn. Mcl-1, bcl-x_L) uyarılmasını ve pro-apoptotik proteinlerin (örn. Bim, Nova, Bax) azaltılmasını tetikler. ALA üç farklı seviyede hareket eder (16):

- (i) Anti-apoptotik proteinlerin baskılanmasına ve pro apoptotik proteinlerin artmasına neden olan Akt yolunu inhibe eder,
- (ii) ROS üretimi ile pro-apoptotik proteinlerin transkripsiyonunu indükler
- (iii) Akt yolunu negatif olarak düzenleyen AMPK proteinini aktifleştirir.

Anti-proliferatif rolüne ek olarak, ALA'nın farklı kanser hücrelerinde apoptozu doza bağlı uyardığı ve anti-apoptotik/pro-apoptotik proteinler arasındaki oranı düzene sokarak çeşitli kanser hücre dizilerinde apoptozu teşvik eden ROS üretebildiği belirtilmiştir. Yumurtalık, akciğer ve meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmada, ALA'nın konsantrasyona bağlı olarak, mitokondriyal anti apoptotik protein olan Mcl-1, bcl-2 ve bcl-X_L'in regülasyonunu düşürdüğü (158), sadece pro-apoptotik

BH3 proteinlerinden olan BIM ve NOXA'nın regülasyonunu arttırdığı ve sonuç olarak bu düzenlemenin hücre ölümüne yol açtığı belirtilmiştir (159).

ALA'nın, meme kanseri hücre soylarında Bax/bcl2 oranını (apoptotik indeks) ve kaspaz-3 aktivitesi önemli ölçüde arttırdığı (160), Hepatoma kanser hücrelerinde kaspaz-3 ve 9 üzerinden intrinsik apoptotik yolağı tetiklediği (158), kolon kanseri hücrelerinde NF- κ B sinyal yolağını inhibe ederek pro-apoptotik genlerin transkripsiyonunu indükleyen WTp53 proteinini stabilize ettiği ve apoptoz iç yolağını tetiklediği belirtilmektedir. Ancak Dörsam ve ark. ALA'nın p53 stabilizasyonundan bağımsız olarak kolorektal kanserde hücre ölümünü tetiklediğini de göstermiştir (161). Ayrıca, akciğer kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ALA'nın kaspazdan bağımsız diğer hücre ölüm yollarını tetiklediğini belirtmiştir (162).

Örnek verilecek olursa, ALA'nın meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilen ve tümör oluşumunda rol oynayan bazı protein tirozin fosfatazlardan olan PTP1B ve SHP2 aktivitesini azaltarak kanser hücrelerinin canlılığını azalttığı gösterilmiştir (163).

Çalışmalar ayrıca ALA'nın akciğer kanseri (164), meme kanseri (157) ve kolon kanserinde (165,166) ALA'e bağlı hücre ölümünü teşvik eden ROS üretebildiğini ve bu ALA ilişkili ROS'un apoptozun mitokondriyal yolunu tetiklediğini düşündürmüştür.

Kanser hücrelerinin metastazına yol açan epitelyal mezenkimal taşınım (EMT) işlemi bazı protein ve enzim tarafından kontrol edilir. Yapılan çalışmalarda ALA'nın, bazı EMT belirteçlerini (Snail, vimentin ve Zeb1) baskıladığı (167), EMT sürecinin düzenlenmesinde gerekli olan transforme edici büyüme faktörü beta (TGF β) reseptörlerinin ana sinyal dönüştürücüsü olan SMAD sinyallemesini inhibe ettiği (168), β 1/ β 3-integrin ekspresyonunu azaltarak fokal adhezyon kinaz (FAK) aktivasyonunu inhibe ettiği (169), MMP-9 ve MMP-2'nin mRNA seviyelerini azaltarak (170) kanser hücrelerinin göçüne ve invazyonuna engel olduğu gösterilmiştir (16).

ALA'nın kanser hücreleri üzerine başka moleküller üzerinden de etki ettiğini gösteren çalışmalarda bulunmaktadır (107).

Kanser hücreleri, oksijenli ortamda bile glikozu adenozin trifosfat (ATP) üretimi için laktata dönüştürür, buna aerobik glikoliz veya *Warburg* etkisi denir. Kanserli hücrelerde aerobik glikolizin sürekli aktivasyonu, onkogenlerin aktivasyonuna veya tümör baskılayıcılarının kaybına yol açar, bu da kanserin ilerlemesine neden olur. ALA'nın hücre canlılığı/çoğalmasını ve laktat oluşumunu azalttığını ve bu sayede tümör büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir (171).

Akciğer kanseri hücrelerinde ALA, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) fosforilasyonunu baskılayarak Grb2 yoluyla hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve MAPK/ERK'nin de bu yola dahil olduğunu söylemişlerdir (172).

Sonuçlar, ALA'nın kanser hücreleri üzerine farklı şekilde etkilerinin olduğunu göstermektedir.

4.3.3.4. ALA'nın Alzheimer hastalığı üzerine etkileri

Alzheimer hastalığı, çeşitli bilişsel, fonksiyonel ve davranışsal değişikliklere sebep olan nörolojik bir hastalıktır. Bu hastalarda bellek kaybının beta-amiloid (A β) plakların oluşumu ve nörofibrillerde bulunan Tau protein'inin patolojik bir biçimde yükselmesi ile bağlantılı olduğu (173), bazı çalışmalar da Alzheimer patogenezinde oksidatif stresin de etkili olduğunu belirtmiştir (174, 175).

İn-vitro araştırmalar ALA'nın, A β aracılı sitotoksisite üzerinde nöroprotektif etkileri olduğunu (176,177), nöronları A β veya hidrojen peroksit (H₂O₂) tarafından indüklenen sitotoksisiteden koruduğunu (178) belirtmişlerdir.

Çalışmalar ayrıca ALA ve DHLA'in, kolin asetil transferazın aktivasyonu yoluyla asetilkolin (ACh) üretiminin artmasıyla anti-demans veya anti-Alzheimer özellikleri gösterdiğini belirtmiştir (179,180).

Öte yandan, yüksek seviyede serbest radikal ve pro-enflamatuvar sitokinler ile karakterize olan inflamasyonun da Alzheimer hastalığında önemli olduğu (181), ALA'nın da ROS, metal iyonları ve lipit peroksidasyon ürünlerinin uzaklaştırılması, glutatyon seviyesinin artırılması ve sinyal iletim yolları üzerine etki ederek inflamasyonda kompleks bir etki gösterdiği söylenmektedir (107,182).

Benzer şekilde ALA'nın, SK-N-BE insan nöroblastom hücrelerinde DNA hipermetilasyonu üzerinden enflamatuvar sitokin olan IL-1 β ve IL-6 düzeylerini azalttığını söylemişlerdir (183).

Alzheimer olan yaşlı Tg2576 fareleri üzerinde yapılan çalışmalarda, araştırmacılar ALA'nın öğrenme ve hafızada tutma üzerine belirgin bir iyileştirici etkisinin olduğunu (184), fakat A β seviyesi üzerine önemli etki etmediğini söylenmiştir (185).

4.3.3.5. ALA'nın üreme sistemi üzerine etkileri

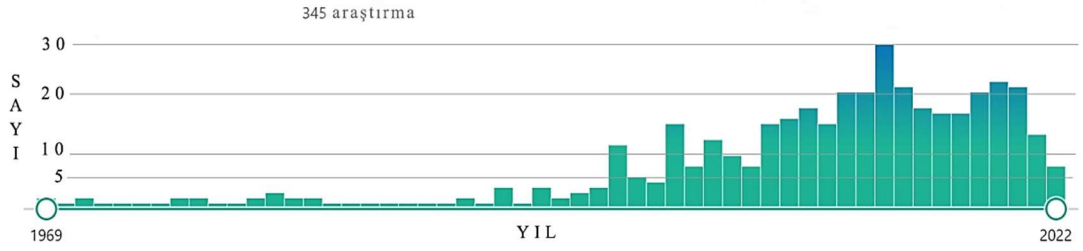
ALA çok fonksiyonlu bir molekül olduğu için, bilim insanları ALA'nın tüm etkilerini açıklamak amacıyla farklı hastalıklar ve sistemler üzerine de araştırmalar yapmıştır. ALA'nın üreme sistemi üzerine etkilerini araştıran az sayıda çalışma da bulunmaktadır;

Dişi Wistar sıçanlarda yapılan çalışmada, ALA'nın intra vajinal uygulamasının implantasyon sürecini etkilemeden gebeliği erken dönemde sonlandırmak için kullanılan mifepriston ve prostaglandin E2 etkilerini önemli ölçüde azalttığını, pro-enflamatuvar sitokin olan TNF- α , IL-1 β , ve IL-6 mRNA sentezini azalttığını söylemişlerdir (186). Diğer bir çalışmada, dişi ratlarda primer folikül yetmezliği modeli oluşturulmuş ve ALA'nın aktif kaspaz 3 reaktivitesini ve yumurtalık hasarını azalttığı göstermişlerdir. Bunun yanında, toksik madde ile oluşturulan folikül yetmezliği modeli sonucunda endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) düşmüş ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) seviyesi ise artmış, ALA uygulandıktan sonra eNOS sağlıklı kontrol grubuna yakın seviyeye yükselmiş, iNOS'ta sağlıklı kontrol grubu seviyesine inmiştir (187).

Başka bir çalışma da ALA'nın 100 mikromolar dozunun ovaryum foliküllerinin *in-vitro* ortamda gelişimlerini iyileştirdiği (188), polikistik over sendromu olan hastalarla yapılan klinik bir çalışmada ALA'nın *in-vitro* fertilizasyon aşamasında faydalı olabileceği söylenmiştir (189).

4.3.3.6. ALA ile yapılan klinik araştırmalar

Kanıt düzeyi yüksek araştırmalar yayınlandıkça, ALA'nın farklı biyolojik etkileri ortaya çıkmaktadır, bunlar da bilim insanlarının dikkatini çekmekte ve merak uyandırmaktadır. Bu nedenle, ALA ile yapılan klinik araştırma sayısının son yıllarda arttığı pubmed tarama grafiklerinde de net olarak görülmektedir (Şekil 4.3.5.).



Şekil 4.3.5. Yıllara göre, ALA ile yapılan klinik araştırma sayısını gösteren histogram.

Yapılan bu klinik araştırmalar incelendiğinde, ALA'nın farklı hastalıklar üzerine birçok olumlu etkisinden bahsedildiği, olumsuz olabilecek neredeyse herhangi bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Bu klinik çalışmalarını incelediğimizde;

Pre-diyabetik tanısı koyulan 12 olgu üzerine hastalığın ilerlemesini engellemek için yapılan bir çalışmada, ALA kullanımının serum glikoz seviyesini ve serum lipit seviyesini değiştirmediğini belirtmişlerdir. Fakat serum insülin miktarında farklılık olduğu ve ALA'nın insülin duyarlılığına katkı yapabileceğini belirtmiştir (190).

Tip I DM tanısı koyulan olgular üzerinde yapılan bir çalışmada, 5 hafta 600 mg/gün ALA uygulamasının CD62 platelet ekspresyonunu azalttığı, CRP ve 8-iso-prostaglandin F2 α serum seviyesini değiştirmediği belirtilmiştir (191). İnsülin bağımlı tip II diyabetli 235 hastaya 2 yıl 600 mg/d ALA uygulamasının, HbA1c seviyesini değiştirmediğini ve klinik anlamda önemli maküler ödemi engellemediği söylenmiştir (192).

Tip 2 DM tanısı koyulan 112 olgu üzerinde yapılan 4 aylık çalışmada, ALA kullanımının enflamasyonla ilişkili CRP (C-Reactive Protein), IL-6 and TNF- α

konsantrasyonlarını önemli ölçüde düşürdüğünü ve bu tedavinin sistemik enflamasyonu önlemek için ilgi çekici olduğunu belirtmişlerdir (193).

Diyabetik nöropatili olgulara günde 600 mg ALA uygulanmış ve 40 gün sonra sonuçlar incelendiğinde, ALA'nın nöropatik semptomlar ve trigliseritleri azalttığını, yaşam kalitesini iyileştirdiğini söylemişlerdir, ancak vücut ağırlığı, kan basıncı, açlık glikozu ve diğer lipid değerlerinde farklılık olmadığını belirtmişlerdir (194).

Gebeliğin 24-28 haftasında olan 60 DM tanılı hamile kadın üzerinde yapılan araştırmada, 8 hafta boyunca günlük 100 mg ALA'nın etkilerine bakılmış, sonuç olarak açlık kan şekerinin ($P < 0.001$), gama-glutamiltansferazın ($P < 0.001$) ve alanin transaminazın ($P = 0.031$) maternal dolaşım değerlerinin azaldığı, üre, kreatinin, ürik asit, aspartat transaminaz ve alkalın fosfataz değerlerinin ise önemli ölçüde değişmediği gösterilmiş ve ALA'nın glikoz metabolizması ve karaciğer fonksiyonu üzerinde bazı yararlı etkileri olduğu söylenmiştir (195).

Yaraları iyileşmeyen 20 olguya, hiperbarik oksijen tedavisiyle birlikte 14 seans 600 mg/gün ALA verilmesinin MMP-2, MMP-9, TIMP1 ve TIMP2 gibi ECM proteinleri, anjiogeneze etkili PDGF-BB, b-FGF ve VEGF- β gibi genlerin ekspresyonu ile plazmada IL-1 β , IL-6 ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin seviyesi üzerine etkilerine bakılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, ALA verilen grupta VEGF- β , b-FGF ve IL-6 ekspresyonu azalmış, ama PDGF-BB ekspresyonu artmış görünmektedir. ALA verilen grupta, MMP-2'nin hem ekspresyonu hem de aktif formunda önemli bir artış olurken, MMP-9'un ise ekspresyonunu ve aktif formunun azaldığı görülmüştür. ALA grubunda, MMP'lerin doğal doku inhibitörlerinden olan TIMP1 ve TIMP2 seviyesinde az miktarda azalma görülse de sonuç anlamlı değildir, ayrıca IL-1 β ve TNF- α seviyelerinde de gruplar arasında önemli bir fark olmadığı belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışmayı yapan araştırmacılar, ALA'nın sitokin seviyelerini, ECM ve anjiogeneze gen ekspresyonlarını etkilediğini ve yaraların iyileşmesini desteklediğini söylemişlerdir (196).

Hemodiyaliz tedavisi gören 63 olgu üzerinde yapılan çalışmada, ALA'nın birincil antioksidan enzimlerden olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) seviyeleri üzerine etkilerine bakılmıştır, 8 hafta sonunda günlük 600 mg ALA'nın sadece SOD miktarını anlamlı düzeyde arttırdığını

göstermişlerdir. Aynı çalışmada ayrıca ALA kullanımının vücut kitle indeksi, albumin ve hemoglobin üzerine de anlamlı etki yapmadığı belirtilmiştir (197).

Hemodiyaliz tedavisi gören 353 olguya 6 ay yapılan tokoferol (666 IU/d) ve ALA (600 mg/gün) kombine tedavisinin, sistemik inflamasyon belirteci olan hsCRP ve IL-6 konsantrasyonlarını değiştirmediği, oksidatif stres belirteci olan F2 izoprostan ve F2 isofurans konsantrasyonunu değiştirmediği, eritropoietin yanıtında arttırmadiği belirtilmiştir (198).

Alzheimer tanısı koyulan olgularda yapılan bir çalışmada da omega 3 ve ALA'nın F2 izoprostan seviyesini, mental durumu, günlük aktiviteleri ve Alzheimer hastalığı değerlendirme ölçeğini değiştirmediği belirtilmiştir (199).

Oksaliplatin veya sisplatin kemoterapisi uygulanan 243 olguya, 24 hafta boyunca 1800 mg/gün ALA uygulandığı ve bu uygulamanın nörotoksisiteyi önlemediği belirtilmiştir (200).

şizofreni tanısı ile tedavi gören 10 olguya, antipsikotik ilaçlara ilave günlük 100 mg ALA uygulamasının, psikopatoloji ölçümlerinde %63,9 azalma, ayrıca nörokognitif parametreler, ekstrapiramidal semptomlar ve lipit peroksidasyonunda azalma, hastalarda da güçlü iyileşme gördüklerini belirtmişlerdir (201).

MS tanısı koyulmuş 52 olguya, 12 hafta boyunca günlük 1200 mg ALA uygulamasının çeşitli inflamatuvar sitokinlerin miktarına etkisine bakılmış, plesoba grubuna kıyasla INF- γ , ICAM-1, TGF- β ve IL-4 seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu, TNF- α , IL-6, EDSS ve MMP-9 seviyesinde anlamlı bir değişiklik olmadiğı söylenmiştir, sonuç olarak ALA'nın MS hastalarına faydalı olabileceğini belirtmişlerdir (202). Ayrıca ALA'nın toplam antioksidan kapasitesini anlamlı derecede arttırdiğı, fakat oksidatif stres belirteci olan süperoksit dismutaz aktivitesi, glutasyon peroksidaz aktivitesi ve malondialdehit seviyelerini değiştirmediği söylenmiştir (203).

MS'li olgular üzerinde ALA uygulamasının cAMP konsantrasyonunu arttırdiğı ve IL-6, IL-17 ve IL-10 seviyelerini de önemli miktarda azalttığı söylenmiştir. ALA'nın anti enflamatuvar özelliğine cAMP/PKA sinyal yolağının kısmen etki ettiğini belirtmişlerdir (204).

Yoğun bakım ünitesinde yatan durumu kritik 80 olgu üzerinde 10 gün boyunca günlük 900 mg ALA uygulamasının, toplam antioksidan düzeyini anlamlı düzeyde arttırdığı, glikoz düzeyinide anlamlı derecede düşürdüğü ve homeostaz modeli değerlendirmesi-tahmin edilen insülin direnci (HOMA-IR) artışında engellediği belirtilmiştir. MDA, insülin, CRP, albümin (Alb), prealbumin (preAlb), toplam protein ve toplam lenfosit serum seviyeleri sayısı üzerine anlamlı etki yapmadığı söylenmiştir. Sonuç olarak ALA'nın kritik hastalarda antioksidan savunmayı ve insülin direncini iyileştirmek için etkili bir destek olabileceği belirtilmiştir (205).

Karaciğer transplantasyonunda, ALA güvenliğini ve etkinliğini karşılaştırmak için 40 olgu üzerinde yapılan çalışmada, 100 ml sodyum klorür (NaCl) içinde çözdürülen 600 mg intravenöz ALA'nın HIF-1 α seviyesini yükselttiği, Prolilhidroksilaz-1 (PHD1) seviyesini düşürdüğü, apoptozu inhibe eden BIRC2 gen ekspresyonunu yükselttiğini söylemişlerdir. Fakat hücre büyümesi (Sestrin2), sağ kalım (*mammalian target of rapamycin*; mTOR), hücre çoğalması (REG3a), sitokin üretimi (IkBa) ve doku hasarı koruması (SLPI; salgı lökosit proteaz inhibitörü; *secretory leukocyte protease inhibitör*) ile ilgili gen ekspresyonlarında anlamlı değişiklik olmadığını söylemişlerdir. Organ nakli sonrası sistemik stres yanıtını gösteren SLPI ve REG3a/PAP protein seviyelerinde ALA uygulanan hastalarda daha düşük olduğu ve daha az enflematuvar olduğunu düşündüklerini söylemişlerdir. Sonuç olarak ise ALA'nın karaciğer transplantasyonunda kullanım için güvenli olduğunu, hipoksiye ve oksidatif strese karşı koruma sağlayan gen değişikliklerini indüklediğini ve postreperfüzyon sendromunun görülmesini azalttığı söylenmiştir (206).

Radyolojik işlemlerden önce olgulara verilen oral antioksidan tedavinin röntgen kaynaklı DNA hasarını azaltmada etkinliğini ölçmek için yapılan çalışmada, aralarında ALA'nın da bulunduğu antioksidan maddeler kullanılmıştır, DNA hasarı floresan olarak etiketlenmiş gama-H2AX proteini kullanılarak periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) görüntülenmiştir, sonuç olarak hastaları ve sağlık çalışanlarını radyasyona bağlı DNA hasarından korumak için çekim öncesinde antioksidan madde alınmasının etkili bir yol sağlayabileceğini söylemişlerdir (207).

Romatoid artrit tanısı koyulmuş 70 kadın olgu üzerinde yapılan araştırmada, günlük 1200 mg ALA uygulamasının, serum yüksek hassasiyetli CRP, TNF- α , IL-6

ve eklem erozyonunun bir belirteci olan serum MMP-3 seviyelerinde plesebo grubuna göre anlamlı fark gözlemlenmediği söylenmiştir (208).

Romatoid artrit tanısı koyulmuş 70 olguya, 8 hafta boyunca günlük 1200 mg ALA uygulanmasına rağmen, total antioksidan kapasitesinde, antioksidan enzim (SOD, GPx ve ARE) aktivitesinde ve serbest radikal miktarının artmasıyla artan bir molekül olan malondialdehit (MDA) miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir (209).

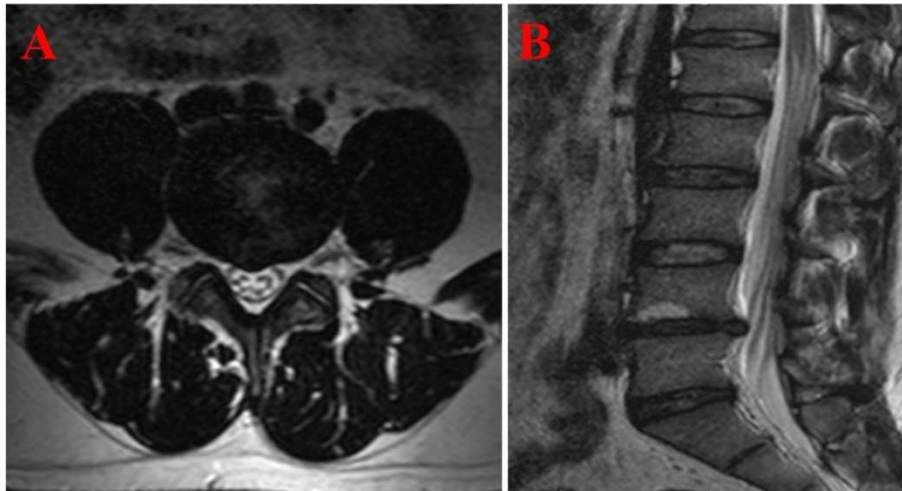
ALA'nın İVD dejenerasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı herhangi bir klinik öncesi veya klinik araştırmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, yapılan klinik ve prelinik çalışma sonuçları incelendiğinde, ALA'nın bazı hücrelerde proliferasyonu arttırdığı, reaktif oksijen türlerini inhibe ederek hücreyi birçok olumsuz etkiden koruduğu, hücrenin enerji metabolizmasına olumlu katkı sağladığı, inflamatuvar sitokinleri baskıladığı ve matriksi yıkan MMP'lerin seviyelerini düşürdüğü görülmüştür. İVD dejenerasyonunun patofizyolojisi düşünüldüğünde, ALA'nın bu terapötik etkilerinin dejenerasyonu tedavi edici olabileceğini düşünerek bu çalışmayı yaptık.

5. MATERYAL VE METOD

Bu araştırma projesi, İstanbul Medipol Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun, 27/02/2019 tarihli ve E.8223 sayılı oluru ile gerçekleştirildi. Araştırmada primer hücre kültürlerinin hazırlanması aşamasında kullanılan dokular için olgulardan, operasyon öncesinde bilgilendirilmiş gönüllü olur formları ile rızaları alındı. Deneysel hataları minimize edebilmek için analizler üç kez tekrar edildi. Primer hücre kültürlerinin beslenmesi; hücre kültür ortamının iki günde bir kez ve taze hazırlanmış hücre kültürü besiyeri medyumunu ile değiştirilmesi suretiyle gerçekleştirildi.

5.1. Araştırmaya Dahil Edilme ve Araştırmadan Dışlanma Kriterleri

Rezeke edilen dokular; cerrahi girişim endikasyonu, medikal ve konservatif tedaviye yanıt alınamayan ve pre-operatif nörolojik muayene, lomber spinal rezonans görüntüleme (MRG), gerek duyulan durumlarda ise lomber spinal bilgisayarlı tomografi (BT) ve alt ekstremitte elektromyografi (EMG) tetkikleri sonrasında lomber disk hernisi tanısı konulan olgulardan meydana getirildi (n=15) (Resim 5.1.1.).



Resim 5.1.1. Subligamentöz lomber disk protrüzyonuna ait T2-ağırlıklı sagittal ve aksial MRG (A. Aksiyel T2A sekans, B. sagittal T2A sekans MRG de L4-5 diskinde santral posteriorprotrüzyon mevcuttur).

Disk dejenerasyonunun derecelendirilmesi, *Pfirrmann* sınıflaması yardımı ile T2-ağırlıklı MRG sayesinde gerçekleştirildi (210).

Bu olgulardan romatolojik, inflamatuvar ve/veya enfeksiyöz herhangi bir hastalığa sahip olanlara ait dokular araştırmadan dışlandı (n=3). Kalan olgulardan (n=12), son üç hafta içerisinde non-steroidal antiinflamatuvar ilaç (NSAID) kullanan olgulara (3 kadın, 3 erkek; n=6) ait dokular da araştırmada primer hücre kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmadı.

Primer hücre kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan dokuların alındığı olguların (n=6) özgeçmişinde tip-2 DM ve/veya sigara içme öyküsünün olmamasına; anamnezlerinde, Vitamin D Reseptör (VDR) genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizm öyküsünün bulunmamasına dikkat edildi.

5.2. Dejenere İVD Dokularının Cerrahi Rezeksiyonu

Lomber disk hernisi nedeni ile lomber mikrodiskektomi ve/veya lomber mikro-sekestrektomi operasyonları uygulanan olgulardan elde edilen dokulardan primer hücre kültürleri hazırlandı.

Bunun için; prone pozisyonunda, cerrahi yapılacak mesafenin tayini, C-kollu skopi ile işaretlenerek tespit edildiği olgularda antisepsi sağlandı. Ardından, steril olarak operasyon sahası örtüldü. Cerrahi girişim yapılacak seviyenin üzerinde iki santimetrelik orta hat cilt insizyonları yapıldı.

Cilt ve cilt altı geçildikten sonra, lomber yüzeysel fascia insize edilerek, paravertebral adaleler subperiostal olarak diseke edildi. Daha sonra, hemiparsiyel laminektomiye takiben flavektomi uygulandı. Flavektomiye takiben dura ve spinal kök tanınarak mediale alındı ve sonrasında 15 numaralı bistüri ile disk kapsülü insize edilerek disk pançı yardımı ile mikrodiskektomi işlemi tamamlandı (211).

5.3. Primer Hücre Kültürlerinin Hazırlanması

Olgulardan cerrahi operasyon ile alınan dokular, hücresel olarak uzman patolog tarafından değerlendirilip onaylandıktan sonra primer hücre kültürlerinin hazırlanması aşamasına geçildi. Rezeke edilen dokular %1 penisilin-streptomisin (CatNo#15070063; Thermo Fisher Scientific, 101 Waltham MA USA) içeren

Dulbecco's Modification of Eagle Medium (DMEM, Gibco, CatNo# 11965092; Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) solüsyonu içeren Falcon tüplere aktarıldı. Maksimum iki saat içerisinde dokuların 4⁰C'de laboratuvara transfer edilmeleri sağlandı.

Araştırmaya dâhil edilen dokuların alındığı olguların yaş ortalaması 38,43±9,74 yıl idi. Akış kabini içerisinde petri kaplarına aktarılan dokular %0,9 izotonik sodyum klorür çözeltisi üç kez irrije edildi. Daha sonra mekanik yoldan parçalanması sağlanan dokular, enzimatik yoldan da parçalanabilmesi adına Falcon tüplere aktarıldı.

Bu tüpler içerisine; 50ml Hanks'ın dengeli tuz solüsyonu (HBSS, CatNo#88284; Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) içerisinde, 0,375µg kolajenaz tip-II (CatNo#17101015; Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) çözüldürülen karışım ilavesi gerçekleştirildi. 37⁰C ve %5 karbondioksit ortamına sahip inkübatöre alınan tüpler, kapakları hafif açık kalacak şekilde bir gece inkübatörde bekletildi.

Süre bitiminde Falcon tüpler, kanıt düzeyi yüksek olan yayınlardan (212, 213) elde edilen protokole göre; iki kez 1200 rpm'de, 5'er dakika ardışık olarak santrifüj edildi. Elde edilen hücre süspansiyonları, T-25 flasklara aktarıldı. Hücrelerin üzerine, içinde fetal bovin serum, %1 L-Glutamin (CatNo# 25030081; Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA), penisilin-streptomisin ve amfoterisin (CatNo# 15290026; Thermo Fisher Scientific, Waltham MA USA) eklenmiş olan DMEM besiyeri eklenerek 37⁰C ve %5 karbondioksit ortamına sahip inkübatöre alındı ve hücrelerin flask yüzeyine tutunup çoğalmaları sağlandı.

%70-80 oranında konfluensi kazanan bu primer kültürler tripsinizasyon işlemi ile pasajlandı. Üçüncü pasajdan sonra yaklaşık %90 konfluent hale gelen kültürler, tekrardan hücre tipi ve hücre yapısı bakımından uzman patoloğ tarafından değerlendirilip onaylandı. Sonrasında tripsinizasyon işlemiyle hücreler yüzeyden kaldırıldı ve Tripan mavisiyle boyandı, sonra *Thoma lamında* hücre sayımı gerçekleştirildi. Sayılan hücreler, gerçekleştirilecek olan analizlere göre, 96-kuyucuklu-plakalar için 1,5×10⁴ hücre/kuyucuk ve 10-mm petri kapları için 4.4×10⁶ hücre/petri olacak sayıda hücrelerin ekimi gerçekleştirildi. Ardından tüm örnekler tekrardan 37⁰C ve %5 karbondioksit içeren inkübatörde bir gece inkübe edildi.

5.3.1. Primer hücre kültürlerine ALA uygulanması

Başlangıçta molekül ağırlığı 206,33 g/mol olan ALA'nın 600 mg dozundan faydalanılarak ana stok solüsyonu, mililitresinde 50 mg ALA olacak şekilde etanol içerisinde çözündürüldükten sonra, taze hazırlanmış besi yeri medyumunu ile dilüe edilerek alikotlara ayrıştırıldı. Doz belirlenmesi esnasında; Tibullo ve ark. (214); Gomes ve ark. (116); Dinicola ve ark. (216) çalışmaları ile Jeon ve ark. (168) çalışmaları esas alındı ve bu çalışmalara göre doz yanıt eğrisi denemeleri 50, 100 ve 250 µm dozlarına göre hesaplandı. Sonrasında primer hücre kültürü örneklerine, son konsantrasyonları 250 µm olacak şekilde taze hazırlanmış ALA çözeltileri uygulandı.

5.4. İnvirt Işık Mikroskopisi ve Floresan Mikroskopisine Yönelik Analizler

Giemsa (Kat # GS500, Sigma, ABD) boyama için ayrı ayrı hazırlanan kontrol ve çalışma grubu örneklerindeki hücreler 1:20 oranında deiyonize su ile dilüe edilen Giemsa boyası ile oda ısısında boyandı, sonrasında deiyonize su ile fazla boya yüzeyden yıkandıktan sonra, örneklerin invert ışık mikroskobu ile hücre yapıları değerlendirildi (217, 218).

İnvirt ışık mikroskobu ile (Olympus CKX41; Olympus, Tokyo, Japonya) x4, x10, x20 ve x40 gibi çeşitli büyütme altında, AF ve NP hücreleri yüzey morfolojisi ve ECM yapılarına ait değerlendirmeler gerçekleştirildi. Bunun için ALA uygulanan ve uygulanmayan örneklerde, hücre organizasyonunun mikrofotografı, Olympus Cell Soft Imaging (Olympus Corporation; version, Cell^A5.1) programından faydalanılarak incelemeye alındı.

Hücre canlılığı ve varsa eğer hücre ölümünün apoptotik olup olmadığını belirlemek için, aynı zamanda MTT testinin sonuçlarıyla da kıyaslamak amacıyla, nükleik asit bağlayıcı akridinoranj/propidium iyodür (AO/PI) boyaması yapıldı.

AO, canlı veya ölü tüm çekirdekli hücreleri yeşil bir floresan renkle boyar, fakat PI, zayıf membran bütünlüğüne sahip ölü hücrelere nüfuz eder ve kırmızı bir floresan renk oluşturur. Sonuç olarak, hücreler AO/PI ile boyandığında, canlı hücreler yeşil floresan renk, ölü hücreler kırmızı floresan renk görülür (219).

AO/PI boyası, 5 gr sodyum-EDTA, 2 mg PI, 25 ml FBS ve 2 mg AO'nun 1 ml %99 etanol içerisinde çözündürülüp, sonrasında hacmin steril bidistile su ile 100 ml'ye

tamamlanmasıyla hazırlandı. Hücre kültürleri, oda ısısında 10 dakika AO/PI ile boyandı (218). Daha sonra floresan mikroskop (DM 2500; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ile mikro fotoğraflar elde edildi. Görüntüler CytovisionCapture Station görüntüleme yazılımı kullanılarak değerlendirildi (Version 7.0; Genetix; Leica Microsystems).

5.5. Moleküler Analizler

5.5.1. MTT-ELISA hücre canlılık, toksisite ve proliferasyon analizleri

Spektrofotometrik analizler esnasında kullanılan metil tiazol difenil tetrazolyum [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid] (MTT) kiti (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay, Cat#V13154), Thermo Fisher Scientific, Waltham MA Amerika Birleşik Devletleri'nden temin edildi.

İçerisinde 5 mg MTT bulunan şişeye 1 ml steril PBS eklenerek 12 mM MTT stok solüsyonu hazırlandı, tam çözünme gerçekleşene kadar vortekslendi. Sonrasında, 96-kuyucuklu-plakaların her kuyucuğunda konfluent hale gelen hücrelerin üzerine 100 µl taze DMEM ve 10 µl stok MTT solüsyonu eklendi. Işıktan korundu ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Daha sonra, her kuyucuktaki mevcut karışımdan 25 µl atılıp, onun yerine 50 µl DMSO eklendikten sonra 37 °C'de 10 dakika daha inkübe edildi.

Yukarıda açıklanan işlemler hem kontrol grubu hem de ALA ilave edilen örneklerin hepsine sırası ile 24'üncü, 48'inci ve 72'nci saatlerde uygulandı. Sonrasında, enzim-bağlı immunosorbent analizi ([ELISA]/Optical density-OD) mikrolaka okuyucu (Mindray MR 96A, Çin) ile 570 nanometre (nm)'de her kuyucuk için absorpsiyon ölçümü yapıldı.

Kontrol grubunun canlılık oranının %100 olduğu kabul edildi. Proliferasyon; "*Test OD/ Kontrol ODX100*" formülü ve "proliferasyon inhibisyonu; "*1- Test OD/ Kontrol OD*" formülleri ile hesaplandıktan sonra istatistiksel analizler için veriler kayıt altına alındı (18, 19, 212, 219-221). Bundan sonra, örneklerin analizine polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleriyle devam edildi.

5.5.2. Kantitatif gerçek zamanlı PCR yöntemiyle gen ifadelerinin ölçümü

Gen ifadelerine ait sonuçlar, 7500 Fast-SDS program V.2.3 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) yardımı ile elde edildi ve bağıl niceleme [relative quantification (RQ)] cinsinden sunuldu. Analizler esnasında, hedef gen ekspresyonunu normalize etmek için endojen kontrol olan aktin beta (ACT β) kullanıldı.

Analizlerin öncesinde, primer hücre kültürleri içerisinde, total ribonükleik asit (RNA) elde edilirken, PureLink RNA mini kit (cat. no. 12183025; Thermo Fisher Scientific, Inc.) ve yüksek kapasiteli cDNA RT kit (cat. no. 4368814; Thermo Fisher Scientific, Inc.) kullanılarak, cDNA elde edildi.

5.5.2.1 Hücrelerden total RNA izolasyonu

1) Hücre kültürü örnekleri 15 ml steril santrifüj tüpüne toplandı ve +4 °C 2000g hızda 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı. %1 oranında 2-merkaptoetanol içeren lizis solüsyonundan 0,6 ml eklenerek hücre pelleti dağılına kadar pipetaj yapıldı. Sonrasında hücreler maksimum hızda 2 dakika santrifüj edildi.

2) Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve bu tüp içerisine, süpernatant hacmine göre 1:1 oranında %70 (h/h) soğuk (4°C) EtOH ilave edildi.

3) Daha sonra örnekler spinkolonlara transfer edildi. 12000g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Koleksiyon tüpünde biriken atık kısım döküldü. Örnek bitene kadar spinkolonunda santrifüj işlemi tekrar edildi.

4) Spinkolon üzerine 700 μ l yıkama solüsyonu I eklendi. 12000g hızda 15 saniye santrifüj edildi.

5) Spinkolonlar tekrar temiz bir eppendorf tüpünün üzerine yerleştirildi. Ethanol eklenmiş yıkama solüsyonu II'den 500 μ l spinkolon üzerine ilave edilerek 12000g hızda 15 saniye santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrasında dipte biriken süzüntü boşaltarak spinkolon aynı eppendorf tüpe tekrar yerleştirildi. Sonra bu işlem bir defa daha tekrar edildi.

6) Ependorf tüp 12000g hızda 1-2 dakika oda sıcaklığında boş olarak santrifüj edilerek süzüntünün tamamı uzaklaştırıldı. Spinkolon yeni bir steril ependorf tüpe yerleştirildi.

7) Her bir örnek üzerine 50µl RNAaz içermeyen su ilavesi gerçekleştirildi. Bu ilaveden sonra oda ısısında örnekler bir dakika bekletildi. Örnekler 12000g'de 2 dakika santrifüj edildi.

8) Spinkolon uzaklaştırıldı ve ependorf tüpte 50 µl miktarında total RNA izole edildi

Her örnek içerisinde elde edilen RNA miktarı ultraviyole spektrofotometre yardımı ile ölçüldü. Total cDNA eldesinde, 50 ng RNA, yüksek kapasiteli bir cDNA reverse transkripsiyon kiti ve bir termal döngüleyici kullanıldı.

5.5.2.2. Ters transkriptaz PCR ile cDNA eldesi

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonunda; kontrol grubu ve ALA uygulanan hücrelerden elde edilen RNA'lar kullanıldı. Kimyasallar kullanılmak üzere -20°C'den buz içerisine alındı. Taq DNA polimeraz -20°C'de sıvı halde bulunur ve Taq DNA polimerazın yapısı sıcaklıktan etkilenmektedir. Oda koşullarında eritilen PCR bileşenleri vortekslendi. Karışım işlemleri buz içerisinde gerçekleştirildi. Master karışımı oluşturan bileşenlerin miktarı ve oranları Tablo 5.5.1.'deki gibidir.

Tablo 5.5.1. Ters Transkriptaz PCR için gerekli reaksiyon karışımı.

Reaksiyon karışımı	Miktar (µl)
dH ₂ O (Nükleaz bulunmayan)	4,2
10x RT tampon	2,0
10x RT random primerler	2,0
MultiScribe Revers transkriptaz	1,0
25x dNTP karışımı(100mM)	0,8
RNA	10,0
Toplam	20,0

Tablodaki oranlar dikkate alınarak, önce buz içerisindeki steril ependorflara dH₂O eklendi. Sonra karışıma en son ters transkriptaz enzimi olacak şekilde diğer bileşenler eklendi ve tüpler vortekslendi. Örnekler ısısız döngü cihazına yerleştirildi. Kantitatif ters-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) Applied Biosystems 7300/7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Inc.)’de gerçekleştirildi. Örnekler Tablo 5.5.2.’de gösterilen sıcaklık ve sürelerle tabii tutuldu.

Tablo 5.5.2. Isısız döngü cihazının süre ve sıcaklıkları.

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

5.5.2.3 Kantitatif gerçek zamanlı PCR

Bu analiz, elde ettiğimiz cDNA’lar üzerinden gen ifadesinin saptanması veya gen ifadelerinin birbirleri ile kıyaslanması amacıyla yaptığımız PCR temelli hassas bir tekniktir. Tüm genler, Thermo Fisher Scientific (Waltham MA USA) TaqMan® gen ekspresyon testlerinden ACTβ (Cat#4331182, Hs01060665_g1), CHAD (Cat#4331182, Hs00154382_m1), COMP (Cat#4331182, Hs00164359_m1), IL-1β (Cat#4331182, Hs01555410_m1), MMP-7 (Cat#4331182, Hs01042796_m1) ve MMP-19 (Cat#4331182, Hs00418247_g1) ile amplifiye edildi.

Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Öncelikle cDNA örneklerinin her biri kullanılacak miktar kadar buz içerisine yerleştirilmiş şekilde olan steril ependorf tüplere eklendi. Daha sonra steril bir ependorf içerisinde her bir gen bölgesine özgül ticari kit varlığında ayrı ayrı Tablo 5.5.3’teki reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 5.5.3. Kantitatif gerçek zamanlı PCR bileşenleri ve miktarları.

PCR Reaksiyon içeriği	Miktar (μl)
Master karışımı	100
Gene spesifik assay	10
dH ₂ O	70
Total	180

Her bir gen bölgesine özgü olarak hazırlanan karışımdan (Tablo 5.5.3.) 18'er µl 96 kuyucuklu mikropklara yerleştirilerek üzerlerine ilgili cDNA örneklerinden 2'şer µl eklendi. Plakanın üzeri optik kaplayıcı ile kaplanarak maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edilerek mikropklara içeriklerinin çökmesi sağlandı. Plaka Applied Biosystems Fast 7500 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazının içine yerleştirilerek. Uygun PCR koşullarında çalışıldı (Tablo 5.5.4.). Sonuçları elde etmek için, bir referans (kalibratör) numunesi (Kontrol grubu, 0h) kullanıldı ve RQ değerleri, $2^{\Delta\Delta Cq}$ metodolojisi ile hesaplandı (18,19,212,219-221).

Tablo 5.5.4. Gerçek zamanlı PCR'nin sıcaklık ve zaman döngüsü.

Basamak	UDG inkübasyon	Ampli-Taq Gold, UP enzim aktivasyon	PCR	
			40 Döngü (<i>Cycle</i>)	
			Denatürasyon	Bağlanma
Zaman	2 dakika	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Sıcaklık	50°C	95°C	95°C	60°C

5.6. İstatistiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde Minitab® (Version 22) paket programı kullanıldı. Veriler %95 güven aralığında değerlendirilirken alfa anlamlılık değeri <0,05 olarak kabul edildi. Varyans analizi (ANOVA) sonrası gruplar arasında görülen anlamlı farklılığın hangi gruplarda önemli olduğu, Tukey's Honestly Significant Difference (Tukey's HSD) testi ile saptandı.

6. BULGULAR

MTT-ELISA testi ile hücre canlılığı, toksisite ve hücre proliferasyon analizi yapıldı (Tablo 6.1.).

Tablo 6.1. Proliferasyona ait verilerin tanımlayıcı istatistik sonuçları.

Değişken	Zaman (saat)	Mean±StDev	SE Mean	SS	Minimum	Maksimum	Medyan
Absorbans (nm)	24	0,4626±0,1042	0,0301	2,6875	0,3627	0,5625	0,4626
	48	0,4618±0,1573	0,0454	2,8313	0,3111	0,6125	0,4618
	72	0,4601±0,2447	0,0706	3,1982	0,2257	0,6944	0,4601

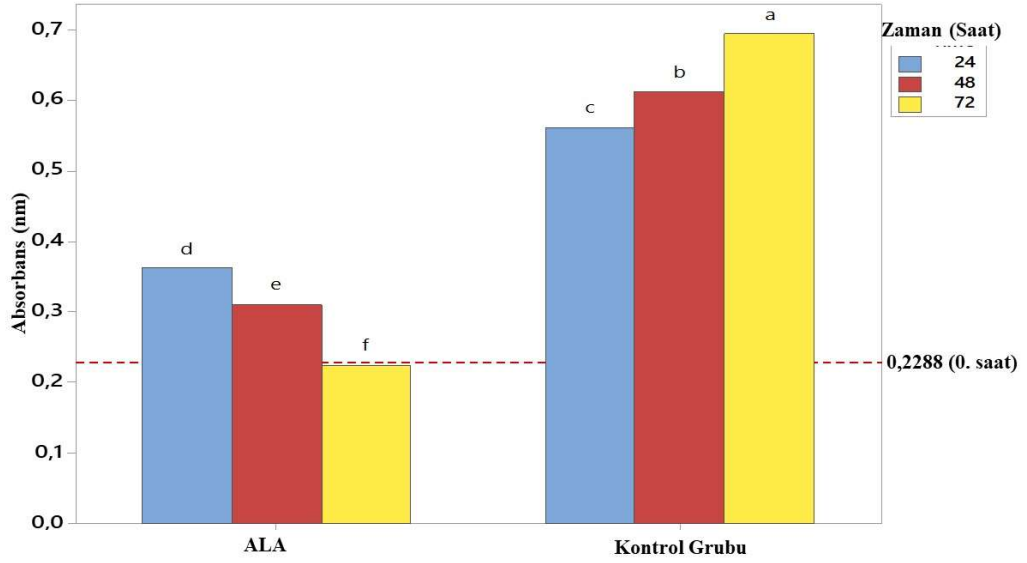
*Mean±StDev;Ortalama±Standart sapma, SS;Sum of square (Kareler toplamı ortalaması), SE Mean;Standard error of mean (Ortalamaların standart hatası).

Kontrol grubundaki hücrelerin sağlıklı çoğalmasının devam ettiği ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<,05$). Ancak çalışma grubunda (ALA uygulanan) 24. saatten 72. saate proliferasyonun baskılandığı ve toplam hücre sayısının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu kaydedildi ($P<,05$) (Tablo 6.2.) (Şekil 6.1.).

Tablo 6.2. Hücre canlılık, toksisite ve proliferasyon verilerinin ANOVA ile değerlendirilmesine ait bulgular.

	DF	Adj SS	Adj MS	F-Değeri	P Değeri*
ALA Uygulanan Çalışma Grubu	1	0,93954	0,939542	1,17443	0,00
Zaman	2	0,00004	0,000020	2551.25	0,00
Uygulama vs. Zaman	2	0,11062	0,055310	6913691.25	0,00

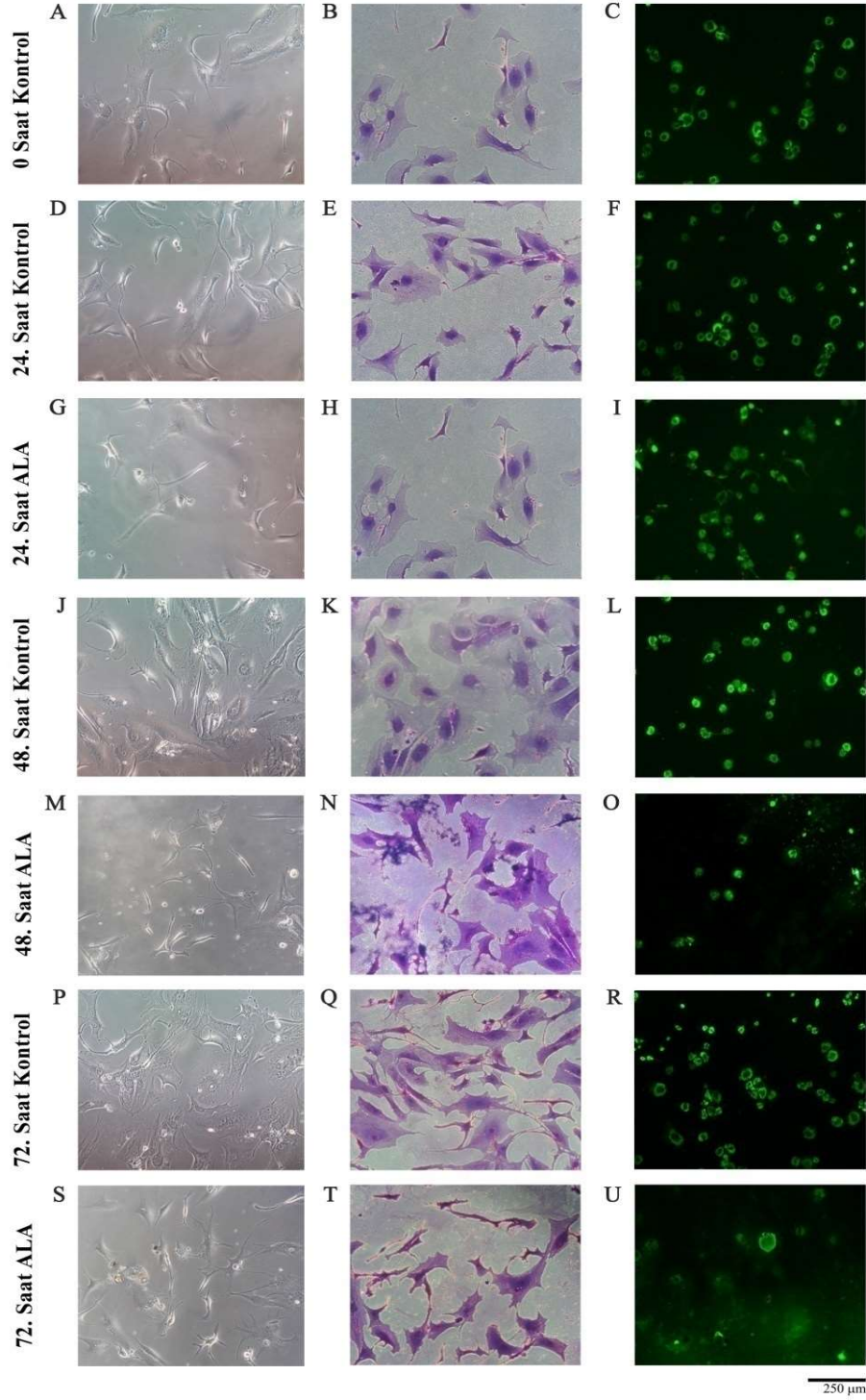
* Tek yönlü ANOVA: DF; degrees of freedom, Adj; adjusted, SS; Sum of square, MS; mean square.



Şekil 6.1. ALA uygulanan ve uygulanmayan örneklerde zamana bağlı proliferasyon göstergesi. A'dan Z'ye doğru gidildikçe gruplar arasındaki farklılığın önem sırası kötüleşmektedir. 0,2288 nm absorban değeri ise sıfırıncı saatte ALA uygulanmayan kontrol grubuna ait değerdir.

Deney sırasında invert ışık mikroskobu kullanılarak hücre morfolojisi ve çoğalması izlendi (Resim 6.1., sütun 1 A, D, G, J, M, P ve S). Ek olarak, deney sonunda hücreler Giemsa ile boyandı ve morfoloji ve ECM gelişimi açısından incelendi (Resim 6.1., sütun 2 B, E, H, K, N, Q ve T). Hücre canlılığını belirlemek ve MTT-ELISA proliferasyon ve toksisite testlerinden elde edilen sonuçların doğruluğunu kanıtlamak için, AO/PI boyamasının floresan mikroskobu görüntülerinin de azalmış proliferasyon sergilediği gözlemlendi (Resim 6.1., sütun 3 C, F, I, L, O, R ve U).

Mikroskobik değerlendirmelerde ALA uygulamasının hücre proliferasyonunu ve ECM organizasyonunu olumsuz etkilediği görülürken, AO/PI boyamasında görüldüğü gibi ALA uygulanan doz ve sürelerde sitotoksositeye bağlı apoptotik hücre ölümü gözlenmemiştir.



Resim 6.1. AF/NP hücrelerinin, AO/PI boyama sonrası floresan ataçmanı, Giemsa boyama sonrası invert ışık mikroskobu ile değerlendirilmesi. Kontrol grubu 0 saat (A, B, C), 24. saat kontrol grubu (D, E, F), 24. saat ALA grubu (G, H, I), 48. saat kontrol grubu (J, K, L), 48. saat ALA grubu (M, N, O), 72. saat kontrol grubu (P, Q, R), 72. saat ALA grubu (S, T, U).

Gerek mikroskobik gerekse moleküler düzeyde gerçekleştirilen bu analizlere ek olarak, gen ifadelerinin de değişim gösterdiği görüldü (Şekil 6.2.).

Sıfırıncı saatte RNA referansı için baz alınan kontrol grubunda CHAD, COMP, IL-1 β , MMP-7 ve MMP-19 genlerine ait RQ değerlerinin sırası ile “0,71”, “0,62”, “0,75”, “0,94” ve “0,87” fold olduğu raporlandı.

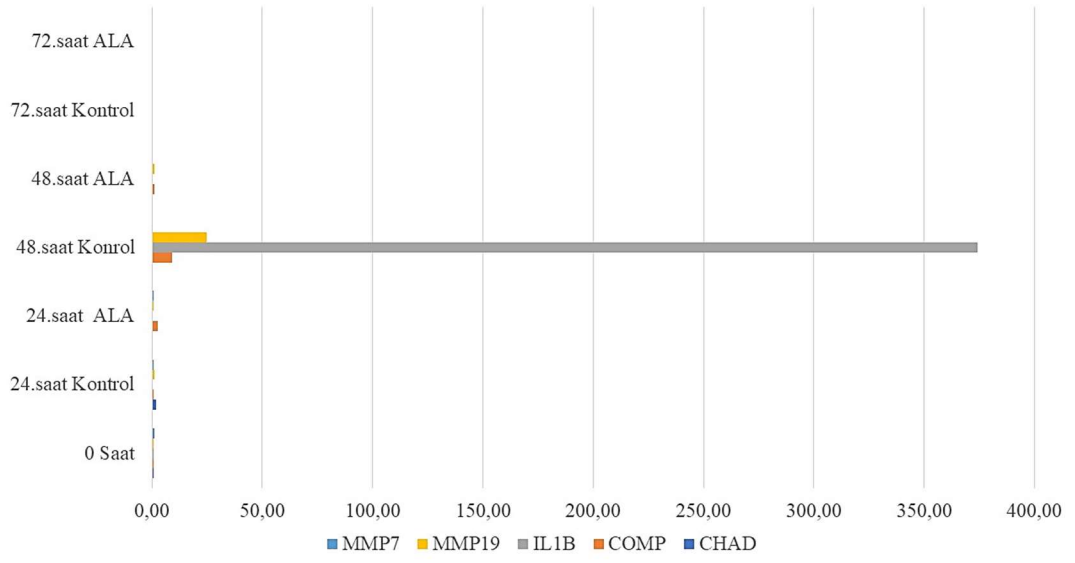
Kontrol grubu örneklerinde, CHAD ekspresyonunun 24. saatte zirve yaptığı ve 1,90 fold'a çıktığı, ancak aynı zaman diliminde çalışma grubunda bu ekspresyonun 0,39 fold'a düştüğü kaydedildi. Hem kontrol grubunda hem de çalışma grubunda 72. saatte doğru zaman ilerledikçe CHAD gen ekspresyonunun görülmediği raporlandı (P <,05).

COMP gen ekspresyonu, kontrol grubu referans RQ değerine oranla, kontrol grubunda 24. saatten 72. saate kadar yükseldi. Ancak çalışma grubunda COMP değeri 72. saate yaklaşıldıkça azalmış ve 72. saat ölçümünde 0,34 fold'a düşmüştür (P <,05).

IL-1 β gen ekspresyonuna ait RQ değeri, 24. saatte her iki grupta da düşerken, 48. saatte kontrol grubu örneklerinde pik yaptığı, çalışma grubunda ise eksprese edilmediği anlaşıldı. Ardından hem kontrol hem de ALA verilen çalışma grubunda 72'nci saatte eksprese edilmediği anlaşıldı (P<0,05).

MMP-7 gen ekspresyonu, kontrol grubu örneklerinde 24. saatte 0,79 fold'a, çalışma grubu örneklerinde ise 0,50 fold'a geriledi. Her iki grupta 48 ve 72. saatte gen ekspresyonu görülmedi (P <,05).

MMP-19 gen ekspresyonunun kontrol grubunda 24. ve 48. saatlerde arttığı fakat 72. saatte azalarak başlangıç referans değeri olan 0,87-fold'dan 0,10 fold'a düştüğü gözlemlendi (P<,05). Çalışma grubu örneklerinde ise MMP-19 ekspresyonu 48. saat hariç diğer zaman dilimlerinde azalmıştır. Bu sonuçların tümü istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü (P<,05).



Şekil 6.2. CHAD, COMP, IL-1 β , MMP-7 ve MMP-19 gen ifadelerinin Real Time-qPCR değişim göstergesi.

7. TARTIŞMA

Ortalama yaşam boyu görülme oranı %80'lere ulaşan (2) ve milyonlarca insanın muzdarip olduğu bel ağrısı (1) hem kişilerin yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte hem de başta sağlık ekonomisi olmak üzere uluslara büyük ekonomik yükler getirmektedir (2). Yaşın ilerlemesiyle birlikte disklerin ciddi şekilde dejenere olduğu (4) düşünüldüğünde, İVD dejenerasyonu bel ağrısının önemli sebepleri arasında gösterilmektedir (1)

Literatürde; bazı genomik lokusun daha önce İVD dejenerasyonu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. COL1A1, COL9a3 ve VDR genlerinde meydana gelen tek nükleotid polimorfizmleri, lomber disk dejenerasyonunun gelişimi ile ilişkili görünmektedir. Bu ilişki muhtemelen aynı bireyde birden fazla mutasyon mevcut olduğunda daha belirgin olarak ortaya çıkmaktadır fikri öne sürülmektedir (222). Lomber disk dejenerasyonu olan hastalarda plazma VDR seviyeleri ve VDR ekspresyonu anlamlı derecede düşük olduğu ve TaqI polimorfizminin TT genotipi, lomber disk dejenerasyonu olan hastalarda daha düşük plazma VDR seviyeleri ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bilgisine de yine literatürde rastlanmaktadır (223). Tüm bunlara ek olarak; tip-2 DM varlığının veya sigara kullanımının disk ve uç plak dejenerasyonuna neden olarak disk dejenerasyonuna neden olabileceği raporlanmıştır (224,225). Ancak bu doktora tezinde primer kültürlerin hazırlanmasında kullanılan dokuların alındığı olguların özgeçmişlerinde, tip 2 DM ve/veya sigara kullanımı yoktu. Ayrıca olguların hikayelerinde, tek nükleotid gen polimorfizm bilgisi de yer almamaktaydı.

Disklerin dejenerasyon seviyesine göre tedavi konservatif tedavi veya invaziv tedavi şeklindedir. Fakat bu tedavi yöntemlerinin hepsi semptomatik tedavi sağlamakta ve patolojik süreç devam etmektedir (93). Bu nedenle bilim insanları, İVD dejenerasyonunu durdurmaya veya dejenerasyonun rejenerasyona dönüştürülmesine yönelik araştırmalara yönelmişlerdir.

Bu çalışmalar arasında, aktif İVD hücrelerinin implantasyonu (55,96,97) biyomalzeme implantasyonu (98,99), mezenkimal kök hücre implantasyonu (100,101), büyüme faktörlerinin mevcut hücrelere enjeksiyonu (102), enflamatuvar

sitokinlerin inhibisyonu için gen tedavileri veya disk içi molekül enjeksiyonu (103,104), bozulmamış veya yapay disk transplantasyonu (105,106) ve farmakolojik moleküllerin denenmesi gibi çalışmalar yapılmıştır. Fakat bu çalışmalar sonucunda henüz tedavide istenilen başarıyı sağlayan ticari bir ürün çıkmamıştır ve çalışmalar hala devam etmektedir. Çünkü İVD dejenerasyonunun her yönden mekanizması tam anlamıyla çözülememiştir (35).

Birçok farklı dokuda rejeneratif etkisi olduğu raporlanan ALA'nın formülasyonu $C_8H_{14}O_2S_2$ şeklindedir. Tioktik asit olarak bilinen ALA bitki, hayvan ve insan metabolizmasında oktanoik asitten üretilen organosülfür bir bileşiktir. ALA'nın hem suda hem de yağda çözünebilir bir bileşik olması onu değerli kılmış ve klinik etkileri üzerine çok sayıda yayın yapılmıştır (107).

ALA'nın güçlü bir antioksidan olarak bilinmesinin yanında, metal şelatlayıcı, serbest radikal temizleyici, glutatyon (131), vitamin C ve Vitamin E gibi endojen antioksidanların tekrar üretilmesini ve oksitlenmeden kaynaklı hasarın onarılmasına yaptığı katkılar literatürde yerini almıştır (15). Ayrıca diyabet, Alzheimer, şizofreni, kanser, MS ve obezite gibi yaygın hastalıkların tedavilerine yapabileceği katkıları gösteren birçok çalışma mevcuttur. ALA'nın apoptoz ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin, sıklıkla kanser hücreleri üzerine araştırıldığı görülmektedir (16).

Fakat literatürde, ALA'nın İVD dejenerasyonu üzerine etkilerinin araştırıldığı hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Sadece Memeo ve ark. disk herniasyonundan kaynaklı siyatik sinir ağrısı olan hastaların tedavisinde ALA'nın ağrı üzerine etkisinin araştırıldığı randomize çift kör karşılaştırmalı klinik çalışma bulunmaktadır (226).

Referans alabileceğimiz benzer hiçbir çalışma bulunmaması sebebiyle çalışmamız alanında çok önem arz etmekle birlikte aynı zamanda ilk araştırmadır.

Bilindiği üzere, ticari hücre hatları, tek tip hücre içermesi ve genotipi/fenotipi değiştirilmiş organizasyonlar olduklarından, bu tür ekipmanlarla gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçların güvenilir olamayacakları yadsınamaz bir gerçektir (18,220,221,227). Ya da hayvan dokuları ile insan dokularının hassasiyetlerinin farklı olması neticesinde, analizler esnasında hayvansal dokulardan alınan yanıtların çok farklı olabileceği bilinmektedir (228-230). Deney hayvanlarının İVD'lerinin hücre yoğunluğu, disk boyutu ve metabolizma farklılıklarının olduğu da bilinmektedir.

Bu yüzden bu araştırmada ticari hücre hattı veya hayvansal dokular kullanılmadı. Bunların yerine; spinal travmalara bağlı ortaya çıkan, intervertebral disk hernisi operasyonlarından elde edilen insan İVD'lerinden hazırlanan primer hücre kültürleri kullanıldı. Hazırlanan bu primer kültürler üzerinde ALA'nın etkileri değerlendirildi. Amacımız, yaşam kalitesinde önemli bir azalmaya ve ekonomik olarak da büyük bir yük oluşturan İVD dejenerasyonunun moleküler fizyopatolojisini açıklamak ve gelecekteki tedavi stratejileri için etkili bilgiler sağlamaktır. Bu yüzden bu araştırmadan elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayabileceği inancına varıldı.

AF/NP hücrelerinden salgılanan CHAD ve COMP proteinleri, ECM'yi oluşturur ve İVD dokusunda sağlıklı bir mikro ortam oluşumuna katkıda bulunur (18,217,219,220). CHAD ve COMP gen ekspresyonlarının azalmasının hücre morfolojisini olumsuz yönde etkilediği düşünölmüştür, ECM yapısındaki bozulmaların AF/NP hücrelerinden IL-1 β salgılanmasını indüklediği söylenmiştir (217).

COMP geni, bağları, tendonları ve kıkırdadı oluşturan hücrelerin ECM'sinde bulunan COMP'u kodlar (231). Ishii ve ark. sıçan İVD dokusu kullanarak COMP'un ekspresyon ve dağılım özelliklerini incelemiştir. Bu çalışma, COMP'un lomber omurgadaki ve kuyruktaki İVD'in hem AF hem de NP hücrelerinde protein ve mRNA seviyelerinde eksprese edildiğini göstermiştir (232). Ayrıca AF bölgesinde COMP geninin ekspresyonunun daha fazla olduğunu belirten çalışmada vardır (233).

COMP, ECM'nin yapısal bütönlüğünü korur; diğer matriks proteinlerini bağlar ve tip II kolajen fibrilin polimerizasyonunu katalize eder, ayrıca kıkırdadı vaskölarizasyonunu önler (217).

COMP'un, hücre büyümesi ve proliferasyonunun yanı sıra hücre hareketinin ve tutunmasının düzenlenmesinde de önemli bir rol oynadığı söylenmiştir. Ayrıca osteoartrit (OA) patogenezinde rol oynayabilir ve primer kondrositler, İVD hücreleri ve transforme edilmiş hücrelerde güçlü bir apoptoz baskılayıcı olarak işlev görebilir (234). OA, kıkırdak dejenerasyonunun sonucu oluşan klinik bir sendromdur. COMP'un eklem dejenerasyonu veya OA sırasında kıkırdakta bulunduğuna inanılmaktadır. Bununla birlikte, çalışmalar henüz COMP'un İVD dejenerasyonuna katılımını tam olarak açıklamamıştır (231,235).

Kaplan ve ark., COMP'un kırkırdakta bir ECM proteini olarak bulunduğunu ve omurga diski daralması, osteofit, skolyoz ve eklem metabolizmasında yer alan yeni bir biyobelirteç olduğunu ileri sürmüşlerdir (236). Buna ek olarak MMP-19'un COMP'u parçalayan bir enzim olduğu da bildirilmektedir (219).

Sağlıklı bir İVD'nin ana ECM bileşenlerinden biri olan CHAD, integrin ve kolajene bağlanır; hücre metabolizmasını, ECM yapısını ve matriks homeostazını düzenler (217). Sürekli eksprese edilen NP'ye özgü bir markör olan CHAD'ın omurilik ve sırt kolonunun gelişimi ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (18, 219,220). Bazı çalışmalarda CHAD ekspresyonunun yetersiz gelişen mikroçevre ile ilişkili olduğu ve dejenere İVD dokusunda CHAD gen ekspresyonlarının anlamlı derecede değiştiği gösterilmiştir (220,237).

ECM proteinlerinin ve organogenezin yok edilmesinden sorumlu enzimler olan MMP'ler, büyüme ve normal doku rejenerasyonu süreci, organizmadaki fizyolojik olayların sürdürülmesinde temel işlevlere sahiptir. Bu işlevleri MMP aktivitesi ve spesifik endojen doku inhibitörleri arasındaki denge yoluyla gerçekleştirirler. Bu dengenin MMP aktivitesine kayması matris yıkımına ve patofizyolojik olaylara yol açar (238). MMP sentezi ve aktivitesi sağlıklı dokularda düşük olmakla birlikte, enflamatuvar hastalıklar, tümör ilerlemesi ve metastaz dâhil olmak üzere sayısız patolojik ve olumsuz durumda seviyesi artar; bu artış doku yıkımına neden olur (239).

İVD içeriğinde yer alan MMP'lerin sağlıklı disk dokusunun dejenerasyonuna neden olabileceği bilinmektedir. Bilindiği gibi NP ve AF dokularında büyük kolajen tipleri bulunur. Bu kolajenlerin yapısı ve birbirleriyle olan ilişkileri diskin mekanik fonksiyonunda hayati bir role sahiptir. Bu kolajen molekülleri, özellikle MMP'ler olmak üzere sadece spesifik enzimler tarafından bozunabilir. MMP'ler, kolajen moleküllerinin katabolizmasındaki ana enzimlerdir. MMP'ler bilinen tüm matris bileşenlerini bozar. Dejenere disklerin normal disklerden daha vasküler olduğu ve vasküler yapıların MMP ürettiği bilinmektedir.

İmmünohistokimya sınırlı bilgi sağlamasına rağmen, disk hücrelerinin vasküler hücrelere oranı göz önüne alındığında çoğu MMP enzimi disk hücreleri tarafından üretilir. Fıtıklaşmış disklerdeki yüksek MMP seviyeleri, MMP'lerin disk herniasyonunun onarımından doğal olarak sorumlu olduğunu gösterir (219,240).

MMP-7 ve MMP-19, yapısal olarak çinko bağımlı endopeptidazlardan oluşan MMP ailesinin üyeleridir. Aktifleştirilen MMP'nin birincil rolü, kazein, jelatin, fibronektin ve proteoglikan gibi makromolekülleri parçalayarak ECM'yi parçalamaktır (241,242).

Gruber ve arkadaşları (243), MMP'lerin diskin ECM bileşenlerini bozduğunu bildirmiştir. Ayrıca MMP19'un kılcal damar oluşumunu engellediğini ve böylece diskin avasküler doğasında bir rolü olduğunu bildirmişlerdir.

Yurube ve arkadaşları (244), sıçanlarda MMP-7'nin disk dokusunun dejenerasyonu ile ilişkili katabolik gen olduğunu bildirmişlerdir. Matrilin olarak da bilinen MMP-7, matriksteki agrekan ve kolajen tip II'yi parçalayabildiği gibi (217), proteoglikan ve MMP-3 gibi kollajenaz olmayan proteinleri de parçalayabilir. MMP-7, denatüre kolajen moleküllerini parçaladığı için kolajen fibrilleri arasındaki moleküller arası ağı da parçalayabilir (219).

Kaya ve ark. (231), dejenere İVD ve dejenere olmayan İVD dokularının primer hücre kültüründe gen ekspresyonlarını karşılaştırdıkları araştırmalarında, dejenere İVD dokusunda CHAD, IL-1 β , MMP-7, ve MMP-19 gen ekspresyonlarının anlamlı derecede değiştiğini, COMP gen ekspresyonunun da ise değişiklik olmadığını belirtmişlerdir.

Son yirmi yılda, sitokinlerin, çoğunlukla kondrositler, histiyositler ve fibroblastlar olmak üzere, İVD yapısında da NP hücreleri tarafından üretildiği bildirilmiştir (219).

IL-1 β , prostaglandin sentezini, nötrofil akışını ve aktivasyonunu, T hücresi aktivasyonunu ve sitokin üretimini, B hücresi aktivasyonunu ve antikor üretimini ve ECM'de fibroblast proliferasyonunu ve kolajen üretimini indükleyen bir proenflamatuvar sitokindir. ECM bozunmasının bir sonucu olarak doku dejenerasyona uğrarsa, düşük moleküler ağırlıklı bozunma ürünleri oluşur. Bu ürünler enflamasyonu indükleyerek *in-vivo* makrofaj aracılı IL-1 β üretimini teşvik edebilir (242,243). ECM yapısındaki bozulmaların AF/NP hücrelerinden IL-1 β salgılanmasını indüklediğini bildiren araştırmaya da literatürde rastlanmaktadır (217).

IL-1 β , İVD dokusu metabolizmasına dahil olan, diskin baskın proenflamatuvar sitokinidir. Kondrositleri katabolik aktiviteye dönüştürme kabiliyeti olduğu

gösterilmiş ve anjiyogenezi kolaylaştırmak için anjiyogenetik faktörleri artırdığı belirtilmiştir. IL-1 β proteoglikan salınımını ve yıkıcı enzimleri artırır (219, 245), prostaglandin-E2 dâhil olmak üzere İVD hücrelerinden ağrı mediatörlerinin salınımını uyarır. IL-1 β 'in AF hücrelerinin apoptozuna neden olduğu ve İVD doku hücreleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu (246) ve IL-1 β ekspresyonundaki artışın MMP-7'de de artışa neden olduğu literatürde mevcuttur (219).

ALA'nın, β 1/ β 3-integrin ekspresyonunu düşürerek FAK aktivasyonunu inhibe ettiği ve ERK aktivasyonunu önlediği, bunun sonucunda da MMP-9 ve MMP-2'nin mRNA seviyelerinin azaldığı belirtilmektedir (170). Bizim yaptığımız bu araştırmada da MMP-7 ve MMP-19 ekspresyonunun, ALA uygulanan grupta azaldığı görüldü.

İVD dejenerasyonunda hücrelerdeki apoptoz net olarak gösterilmekle birlikte dejeneratif disklerden alınan İVD'lerin, sağlıklı kontrol disklerine kıyasla, TUNEL pozitif hücre sayısının daha fazla olduğu bildirilmektedir (67,68). Dejeneratif disklerde NP ve AF hücrelerinin karmaşık mekanizmalar yoluyla apoptoz geçirdiği (67), hatta kıkırdak plak hücrelerinde de apoptozun net olarak görüldüğü raporlanmaktadır (86).

ALA'nın sağlıklı hücrelerin proliferasyonu üzerine etkisini çalışan çok az sayıda araştırma bulunmaktadır. Yetişkin fareler üzerinde yapılan çalışmada, beyin hasarı oluşturulan bölgede ALA'nın endotelial hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı ama glial hücre proliferasyonunu değiştirmediği gösterilmiştir (247).

Pankreas beta hücreleri olan HIT15 hücre soyunda, ALA'nın yüksek kan şekerinin neden olduğu apoptozu inhibe ettiği, fakat insülin sentezini ve sekresyonunu da durdurduğu belirtilmektedir. Ayrıca, Pdx1 ve anti-apoptotik Bcl2 gen ekspresyonlarını arttırdığı, proapoptotik Bax gen ekspresyonunu düşürdüğü belirtilmektedir (248). Bu bulgulardan (antiapoptotik Bcl2'nin artması, pro-apoptotik Bax geninin azalması), ALA'nın kanser hücrelerindeki Bcl2 ve Bax üzerine etkilerinin tam tersidir (16).

Farelerde yapılan başka bir çalışmada ALA'nın Ras/MEK 1-2/ERK 1-2 sinyal yolağı üzerinden vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (249). Açlık stresine maruz bırakılan farelerde, ALA'nın açlık anında

hepatik lenfositlerin proliferasyonunu azaltırken, beslenmeye devam edildiği süreçte hepatosit hücrelerinin proliferasyonunu da arttırdığı belirtilmiştir (250).

Yapılan bu çalışmaların sonuçlarına bakıldığında ALA'nın proliferasyon üzerine etkisinin hücre türüne göre farklılık gösterdiği anlaşılmaktadır. İVD dejenerasyonunun biyolojik tedavisinde, kaybedilen hücre miktarını yerine koymak çok önemlidir; bu nedenle bu doktora tez çalışmasında ayrıca ALA'nın hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi de araştırılmıştır.

Çalışmamızda ALA eklenen grupta AF ve NP hücrelerinin proliferasyonunun azaldığı ve ECM yapısının zarar gördüğü anlaşılmıştır. Mikroskopik değerlendirmelerde ALA uygulamasının hücre proliferasyonunu azalttığı görülmektedir. Ancak AO/PI boyamasında görüldüğü gibi, ALA'nın uygulandığı doz ve sürelerde sitotoksositeye bağlı apoptotik hücre ölümü görülmedi, bu nedenle proliferasyon ve ECM gelişiminde kaydedilen gerilemenin doğrudan sitotoksositeye bağlı olmadan gendeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünüldü.

Buna ek olarak CHAD, COMP, IL-1 β , MMP-7 ve MMP-19'a ait gen ifade düzeylerinin kontrol grubuna oranla oldukça farklı değişimler gösterdiği tespit edildi. Tüm bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı idi ($P < 0,05$).

ALA, İVD hücreleri üzerinde beklenmedik sürpriz sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Dejenerasyon sırasında kaybedilen matriks yapısının yeniden yapılandırılmasında önemli bir belirteç olan CHAD ve COMP gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre baskılandığı görüldü. Sonuç olarak, matriks oluşumunun olumsuz etkilendiği söylenebilir. Bununla birlikte, matriks yıkımının belirteçlerinden olan IL1- β , MMP-7 ve MMP-9 gen ekspresyonlarını azalttığı ve kontrol grubuna göre azalmış matriks yıkımı gözlemlendi.

Özetlemek gerekirse ALA, dejenere İVD hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla dejenere ECM yapısının onarımını engelledi, ancak aynı zamanda ECM yapısının dejenerasyonunun daha fazla ilerlemesini de önledi. Ek olarak, ALA, dejenere insan İVD dokusundan yapılan primer hücre kültürlerinde İVD hücrelerinin çoğalmasını baskıladı.

Bu sonuçlar, antioksidan kaynağı veya gıda takviyesi adı altında çok kolay ulaşılabilirliği bulunan ALA'nın; hastalar, sporcular veya sağlıklı bireyler tarafından

dikkatli tüketilmesi gerektiğinin önemini ortaya koymaktadır. İVD dejenerasyonu bulunan olgularda ALA kullanımının faydalı olmayacağı hatta dejenerasyonu ilerletebileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Araştırmamız, ALA'nın insan dejenere İVD primer hücre kültürleri üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunu göstermiş olsa bile, bu araştırma *in-vitro* laboratuvar ortamında gerçekleştirilmiştir.

Daha da önemlisi bu çalışmada belirtilen doz ve süreler dışında uygulanan ALA'nın hücre popülasyonu ve gen ekspresyonları üzerine yapabileceği muhtemel pozitif veya negatif etkileri, bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla kesin olarak belirlenemez. Bu yüzden elde edilen sonuçlar kliniği tam olarak yansıtmamaktadır. Bu durum ise bu araştırmanın en önemli limitasyonudur.

Amacımız, yaşam kalitesinde önemli bir düşüş ve büyük bir ekonomik yük yaratan İVD dejenerasyonunun moleküler fizyopatolojisini açıklamak ve gelecekteki tedavi stratejileri için etkili bilgiler sağlamaktır. Bu nedenle bu çalışmadan elde edilen sonuçların literatüre katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

8. SONUÇ

Literatürdeki klinik araştırmalarda, ALA'nın düşük bir yan etki profiline sahip olduğu ve güvenli bir şekilde tüketilebileceği belirtilmektedir. Ancak bu araştırmadan elde edilen bulgularda ALA'nın hücre proliferasyonunu baskılamakla birlikte hücre membran yapısını ve ECM mikroçevresini olumsuz etkilediği görüldü. Ayrıca dejenerasyon sırasında kaybedilen matriks yapısının yeniden yapılandırılmasında önemli bir belirteç olan CHAD ve COMP gen ekspresyonlarıyla birlikte, matriks yıkımının belirteçlerinden olan IL1- β , MMP-7 ve MMP-19 gen ekspresyonlarını kontrol grubuna göre baskıladığı görüldü.

Sonuç olarak ALA, insan dejenere İVD dokusu primer hücre kültürlerinde, kontrol grubuna kıyasla, İVD hücrelerinin çoğalmasını baskılamakla birlikte, dejenere ECM yapısının onarımını engellemesine rağmen ECM dejenerasyonunun da ilerlemesini önledi. Araştırmamızdan elde etmiş olduğumuz veriler, ALA'nın insan dejenere İVD dokusu primer hücre kültürleri üzerinde olumsuz etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

Her ne kadar bu araştırmadan elde edilen bulgular *in-vitro* ortam şartlarında gerçekleştirilen analizler sonucu elde edilmiş olsa bile, bu tür tamamlayıcı farmasötikler reçete edilirken ALA'nın İVD dokusu ve bu dokunun AF/NP hücreleri ile ECM yapısı üzerindeki etkileri dikkate alınmalıdır.

9. KAYNAKLAR

1. GBD 2017 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 392(10159):1789-1858, 2018.
2. Lawson LY, Harfe BD. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 6(6):10, 2017.
3. Millennium., WHO Scientific Group on the Burden of Musculoskeletal Conditions at the Start of the New. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 919, 2003.
4. Raj, PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment. *Pain Pract*. 8(1):18-44, 2008.
5. Miller J, Schmatz C, Schultz A. Lumbar disc degeneration. Correlation with Age, Sex, and Spine Level in 600 Autopsy Specimens. *Spine*. 13:173-178, 1988.
6. Oichi T, Taniguchi Y, Oshima Y, Tanaka S, Saito T. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration. *JOR Spine*. 3(1):e1076, 2020.
7. Kerttula LI, Serlo WS, Tervonen OA, Paakko EL, Vanharanta HV. Post-traumatic findings of the spine after earlier vertebral fracture in young patients: clinical and MRI study. *Spine*. 25:1104-1108, 2000.
8. Lee, CK. Accelerated degeneration of the segment adjacent to a lumbar fusion. *Spine*. 13:375-377, 1988.
9. Battié MC, Videman T, Gill K, Moneta GB, Nyman R, Kaprio J, et al. 1991 Volvo award in clinical sciences. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: an MRI study of identical twins. *Spine*. 16(9):1015-1021, 1991.
10. Battié MC, Videman T, Kaprio J, Gibbons LE, Gill K, Manninen H, et al. The twin spine study: contributions to a changing view of disc degeneration. *Spine J*. 9(1):47-59, 2009.
11. Kawaguchi, Y. Genetic background of degenerative disc disease in the lumbar spine. *Spine Surg Relat Res*. 2:98-112, 2018.
12. Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, Risbud MV, Anderson DG. The molecular basis of intervertebral disc degeneration. *Spine J*. 2013;13:318-330.

13. Feng Y, Egan B, Wang J. Genetic factors in intervertebral disc degeneration. *Genes Dis.* 3:178-185, 2016.
14. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6112, Lipoic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lipoic-acid>. (Accessed 29.10.2021).
15. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* 29:315–331, 1997.
16. Farhat D, Lincet H. Lipoic acid a multi-level molecular inhibitor of tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 1873(1):188317, 2020.
17. Urban JP, Holm S, Maroudas A, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: effect of fluid flow on solute transport. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 170:296–302, 1982.
18. Sirin DY, Karaarslan N. Evaluation of the effects of pregabalin on chondrocyte proliferation and CHAD, HIF-1 α , and COL2A1 gene expression. *Arch Med Sci.* 14(6):1340-1347, 2018.
19. Kaplan N, Yilmaz I, Karaarslan N, Kaya YE, Sirin DY, Ozbek H. Does nimodipine, a selective calcium channel blocker, impair chondrocyte proliferation or damage extracellular matrix structures. *Curr Pharm Biotechnol.* 20(6):517-524, 2019.
20. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. "vertebral column." *Encyclopedia Britannica.* <https://www.britannica.com/science/vertebral-column> 2020.
21. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/7-3-the-vertebral-column> "Figure 7.24" (Accessed 29.10.2021).
22. Sakai D, Schol J. Cell therapy for intervertebral disc repair: Clinical perspective. *J Orthop Translat.* 9:8-18, 2017.
23. Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, Weiler C, Spratt KF, Nerlich AG. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs: 2002 Volvo award in basic science. *Spine.* 27: 2631-2644, 2002.
24. Choi KS, Harfe BD. Hedgehog signaling is required for formation of the notochord sheath and patterning of nuclei pulposi within the intervertebral discs. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:9484–9489, 2011.
25. McCann MR, Tamplin OJ, Rossant J, Seguin CA. Tracing notochord-derived cells using a Noto-cre mouse: implications for intervertebral disc development. *Dis Model Mech.* 5:73–82, 2012.

26. Bruggeman BJ, Maier JA, Mohiuddin YS, Powers R, Lo Y, Guimarães-Camboa N, et al. Avian intervertebral disc arises from rostral sclerotome and lacks a nucleus pulposus: implications for evolution of the vertebrate disc. *Dev Dyn.* 241(4):675-683, 2012.
27. Bayliss MT, Johnstone B. Biochemistry of the intervertebral disc, pages 111-127. Malcolm I.V. Jayson, editor. *The lumbar spine and back pain.* Churchill Livingstone, fourth edition edition, 1992.
28. Jongeneelen, C. Biomechanics in the intervertebral disc A literature review, pp:5, <http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/6700.pdf> (Accessed 29.10.2021).
29. Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, Caterson B, Merkher Y, Maroudas A, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc. *Eur Spine J.* 23(3):344-353, 2014.
30. Bibby SR, Jones DA, Lee RB, Yu J, Urban JPG. The pathophysiology of the intervertebral disc. *Joint Bone Spine.* 68(6):537-42, 2001.
31. Pezowicz CA, Robertson PA, Broom ND. Intralamellar relationships within the collagenous architecture of the annulus fibrosus imaged in its fully hydrated state. *J Anat.* 207:299-312, 2005.
32. Takimoto A, Kokubu C, Watanabe H, Sakuma T, Yamamoto T, Kondoh G, et al. Differential transactivation of the upstream aggrecan enhancer regulated by PAX1/9 depends on SOX9-driven transactivation. *Sci Rep.* 9(1):4605, 2019.
33. Roughley, PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix. *Spine.* 29:2691-2699, 2004.
34. Yu J, Winlove CP, Roberts S, Urban JP. Elastic fibre organization in the intervertebral discs of the bovine tail. *J Anat.* 201:465-475, 2002.
35. Huang YC, Urban JP, Luk KD. Intervertebral disc regeneration: do nutrients lead the way? *Nat Rev Rheumatol.* 10(9):561-6, 2014.
36. Grunhagen T, Shirazi-Adl A, Fairbank JC, Urban JP. Intervertebral disk nutrition: a review of factors influencing concentrations of nutrients and metabolites. *Orthop. Clin. North Am.* 42:465-477, 2011.
37. Roberts S, Menage J, Urban JP. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa 1976)* 14(2):166-174, 1989.

38. Boubriak OA, Watson N, Sivan SS, Stubbens N, Urban JP. Factors regulating viable cell density in the intervertebral disc: blood supply in relation to disc height. *J. Anat.* 222(3):341–348, 2013.
39. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine (Phila. Pa 1976)*. 26(23):2543–2549, 2001.
40. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem Soc Trans.* 35:652-655, 2007.
41. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest.* 98(4):996–1003, 1996.
42. Hollander AP, Heathfield TF, Liu JJ, Pidoux I, Roughley PJ, Mort JS, et al. Enhanced denaturation of the alpha (II) chains of type-II collagen in normal adult human intervertebral discs compared with femoral articular cartilage. *J Orthop Res.* 14(1):61–66, 1996.
43. Wagner DR, Reiser KM, Lotz JC. Glycation increases human annulus fibrosus stiffness in both experimental measurements and theoretical predictions. *J Biomech.* 39:1021-1029, 2006.
44. Cs-Szabo G, Ragasa-San Juan D, Turumella V, Masuda K, Thonar EJ, An HS. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the anulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. 27(20):2212-9, 2002.
45. Buckwalter JA, Roughley PJ, Rosenberg LC. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech.* 28:398-408, 1994.
46. Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. *J Orthop Res.* 5:198-205, 1987.
47. Sivan SS, Wachtel E, Roughley P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc. *Biochim Biophys Acta.* 1840(10):3181-3189, 2014.

48. Tolofari SK, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of semaphorin 3A and its receptors in the human intervertebral disc: potential role in regulating neural ingrowth in the degenerate intervertebral disc. *Arthritis Res Ther.* 12(1):R1, 2010.
49. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Baird P, Jeziorska M, Knight MT, et al. Nerve growth factor expression and innervation of the painful intervertebral disc. *J Pathol.* 197:286–292, 2002.
50. Johnson SL, Aguiar DJ, Ogilvie JW. Fibronectin and its fragments increase with degeneration in the human intervertebral disc. *Spine.* 25:2742–2747, 2000.
51. Sive JI, Baird P, Jeziorsk M, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs. *Mol Pathol.* 55:91-97, 2002.
52. Roberts S, Evans H, Trivedi J, Menage J. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am.* 88(2):10-14, 2006.
53. Edelson JG, Nathan H. Stages in the natural history of the vertebral end-plates. *Spine.* 13:21-26, 1988.
54. Kobayashi S, Meir A, Urban J. Effect of cell density on the rate of glycosaminoglycan accumulation by disc and cartilage cells in vitro. *J. Orthop. Res.* 26:493-503, 2008.
55. Huang YC, Leung VY, Lu WW, Luk KD. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell--based regeneration of intervertebral disc. *Spine J.* 13:352-362, 2013.
56. Wuertz K, Godburn K, Iatridis JC. MSC response to pH levels found in degenerating intervertebral discs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379:824-829, 2009.
57. Kauppila, LI. Atherosclerosis and disc degeneration/low--back pain--a systematic review. *Eur. J. Vasc Endovasc Surg.* 37:661-670, 2009.
58. Tokuda O, Okada M, Fujita T, Matsunaga N. Correlation between diffusion in lumbar intervertebral disks and lumbar artery status: evaluation with fresh blood imaging technique. *J. Magn. Reson. Imaging* 25:185-191, 2007.
59. Rajasekaran S, Venkatadass K, Naresh Babu J, Ganesh K, Shetty AP. Pharmacological enhancement of disc diffusion and differentiation of healthy, ageing

- and degenerated discs: Results from in-vivo serial post-contrast MRI studies in 365 human lumbar discs. *Eur. Spine J.* 17:626-643, 2008.
60. Turgut M, Uysal A, Uslu S, Tavus N, Yurtseven ME. The effects of calcium channel antagonist nimodipine on end-plate vascularity of the degenerated intervertebral disc in rats. *J. Clin. Neurosci.* 10:219-223, 2003.
61. Holm S, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: acute effects of cigarette smoking. An experimental animal study. *Ups. J. Med. Sci.* 93:91-99, 1988.
62. Nachemson A, Lewin T, Maroudas A, Freeman MA. In vitro diffusion of dye through the end-plates and the annulus fibrosus of human lumbar inter-vertebral discs. *Acta Orthop. Scand.* 41:589-607, 1970.
63. Benneker LM, Heini PF, Alini M, Anderson SE, Ito K. 2004 Young Investigator Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila. Pa 1976)* 30:167-173, 2005.
64. Hristova GI, Jarzem P, Ouellet JA, Roughley PJ, Epure LM, Antoniou J, Mwale F. Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis. *J. Orthop. Res.* 29:1888-1895, 2011.
65. Wang Y, Videman T, Battie MC. Lumbar vertebral endplate lesions: prevalence, classification, and association with age. *Spine (Phila Pa 1976)*. 37(17):1432-1439, 2012.
66. Jackson AR, Huang CY, Gu WY. Effect of endplate calcification and mechanical deformation on the distribution of glucose in intervertebral disc: a 3D finite element study. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 14:195-204, 2011.
67. Zhang F, Zhao X, Shen H, Zhang C. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration (Review). *Int J Mol Med.* 37(6):1439-1448, 2016.
68. Gruber HE, Hanley EN Jr. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc. Comparison of surgical specimens with normal controls. *Spine (Phila Pa 1976)*. 23(7):751-757, 1998.
69. Gruber HE, Hanley EN Jr. Biologic strategies for the therapy of intervertebral disc degeneration. *Expert Opin Biol Ther.* 3:1209-1214, 2003.
70. Wang D, Hu Z, Hao J, He B, Gan Q, Zhong X, et al. SIRT1 inhibits apoptosis of degenerative human disc nucleus pulposus cells through activation of Akt pathway. *Age (Dordr)*. 35:1741-1753, 2013.

71. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene*. 22(53):8590-8607, 2003.
72. Sudo H, Minami A. Regulation of apoptosis in nucleus pulposus cells by optimized exogenous Bcl-2 overexpression. *J Orthop Res*. 28:1608-1613, 2010.
73. Gabelloni ML, Sabbione F, Jancic C, Fuxman Bass J, Keitelman I, Iula L, et al. NADPH oxidase derived reactive oxygen species are involved in human neutrophil IL-1 β secretion but not in inflammasome activation. *Eur J Immunol*. 43:3324-3335, 2013.
74. Yang D, Wang D, Shimer A, Shen FH, Li X, Yang X. Glutathione protects human nucleus pulposus cells from cell apoptosis and inhibition of matrix synthesis. *Connect Tissue Res*. 55:132-139, 2014.
75. Sun Z, Wan ZY, Guo YS, Wang HQ, Luo ZJ. FasL on human nucleus pulposus cells prevents angiogenesis in the disc by inducing Fas-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Int J Clin Exp Pathol*. 6:2376-2385, 2013.
76. Park JB, Kim KW, Han CW, Chang H. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine*. 26:142-146, 2001.
77. Wang SS, Zhang W, Zhang YQ, Zhao Y, Liu Y, Li JK, et al. IL-17A enhances ADAMTS-7 expression through regulation of TNF- α in human nucleus pulposus cells. *J Mol Histol*. 46:475-483, 2015.
78. Wang HQ, Yu XD, Liu ZH, Cheng X, Samartzis D, Jia LT, et al. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3. *J Pathol*. 225(2): 232-242, 2011.
79. Liu G, Cao P, Chen H, Yuan W, Wang J, Tang X. MiR-27a regulates apoptosis in nucleus pulposus cells by targeting PI3K. *PLoS One*. 8(9):e75251, 2013.
80. Liu H, Huang X, Liu X, Xiao S, Zhang Y, Xiang T, et al. miR-21 promotes human nucleus pulposus cell proliferation through PTEN/AKT signaling. *Int J Mol Sci*. 15:4007-4018, 2014.
81. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. 23:2838-2849, 2004.
82. Xie M, Yang S, Win HL, Xiong L, Huang J, Zhou J. Rabbit annulus fibrosus cell apoptosis induced by mechanical overload via a mitochondrial apoptotic pathway. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 30:379-384, 2010.

83. Rannou F, Lee TS, Zhou RH, Chin J, Lotz JC, Mayoux-Benhamou MA, et al. Intervertebral disc degeneration: the role of the mitochondrial pathway in annulus fibrosus cell apoptosis induced by overload. *Am J Pathol.* 164:915-924, 2004.
84. Zhang YH, Zhao CQ, Jiang LS and Dai LY. Cyclic stretch-induced apoptosis in rat annulus fibrosus cells is mediated in part by endoplasmic reticulum stress through nitric oxide production. *Eur Spine J.* 20:1233-1243, 2011.
85. Liao J, Ke M, Xu T, Lin L. Electroacupuncture inhibits apoptosis in annulus fibrosis cells through suppression of the mitochondria-dependent pathway in a rat model of cervical intervertebral disc degradation. *Genet Mol Biol.* 35:686-692, 2012.
86. Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS and Dai LY. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev.* 6:247-261, 2007.
87. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, Okuda S, Meng W, Yonenobu K, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc. *Spine.* 26:2414-2420, 2001.
88. Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, Hosono N, Okuda S, Meng W, et al. Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study. *Spine.* 28:1528-1533, 2003.
89. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif.* 45:487-498, 2012.
90. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 18:571-580, 2011.
91. Xu HD, Qin ZH. Beclin 1, Bcl-2 and Autophagy. *Adv Exp Med Biol.* 1206:109-126, 2019.
92. Kong CG, Park JB, Kim MS, Park EY. High glucose accelerates autophagy in adult rat intervertebral disc cells. *Asian Spine J.* 8:543-548, 2014.
93. Knezevic NN, Mandalia S, Raasch J, Knezevic I, Candido KD. Treatment of chronic low back pain - new approaches on the horizon. *J Pain Res.* 10:1111-1123, 2017.
94. Riew KD, Yin Y, Gilula L, Bridwell KH, Lenke LG, Laurysen C, et al. The effect of nerve-root injections on the need for operative treatment of lumbar radicular pain.

A prospective, randomized, controlled, double-blind study. *J Bone Joint Surg Am.* 82(11):1589-93, 2000.

95. Mehling WE, Gopisetty V, Bartmess E, Acree M, Pressman A, Goldberg H, et al. The prognosis of acute low back pain in primary care in the United States: a 2-year prospective cohort study. *Spine (Phila Pa 1976).* 37(8):678–684, 2012.

96. Nomura T, Mochida J, Okuma M, Nishimura K, Sakabe K. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 389:94-101, 2001.

97. Kregar Velikonja N, Urban J, Fröhlich M, Neidlinger-Wilke C, Kletsas D, Potocar U, et al. Cell sources for nucleus pulposus regeneration. *Eur Spine J.* 23(3):364-374, 2014.

98. Pereira DR, Silva-Correia J, Oliveira JM, Reis RL. Hydrogels in acellular and cellular strategies for intervertebral disc regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 7:85-98, 2013.

99. Hudson KD, Alimi M, Grunert P, Härtl R, Bonassar LJ. Recent advances in biological therapies for disc degeneration: tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24:872-879, 2013.

100. US National Library of Medicine. ClinialTrial.gov [online] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01860417?term=intervertebral+disc+degeneration&intr=mesenchymal+stem+cell> (Accessed 29.10.2021).

101. US National Library of Medicine. ClinialTrial.gov [online] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01771471?term=intervertebral+disc+degeneration&intr=cartilage&rank=1> (Accessed 29.10.2021).

102. US National Library of Medicine. ClinialTrial.gov [online], <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01124006?term=intervertebral+disc+degeneration&intr=growth+differentiation+factor+5> (Accessed 29.10.2021).

103. Bae WC, Masuda K. Emerging technologies for molecular therapy for intervertebral disk degeneration. *Orthop. Clin. North Am.* 42:585-601, 2011.

104. Woods BI, Vo N, Sowa G, Kang JD. Gene therapy for intervertebral disk degeneration. *Orthop. Clin. North Am.* 42(4):563-574, 2011.

105. Ruan D, He Q, Ding Y, Hou L, Li J, Luk KD. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study. *Lancet*. 369:993-999, 2007.
106. Ding Y, Ruan DK, He Q, Hou LS, Lin JN, Cui HP. Imaging Evaluation and Relative Significance in Cases of Cervical Disk Allografting: Radiographic Character After Total Disk Transplantation. *Clin Spine Surg*. 29(9):488-495, 2016.
107. Salehi B, Berkay Yılmaz Y, Antika G, Boyunegmez Tumer T, Fawzi Mahomoodally M, Lobine D, et al. Insights on the Use of α -Lipoic Acid for Therapeutic Purposes. *Biomolecules*. 9(8):356, 2019.
108. Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J*. 31(10):1789-1799, 1937.
109. REED LJ, DeBUSK BG, GUNSALUS IC, HORNBERGER CS Jr. Crystalline alpha-lipoic acid; a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science*. 114(2952):93-94, 1951.
110. Bock E, Schneeweiss J. Ein Beitrag zur Therapie der neuropathia diabetic. *Munchner Med Wochenschrift*. 43:1911-1912, 1959.
111. Brookes MH, Golding BT, Howes DA, Hudson AT. Proof that the absolute configuration of natural lipoic acid is R by the synthesis of its enantiomer [(S)-(-)-lipoic acid] from (S)-malic acid. *J. Chem. Soc. Chem. Commun*. 19:1051-1053, 1983.
112. Golbidi, S., Badran, M., Laher, I. Diabetes and alpha lipoic acid. *Front. Pharmacol*. 2:69, 2011.
113. Szeląg M, Mikulski D, Molski M. Quantum-chemical investigation of the structure and the antioxidant properties of α -lipoic acid and its metabolites. *J Mol Model*. 18(7):2907-2916, 2012.
114. Mayr JA, Feichtinger RG, Tort F, Ribes A, Sperl W. Lipoic acid biosynthesis defects. *J Inherit Metab Dis*. 37(4):553-63, 2014.
115. Brufani, M. Acido α lipoico farmaco o integratore. Una panoramica sulla farmacocinetica, le formulazioni disponibili e le evidenze cliniche nelle complicanze del diabete. *Prog. Nutr*. 6:62-74, 2014.
116. Singh U, Jialal I. Retracted: Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutr. Rev*. 66:646-657, 2008.

117. Keith DJ, Butler JA, Bemer B, Dixon B, Johnson S, Garrard M, et al. Age and gender dependent bioavailability of R- and R,S- α -lipoic acid: a pilot study. *Pharmacol Res.* 66(3):199-206, 2012.
118. Packer L, Cadenas E. Lipoic acid: Energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 48:26-32, 2010.
119. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. α -Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic. Boil. Med.* 19:227-250, 1995.
120. Yilmaz I, Karaarslan N, Ozbek H. Practical Performance of Hippocampal Tissue Resection in Rats in Pharmacomolecular Research. *Turk Neurosurg.* 31(1):112-118, 2021.
121. Yilmaz I, Karaarslan N, Yasar Sirin D, Ozbek H. Pharmaco-molecular assessment of the effects of anandamide and its antagonists on hippocampal tissue in Wistar albino rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 24(22):11871-11882, 2020.
122. Won JC, Kwon HS, Moon SS, Chun SW, Kim CH, Park IB, et al. γ -Linolenic Acid versus α -Lipoic Acid for Treating Painful Diabetic Neuropathy in Adults: A 12-Week, Double-Placebo, Randomized, Noninferiority Trial. *Diabetes Metab J.* 44(4):542-554, 2020.
123. Tripathy J, Chowdhury AR, Prusty M, Muduli K, Priyadarshini N, Reddy KS et al. α -Lipoic acid prevents the ionizing radiation-induced epithelial-mesenchymal transition and enhances the radiosensitivity in breast cancer cells. *Eur J Pharmacol.* 871:172938, 2020.
124. Seifar F, Khalili M, Khaledyan H, Amiri Moghadam S, Izadi A, Azimi A, et al. α -Lipoic acid, functional fatty acid, as a novel therapeutic alternative for central nervous system diseases: A review. *Nutr Neurosci.* 22(5):306-316, 2019.
125. Brufani M, Figliola R. (R)- α -lipoic acid oral liquid formulation: pharmacokinetic parameters and therapeutic efficacy. *Acta Biomed.* 85(2):108-15, 2014.
126. Breithaupt-Grögler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume HH, et al. Dose-proportionality of oral thioctic acid--coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci.* 8(1):57-65, 1999.
127. Wang H, Huang W, Fei YJ, Xia H, Yang-Feng TL, Leibach FH, et al. Human placental Na⁺- dependent multivitamin transporter. Cloning, functional expression,

- gene structure, and chromosomal localization. *Journal of Biological Chemistry*. 274:14875-83, 1999.
128. Park S, Sinko PJ. The blood-brain barrier sodium-dependent multivitamin transporter: a molecular functional in vitro-in situ correlation. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. 33:1547-54, 2005.
129. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*. 1790(10):1149-1160, 2009.
130. Emir DF, Ozturan IU, Yilmaz S. Alpha lipoic acid intoxication: An adult. *Am J Emerg Med*. 36(6):1125.e3-1125.e5, 2018.
131. El Barky AR, Hussein SA, Mohamed TM. The potent antioxidant alpha lipoic acid. *J. Plant Chem. Ecophysiol*. 2:1016, 2017.
132. Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thiocctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant?. *Biochem Pharmacol*. 50(1):123-126, 1995.
133. Goralska M, Dackor R, Holley B, McGahan MC. Alpha lipoic acid changes iron uptake and storage in lens epithelial cells. *Exp. Eye Res*. 76(2):241-248, 2003.
134. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic. Res. Commun*. 15:255-263, 1991.
135. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van der Vliet A, Cross CE, et al. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants. A critical evaluation. *Free Radic Res*. 20(2):119-133, 1994.
136. Islam, MT. Antioxidant activities of dithiol alpha-lipoic acid. *Bangladesh J. Med. Sci*. 8:34-49, 2009.
137. WHO. Diabetes; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2018. https://www.who.int/health-topics/diabetes#tab=tab_1 (Accessed 29.10.2021)
138. Beckman JA, Creager MA, Libby P. Diabetes and atherosclerosis: Epidemiology, pathophysiology, and management. *J. Am. Med. Assoc*. 287:2570-2581, 2002.
139. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res*. 107:1058-1070, 2010.

140. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative Stress in Diabetes: Implications for Vascular and Other Complications. *Int. J. Mol. Sci.* 14: 21525-21550, 2013.
141. Asmat U, Abad K, Ismail K. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise review. *Saudi Pharm. J.* 24:547-553, 2016.
142. Ghibu S, Richard C, Vergely C, Zeller M, Cottin Y, Rochette L. Antioxidant properties of an endogenous thiol: Alpha-lipoic acid, useful in the prevention of cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol.* 54(5):391-398, 2009.
143. Eason RC, Archer HE, Akhtar S, Bailey CJ. Lipoic acid increases glucose uptake by skeletal muscles of obese-diabetic ob/ob mice. *Diabetes Obes Metab.* 4(1):29-35, 2002.
144. Konrad D, Somwar R, Sweeney G, et al. The antihyperglycemic drug alpha-lipoic acid stimulates glucose uptake via both GLUT4 translocation and GLUT4 activation: potential role of p38 mitogen-activated protein kinase in GLUT4 activation. *Diabetes.* 50(6):1464-1471, 2001.
145. Lee WJ, Song KH, Koh EH, Won JC, Kim HS, Park HS, et al. Alpha-lipoic acid increases insulin sensitivity by activating AMPK in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 332(3):885-891, 2005.
146. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: Molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes1. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 93: 1021-1027, 2015.
147. Smith AR, Hagen TM. Vascular endothelial dysfunction in aging: loss of Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase phosphorylation and partial restoration by (R)-alpha-lipoic acid. *Biochem Soc Trans.* 31(6):1447-1449, 2003.
148. Smith AR, Visioli F, Frei B, Hagen TM. Lipoic acid significantly restores, in rats, the age-related decline in vasomotion. *Br J Pharmacol.* 153(8):1615-1622, 2008.
149. Phiboonchaiyanan PP, Chanvorachote P. Suppression of a cancer stem-like phenotype mediated by alpha-lipoic acid in human lung cancer cells through down-regulation of β -catenin and Oct-4. *Cell Oncol (Dordr).* 40(5):497-510, 2017.
150. Li BJ, Hao XY, Ren GH, Gong Y. Effect of lipoic acid combined with paclitaxel on breast cancer cells. *Genet Mol Res.* 14(4):17934-17940, 2015.

151. Puchsaka P, Chaotham C, Chanvorachote P. α -Lipoic acid sensitizes lung cancer cells to chemotherapeutic agents and anoikis via integrin $\beta 1/\beta 3$ downregulation. *Int J Oncol.* 49(4):1445-1456, 2016.
152. Kothari IR, Mazumdar S, Sharma S, Italiya K, Mittal A, Chitkara D. Docetaxel and alpha-lipoic acid co-loaded nanoparticles for cancer therapy. *Ther Deliv.* 10(4):227-240, 2019.
153. Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K, Suzuki Y, Adachi E, Matsugo S, et al. α -Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett.* 335(2):472-478, 2013.
154. Park S, Choi SK, Choi Y, Moon HS. AMPK/p53 Axis Is Essential for α -Lipoic Acid-Regulated Metastasis in Human and Mouse Colon Cancer Cells. *J Investig Med.* 63(7):882-885, 2015.
155. Li W, Saud SM, Young MR, Chen G, Hua B. Targeting AMPK for cancer prevention and treatment. *Oncotarget.* 6(10):7365-7378, 2015.
156. Park KG, Min AK, Koh EH, Kim HS, Kim MO, Park HS, et al. Alpha-lipoic acid decreases hepatic lipogenesis through adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)-dependent and AMPK-independent pathways. *Hepatology.* 48(5):1477-1486, 2008.
157. Dozio E, Ruscica M, Passafaro L, Dogliotti G, Steffani L, Marthyn P, et al. The natural antioxidant alpha-lipoic acid induces p27(Kip1)-dependent cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *European journal of pharmacology* vol. 641(1):29-34, 2010.
158. Dörsam B, Fahrer J. The disulfide compound α -lipoic acid and its derivatives: A novel class of anticancer agents targeting mitochondria. *Cancer Lett.* 371(1):12-19, 2016.
159. Kafara P, Icard P, Guillamin M, Schwartz L, Lincet H. Lipoic acid decreases Mcl-1, Bcl-xL and up regulates Bim on ovarian carcinoma cells leading to cell death. *J Ovarian Res.* 8:36, 2015.
160. Na MH, Seo EY, Kim WK. Effects of alpha-lipoic acid on cell proliferation and apoptosis in MDA-MB-231 human breast cells. *Nutr Res Pract.* 3(4):265-271, 2009.

161. Dörsam B, Göder A, Seiwert N, Kaina B, Fahrner J. Lipoic acid induces p53-independent cell death in colorectal cancer cells and potentiates the cytotoxicity of 5-fluorouracil. *Arch Toxicol.* 89(10):1829-1846, 2015.
162. Choi SY, Yu JH, Kim H. Mechanism of alpha-lipoic acid-induced apoptosis of lung cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1171:149-155, 2009.
163. Kuban-Jankowska A, Gorska-Ponikowska M, Wozniak M. Lipoic Acid Decreases the Viability of Breast Cancer Cells and Activity of PTP1B and SHP2. *Anticancer Res.* 37(6):2893-2898, 2017.
164. Mounjaroen J, Nimmannit U, Callery PS, Wang L, Azad N, Lipipun V, et al. Reactive oxygen species mediate caspase activation and apoptosis induced by lipoic acid in human lung epithelial cancer cells through Bcl-2 down-regulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 319(3):1062-1069, 2006.
165. Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-*⁻ generation. *Apoptosis.* 10(2):359-368, 2005.
166. Trivedi PP, Jena GB. Role of α -lipoic acid in dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis in mice: studies on inflammation, oxidative stress, DNA damage and fibrosis. *Food Chem Toxicol.* 59:339-355, 2013.
167. Tripathy J, Tripathy A, Thangaraju M, Suar M, Elangovan S. α -Lipoic acid inhibits the migration and invasion of breast cancer cells through inhibition of TGF β signaling. *Life Sci.* 207:15-22, 2018.
168. Jeon MJ, Kim WG, Lim S, Choi HJ, Sim S, Kim TY, et al. Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 419:113-123, 2016.
169. Yamasaki M, Iwase M, Kawano K, Sakakibara Y, Suiko M, Ikeda M, et al. α -Lipoic acid suppresses migration and invasion via downregulation of cell surface β 1-integrin expression in bladder cancer cells. *J Clin Biochem Nutr.* 54(1):18-25, 2014.
170. Lee HS, Na MH, Kim WK. alpha-Lipoic acid reduces matrix metalloproteinase activity in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Nutr Res.* 30(6):403-409, 2010.
171. Feuerecker B, Pirsig S, Seidl C, Aichler M, Feuchtinger A, Bruchelt G, et al. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 13(14):1425-1435, 2012.

172. Yang L, Wen Y, Lv G, Lin Y, Tang J, Lu J, et al. α -Lipoic acid inhibits human lung cancer cell proliferation through Grb2-mediated EGFR downregulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 494(1-2):325-331, 2017.
173. Wu Y, Li Z, Huang YY, Wu D, Luo HB. Novel Phosphodiesterase Inhibitors for Cognitive Improvement in Alzheimer's Disease. *J Med Chem.* 61(13):5467-5483, 2018.
174. Chen Z, Zhong C. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Neurosci Bull.* 30(2):271-281, 2014.
175. Huang WJ, Zhang X, Chen WW. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomed Rep.* 4(5):519-522, 2016.
176. Farr SA, Poon HF, Dogrukol-Ak D, Drake J, Banks WA, Eyerman E, et al. The antioxidants alpha-lipoic acid and N-acetylcysteine reverse memory impairment and brain oxidative stress in aged SAMP8 mice. *J Neurochem.* 84(5):1173-1183, 2003.
177. Ono K, Hirohata M, Yamada M. Alpha-lipoic acid exhibits anti-amyloidogenicity for beta-amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 341(4):1046-1052, 2006.
178. Lovell MA, Xie C, Xiong S, Markesbery WR. Protection against amyloid beta peptide and iron/hydrogen peroxide toxicity by alpha lipoic acid. *J Alzheimers Dis.* 5(3):229-239, 2003.
179. Holmquist L, Stuchbury G, Berbaum K, Muscat S, Young S, Hager K, et al. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer's disease and related dementias. *Pharmacol Ther.* 113(1):154-164, 2007.
180. Haugaard N, Levin RM. Regulation of the activity of choline acetyl transferase by lipoic acid. *Mol Cell Biochem.* 213(1-2):61-63, 2000.
181. Meraz-Rios MA, Toral-Rios D, Franco-Bocanegra D, Villeda-Hernandez J, Campos-Pena V. Inflammatory process in Alzheimer's Disease. *Front Integr Neurosci.* 7:59, 2013.
182. Ooi L, Patel M, Münch G. The Thiol Antioxidant Lipoic Acid and Alzheimer's Disease. pp 2275-2288. In: Laher I, editor. *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants.* Springer, Berlin, Heidelberg 2014.

183. Dinicola S, Proietti S, Cucina A, Bizzarri M, Fuso A. Alpha-Lipoic Acid Downregulates IL-1 β and IL-6 by DNA Hypermethylation in SK-N-BE Neuroblastoma Cells. *Antioxidants (Basel)*. 6(4):74, 2017.
184. Quinn JF, Bussiere JR, Hammond RS, Montine TJ, Henson E, Jones RE, et al. Chronic dietary alpha-lipoic acid reduces deficits in hippocampal memory of aged Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*. 28(2):213-225, 2007.
185. Suh JH, Zhu BZ, deSzoeko E, Frei B, Hagen TM. Dihydrolipoic acid lowers the redox activity of transition metal ions but does not remove them from the active site of enzymes. *Redox Rep*. 9(1):57-61, 2004.
186. Micili SC, Goker A, Kuscu K, Ergur BU, Fuso A. α -Lipoic Acid Vaginal Administration Contrasts Inflammation and Preterm Delivery in Rats. *Reprod Sci*. 26(1):128-138, 2019.
187. Özel F, Kiray M, Göker A, Aydemir S, Mıcılı SC. Protective effect of alpha lipoic acid on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced primary ovarian failure in female rats. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 59(2):293-300, 2020.
188. Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *J Assist Reprod Genet*. 29(2):175-183, 2012.
189. Rago R, Marcucci I, Leto G, Caponecchia L, Salacone P, Bonanni P, et al. Effect of myo-inositol and alpha-lipoic acid on oocyte quality in polycystic ovary syndrome non-obese women undergoing in vitro fertilization: a pilot study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 29(4):913-923, 2015.
190. Gosselin LE, Chrapowitzky L, Rideout TC. Metabolic effects of α -lipoic acid supplementation in pre-diabetics: a randomized, placebo-controlled pilot study. *Food Funct*. 10(9):5732-5738, 2019.
191. Mollo R, Zaccardi F, Scalone G, Scavone G, Rizzo P, Navarese EP, et al. Effect of α -lipoic acid on platelet reactivity in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 35(2):196-197, 2012.
192. Haritoglou C, Gerss J, Hammes HP, Kampik A, Ulbig MW. RETIPON Study Group. Alpha-lipoic acid for the prevention of diabetic macular edema. *Ophthalmologica*. 226(3):127-137, 2011.

193. Altunina NV, Lizogub VG, Bondarchuk OM. Alpha-Lipoic Acid as a Means of Influence on Systemic Inflammation in Type 2 Diabetes Mellitus Patients with Prior Myocardial Infarction. *J Med Life*. 13(1):32-36, 2020.
194. Agathos E, Tentolouris A, Eleftheriadou I, Katsaouni P, Nemtzas I, Petrou A, et al. Effect of α -lipoic acid on symptoms and quality of life in patients with painful diabetic neuropathy. *J Int Med Res*. 46(5):1779-1790, 2018.
195. Aslfalah H, Jamilian M, Rafiei F, Khosrowbeygi A. Reduction in maternal serum values of glucose and gamma-glutamyltransferase after supplementation with alpha-lipoic acid in women with gestational diabetes mellitus. *J Obstet Gynaecol Res*. 45(2):313-317, 2019.
196. Alleva R, Tomasetti M, Sartini D, et al. alpha-Lipoic acid modulates extracellular matrix and angiogenesis gene expression in non-healing wounds treated with hyperbaric oxygen therapy. *Mol Med*. 14(3-4):175-183, 2008.
197. Mahdavi R, Khabbazi T, Safa J. Alpha lipoic acid supplementation improved antioxidant enzyme activities in hemodialysis patients. *Int J Vitam Nutr Res*. 89(3-4):161-167, 2019.
198. Himmelfarb J, Ikizler TA, Ellis C, Wu P, Shintani A, Dalal S, et al. Provision of antioxidant therapy in hemodialysis (PATH): a randomized clinical trial. *J Am Soc Nephrol*. 25(3):623-633, 2014.
199. Shinto L, Quinn J, Montine T, Dodge HH, Woodward W, Baldauf-Wagner S, et al. A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 38(1):111-120, 2014.
200. Guo Y, Jones D, Palmer JL, Forman A, Dakhil SR, Velasco MR, et al. Oral alpha-lipoic acid to prevent chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Support Care Cancer*. 22(5):1223-1231, 2014.
201. Sanders LLO, de Souza Menezes CE, Chaves Filho AJM, de Almeida Viana G, Fechine FV, Rodrigues de Queiroz MG, et al. α -Lipoic Acid as Adjunctive Treatment for Schizophrenia: An Open-Label Trial. *J Clin Psychopharmacol*. 37(6):697-701, 2017.
202. Khalili M, Azimi A, Izadi V, Eghtesadi S, Mirshafiey A, Sahraian MA, et al. Does lipoic acid consumption affect the cytokine profile in multiple sclerosis patients:

- a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Neuroimmunomodulation*. 21(6):291-296, 2014.
203. Khalili M, Eghtesadi S, Mirshafiey A, Eskandari G, Sanoobar M, Sahraian MA, et al. Effect of lipoic acid consumption on oxidative stress among multiple sclerosis patients: a randomized controlled clinical trial. *Nutr Neurosci*. 17(1):16-20, 2014.
204. Salinthone S, Yadav V, Schillace RV, Bourdette DN, Carr DW. Lipoic acid attenuates inflammation via cAMP and protein kinase A signaling. *PLoS One*. 5(9):e13058, 2010.
205. Hejazi N, Mazloom Z, Zand F, Rezaianzadeh A, Nikandish R. The Beneficial Effects of α -Lipoic Acid in Critically Ill Patients: A Prospective, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Asian J Anesthesiol*. 56(2):45-55, 2018.
206. Casciato P, Ambrosi N, Caro F, Vazquez M, Müllen E, Gadano A, et al. α -lipoic acid reduces postreperfusion syndrome in human liver transplantation - a pilot study. *Transpl Int*. 31(12):1357-1368, 2018.
207. Velauthapillai N, Barfett J, Jaffer H, Mikulis D, Murphy K. Antioxidants Taken Orally prior to Diagnostic Radiation Exposure Can Prevent DNA Injury. *J Vasc Interv Radiol*. 28(3):406-411, 2017.
208. Mirtaheri E, Gargari BP, Kolahi S, Dehghan P, Asghari-Jafarabadi M, Hajalilou M, et al. Effects of Alpha-Lipoic Acid Supplementation on Inflammatory Biomarkers and Matrix Metalloproteinase-3 in Rheumatoid Arthritis Patients. *J Am Coll Nutr*. 34(4):310-317, 2015.
209. Kolahi S, Mirtaheri E, Pourghasem Gargari B, Khabbazi A, Hajalilou M, Asghari-Jafarabadi M, et al. Oral administration of alpha-lipoic acid did not affect lipid peroxidation and antioxidant biomarkers in rheumatoid arthritis patients. *Int J Vitam Nutr Res*. 89(1-2):13-21, 2019.
210. Hanley EN Jr, McCulloch JA. Surgical Indication and Techniques International Society for the Study of the Lumbar Spine. pp 492-524. In: Weinstein JN, Wiesel SW, editors. *The Lumbar Spine*. 2nd ed. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1996.
211. Somay H, Karaarslan N. Sequestrectomy or microdiscectomy in patients with lumbar disc herniation. *Annals of Medical Research*. 26(4):753-8, 2019.

212. Karaarslan N, Yilmaz I, Ozbek H, Yasar Sirin D, Kaplan N, Caliskan T, et al. Are radio-contrast agents commonly used in discography toxic to the intact intervertebral disc tissue cells? *Basic ClinPharmacol Toxicol.* 124(2):181-189, 2019.
213. Akyuva Y, Kaplan N, Yilmaz I, Ozbek H, Sirin DY, Karaaslan N, et al. Delivering Growth Factors through a Polymeric Scaffold to Cell Cultures Containing both Nucleus Pulposus and Annulus Fibrosus. *TurkNeurosurg.* 29(2):180-193, 2019.
214. Tibullo D, Li Volti G, Giallongo C, Grasso S, Tomassoni D, Anfuso CD, et al. Biochemical and clinical relevance of alpha lipoic acid: antioxidant and anti-inflammatory activity, molecular pathways and therapeutic potential. *Inflamm Res.* 66(11):947-959, 2017.
215. Gomes RG, Silva CB, González SM, Oliveira RL, Max MC, Lisboa LA, et al. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. *Theriogenology.* 105:169-173, 2018.
216. Dinicola S, Fuso A, Cucina A, Santiago-Reyes M, Verna R, Unfer V, et al. Natural products - alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine - in the treatment of chemotherapy-induced peripheral neuropathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 22(14):4739-4754, 2018.
217. Kaplan N, Yilmaz I, Karaarslan N, Sirin Yasar D, Şimşek AT, Caliskan T, et al. Evaluation of the Effect of Daptomycin, a Glycopeptide Agent, on Intact Intervertebral Disc Tissue. *Turk Neurosurg.* 29(4):522-529, 2019.
218. Karaarslan N, Yilmaz I, Yasar Sirin D. Toxicity of the acetyl-para-aminophenol group of medicines to intact intervertebral disc tissue cells. *Exp Ther Med* 21:147, 2021.
219. Akgun FS, Sirin DY, Yilmaz I, Karaarslan N, Ozbek H, Simsek TA, et al. Investigation of the effect of dipyron on cells isolated from intervertebral disc tissue. *Exp Ther Med.* 18:216-224, 2019.
220. Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Ozbek H, Kaplan N, Kaya YE, et al. Pregabalin treatment for neuropathic pain may damage intervertebral disc tissue. *Exp Ther Med.* 16(2):1259-1265, 2018.
221. Karaarslan N, Yilmaz I, Ozbek H, Sirin DY, Kaplan N, Akyuva Y, et al. Are Specific Gene Expressions of Extracellular Matrix and Nucleus Pulposus Affected by

Primary Cell Cultures Prepared from Intact or Degenerative Intervertebral Disc Tissues? *Turk Neurosurg.* 29(1):43-52, 2019.

222. Toktaş ZO, Ekşi MŞ, Yılmaz B, Demir MK, Özgen S, Kılıç T, et al. Association of collagen I, IX and vitamin D receptor gene polymorphisms with radiological severity of intervertebral disc degeneration in Southern European Ancestor. *Eur Spine J.* 24:2432-2441, 2015.

223. Yang Q, Liu Y, Guan Y, Zhan X, Xiao Z, Jiang H, Wei Q. Vitamin D Receptor gene polymorphisms and plasma levels are associated with lumbar disc degeneration. *Sci Rep.* 9:7829, 2019.

224. Dogan A, Dogan K, Tasolar S. Magnetic resonance imaging evaluation of the effects of cigarette and maras powder (smokeless tobacco) on lumbar disc degeneration. *Clin Neurol Neurosurg.* 186:105500, 2019.

225. Eksi MS, Kara M, Ozcan-Eksi EE, Aytar MH, Gungor A, Ozgen S, Pamir MN. Is diabetes mellitus a risk factor for Modic Changes?: A novel model to understand the association between intervertebral disc degeneration and end-plate changes. *J Orthop Sci.* 25:571-75, 2020.

226. Memeo A, Loiero M. Thiocctic acid and acetyl-L-carnitine in the treatment of sciatic pain caused by a herniated disc: a randomized, double-blind, comparative study. *Clin Drug Investig.* 28(8):495-500, 2008.

227. Karaarslan N, Batmaz AG, Yilmaz I, Ozbek H, Caliskan T, Yasar Sirin D, et al. Effect of naproxen on proliferation and differentiation of primary cell cultures isolated from human cartilage tissue. *Exp Ther Med.* 16(3):1647-1654, 2018.

228. Gumustas SA, Oznam K, Mutlu CA, Kaya YE, Yilmaz I, Isyar M, et al. Are We Using Slow-Acting Symptomatic Chondroprotective Drugs Conscious Enough? *Open Orthop J.* 31;11:533-540, 2017.

229. Oznam K, Sirin DY, Yilmaz I, Kaya YE, Isyar M, Gumustas SA, et al. Iopromide- and gadopentetic acid-derived preparates used in MR arthrography may be harmful to chondrocytes. *J Orthop Surg Res.* 12(1):98, 2017.

230. Gumustas F, Yilmaz I, Sirin DY, Gumustas SA, Batmaz AG, Isyar M, et al. Chondrocyte proliferation, viability and differentiation is declined following administration of methylphenidate utilized for the treatment of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Hum Exp Toxicol.* 36(9):981-992, 2017.

231. Kaya YE, Akalan H, Yilmaz I, Karaarslan N, Sirin DY, Ozbek H. Evaluation of the expression and proliferation of degenerative markers in primary cell cultures obtained from human intervertebral disc tissue. *Annals of Medical Research*. 27(3): 711-16, 2020.
232. Ishii Y, Thomas AO, Guo XE, Hung CT, Chen FH. Localization and distribution of cartilage oligomeric matrix protein in the rat intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 31(14):1539-46, 2006.
233. Rutges J, Creemers LB, Dhert W, Milz S, Sakai D, Mochida J, et al. Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 18:416-23, 2010.
234. Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Baykız D, Demirkıran A, Ateş Ö. Do we damage nucleus pulposus tissue while treating cerebrovascular ischemic neurological deficits with nimodipine? *Ann Med Res* 25:266-73, 2018.
235. Yee A, Lam MP, Tam V, Chan WC, Chu IK, Cheah KS, et al. Fibrotic-like changes in degenerate human intervertebral discs revealed by quantitative proteomic analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 24:503-13, 2016.
236. Kaplan N, Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin Yasar D, Akgun FS, Caliskan T, et al. Are Intervertebral Disc Tissue Cells Damaged When Attempting to Prevent Thrombus Formation Using Dabigatran, A New Oral Anticoagulant? *Turk Neurosurg*. 29(4):470-477, 2019.
237. Lv FJ, Peng Y, Lim FL, Sun Y, Lv M, Zhou L, et al. Matrix metalloproteinase 12 is an indicator of intervertebral disc degeneration co-expressed with fibrotic markers. *Osteoarthritis Cartilage* 24:1826-36, 2016.
238. Yilmaz I, Gokay NS, Bircan R, Saracoglu GV, Dervisoglu S, Gokce A. How different methodologies of harvesting and analysing the samples affect the test results in determining joint mediators. *Arthritis*. 2013:631959, 2013.
239. Gokay NS, Yilmaz I, Komur B, Demiroz AS, Gokce A, Dervisoglu S and Gokay BV. A Comparison of the effects of neuronal nitric oxide synthase and inducible nitric oxide synthase inhibition on cartilage damage. *Biomed Res Int*. 2016:7857345, 2016.
240. Goupille P, Jayson MI, Valat JP, Freemont AJ. Matrix metalloproteinases: The clue to intervertebral disc degeneration? *Spine (Phila Pa 1976)* 23:1612-1626, 1998.

241. Kaya YE, Karaarslan N, Sirin DY, Ozbek H, Kaplan N, Yilmaz I. Investigation of the Effects of Methylphenidate, an Amphetamine Derivative, on Intervertebral Disc Tissue Cell Cultures and Matrix Structures. *Turk Neurosurg.* 29(5):734-742, 2019.
242. Kaya YE, Karaarslan N, Yilmaz I, Sirin DY, Akalan H, Ozbek H. A Study of the Effects of Metformin, a Biguanide Derivative, on Annulus Fibrosus and Nucleus Pulposus Cells. *Turk Neurosurg.* 30(3):434-441, 2020.
243. Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN Jr. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc: Implications for disc aging and degeneration. *Biotech Histochem* 80:157-162, 2005.
244. Yurube T, Takada T, Suzuki T, Kakutani K, Maeno K, Doita M, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther* 14:R51, 2012.
245. Nishida Y, D'Souza AL, Thonar EJ, Knudson W. Stimulation of hyaluronan metabolism by interleukin-1alpha in human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 43: 1315-1326, 2000.
246. Hu B, Xu C, Tian Y, Shi C, Zhang Y, Deng L, et al. Inflammatory microRNA-194 and -515 attenuate the biosynthesis of chondroitin sulfate during human intervertebral disc degeneration. *Oncotarget.* 8:49303-49317, 2017.
247. Paradells S, Zipancic I, Martínez-Losa MM, García Esparza MÁ, Bosch-Morell F, Alvarez-Dolado M, et al. Lipoic acid and bone marrow derived cells therapy induce angiogenesis and cell proliferation after focal brain injury. *Brain Inj.* 29(3):380-395, 2015.
248. Yang Y, Wang W, Liu Y, Guo T, Chen P, Ma K, et al. α -lipoic acid inhibits high glucose-induced apoptosis in HIT-T15 cells. *Dev Growth Differ.* 54(5):557-565, 2012.
249. Lee WR, Kim A, Kim KS, Park YY, Park JH, Kim KH, et al. Alpha-lipoic acid attenuates athero sclerotic lesions and inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through targeting of the Ras/MEK/ERK signaling pathway. *MolBiolRep.* 39(6):6857-6866, 2012.
250. Martinova EA, Vasiliev AV, Sharanova NE, Gapparov MM. Effects of lipoic acid on proliferation and apoptosis of liver cells in rats with metabolic stress. *BullExpBiolMed.* 150(3):311-315, 2011.

11. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 10840098-604.01.01-E.8223
Konu : Etik Kurulu Kararı

27/02/2019

Sayın İrfan AYDIN

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Alfa Lipoik Asit'in İnsan Dejenere İntervertebral Disk Dokusu Primer Hücre Kültürleri Üzerine Potansiyel Etkilerinin Araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurulu Başkanı

Ek:
-Karar Formu (2 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 27.02.2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 8D35624AX8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto: bilgi@medipol.edu.tr)

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alfa Lipoik Asit'in İnsan Dejenere İntervertebral Disk Dokusu Primer Hücre Kültürleri Üzerine Potansiyel Etkilerinin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	İrfan AYDIN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Farmakoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	İstanbul			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ/PLANI			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
Karar Bilgileri	Karar No: 185	Tarih: 22/02/2019		
	Yukarıda bilgileri verilen Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmanın etik ve bilimsel yönden uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.			

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Şeref DEMİRAYAK	Eczacılık	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	Farmakoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç. Dr. İknur KESKİN	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Devrim TARAKCI	Fizyoterapi ve Rehabilitasyon	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sibel DOĞAN	Psiko-onkoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Hikmet ÜÇİŞİK	Biyoteknoloji	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Keziban OLCAY	Endodonti	İstanbul Medipol Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma